



ORIGINAL ARTICLE

## Effect of the Cold Stress on the Fruiting Body Production by the Medicinal Basidiomycetes in Submerged and Solid-phase Culture

E.P. Vetchinkina\*, V.E. Nikitina

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia*

\*E-Mail: [elenavetrus@yandex.ru](mailto:elenavetrus@yandex.ru)

Received February 20, 2017

The ability of medicinal xylotrophic basidiomycetes *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* to produce typical and atypical fruiting bodies with viable basidiospores in the submerged and solid-phase culture under the stationary conditions at the beer wort-containing medium by the cold stress was shown. Examined mushrooms, when not exposed to the temperature stress, had not formed fruiting bodies. In the solid-phase culture at the agar medium after the cold treatment basidiome formation time was shortened by 1.5–2 times. Furthermore, the use of the mycelium, subjected to the temperature stress, as an inoculate induced and accelerated formation of the fruiting bodies on the industrial wood substrate, that have a big biotechnological importance.

*Key words: xylotrophic basidiomycetes, submerged and solid-phase cultivation, typical and atypical fruit bodies, cold stress*

Ксилотрофные базидиомицеты занимают важное место в структуре растительных и лесных биоценозов, как участники процессов биодеструкции растительных отходов. Представители данной группы грибов *Lentinus edodes* (шиитакэ), *Pleurotus ostreatus* (вешенка устричная), *Grifola frondosa* (маитакэ) и *Ganoderma lucidum* (рейши или трутовик лакированный) ценятся как высококачественные съедобные грибы, а также как продуценты ферментов и уникального комплекса биологически активных и лекарственных веществ, нашедших широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности (Wasser, Weis, 1999; Ikekawa, 2001; Lobanok *et al.*, 2003; Kanska, 2006). Плодовые тела, значительно реже вегетативный мицелий, используют как ценное сырье для получения высокоэффективных, не оказывающих токсического действия на организм человека, медицинских препаратов и биологически активных добавок, обладающих противовоспалительными, иммуностимулирующими, противовирусными, гепатопротекторными, противоаллергенными, антибиотическими, антиоксидантными свойствами, и широко применяющихся для лечения целого ряда заболеваний (Bender *et al.*, 2001; Wasser, 2002; Feofilova, 2004; Krasnopol'skaya *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012; Yukawa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014). Немаловажным также является факт, что в качестве пищевых субстратов для этих грибов, относящихся к экогруппе деструкторов древесины, можно использовать отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности (Leonowicz, 2001; Baldrian, 2006).

В лабораторных и промышленных условиях вегетативный мицелий базидиомицетов получают методом погруженного культивирования, плодовые тела выращивают по экстенсивной и интенсивной технологиям на соломе, лузге или древесном субстрате (Stamets, 1993; Garibova *et al.*, 2003). Получение плодовых тел ксилотрофных грибов длительный и трудоемкий процесс, что связано с особенностями их жизненного цикла. Зачастую существует потребность получения плодовых тел

базидиомицетов с жизнеспособными базидиоспорами в лабораторных условиях, минуя стадии промышленного культивирования, что может значительно сократить сроки плодообразования грибов. Вопрос о возможной оптимизации искусственного выращивания базидиомицетов в лабораторных условиях до настоящего времени актуален. Поэтому знание способов какого-либо воздействия с целью биологической модификации развития грибов, позволяющих получить плодовые тела методом погруженного и твердофазного культивирования на искусственных средах в лабораторных условиях и сократить сроки плодообразования, может стать эффективным решением данной проблемы.

Цель работы – получить плодовые тела *G. lucidum*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *P. ostreatus* при разных условиях культивирования (глубинном и поверхностном выращивании на жидких и агаризованных средах), а также сократить сроки плодообразования при интенсивном выращивании в лабораторных условиях, посредством холодового стресса.

## MATERIALS AND METHODS

В качестве объектов исследования в данной работе использовали ксилотрофные базидиомицеты *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (шиитакэ) штамм F-249, *Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gray (маитакэ) штамм 0917, *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) (рейши или трутовик лакированный) штамм 1315 и *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kunt. (вешенка устричная) штамм НК-35, полученные из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова и коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Культуры хранили в коллекции высших грибов лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН на косяках с агаризованным (2%) пивным сушлом (4° по Баллингу) при 4°C (Ball, 2006). В качестве инокулята брали 14-суточные грибные культуры, выращенные на агаризованной среде того же состава при 26°C.

Культуры грибов выращивали в условиях

твердофазного (с добавлением 2% агар-агара) и глубинного культивирования на 4° пивном сусле и синтетической среде следующего состава (г/л): D-глюкоза – 1; L-аспарагин – 0.1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2.5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.03, pH 5.8; на чашках Петри или при стационарных условиях в колбах объемом 100 мл с 50 мл среды при температуре 26°C, как оптимальной температуре роста мицелия большинства базидиальных грибов (Przybyłowicz, Donoghue, 1991). Культуры выращивали в течение 14 суток при 26°C, а затем выдерживали при 4°C трое суток. Контрольные культуры холодному стрессу не подвергали.

Интенсивным способом ксилотрофы выращивали в лабораторных условиях на древесном субстрате. Субстрат готовили следующим способом: четыре части дубовых опилок смешивали с одной частью зерна пшеницы, запаривали на несколько часов горячей водой и слегка подсушивали (влажность 70 – 80%). Затем субстратом наполняли полипропиленовые пакеты («ГЕМ», Россия), закрывали, оставляя отверстие, в которое помещали ватно-марлевую пробку, и автоклавировали 30 минут при 1 атмосфере, повторное автоклавирование при тех же условиях осуществляли через 24 часа. В стерильных условиях, в проделанное сквозь всю толщу субстрата отверстие, в пакеты вносили мицелий. В качестве инокулята использовали 50 мл глубинной 14-суточной культуры грибов. Инкубацию проводили в термостате при температуре 26°C до полной колонизации субстрата мицелием. После полного зарастания блока и начала образования примордиев, пакет удаляли и блок помещали в светлое вентилируемое помещение, с температурой воздуха около 26°C для получения зрелых плодовых тел базидиомицетов.

Эксперименты по получению плодовых тел при разных условиях культивирования проводились в трех повторностях в трех независимых экспериментах.

## RESULTS AND DISCUSSION

В настоящей работе была исследована способность базидиомицетов *G. lucidum*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *P. ostreatus*, принадлежащих к разным

экологическим группам, образовывать примордии и плодовые тела на питательных средах разного состава при оптимальной температуре культивирования и в условиях температурного стресса. После колонизации и освоения субстрата вегетативный белый мицелий уплотнялся и приобретал пигментацию, спустя некоторое время он покрывался слоем сильно переплетенных окрашенных гиф, что приводило к формированию коричневой мицелиальной пленки – характерной стадии морфогенеза многих видов базидиомицетов. Данная морфоструктура представляет собой бархатистую пленку кожистой консистенции от бежевого до темно-коричневого цвета, состоящую из плотно переплетенных толстостенных меланизированных гиф. Мицелиальная пленка напоминает ткань и покрывает большую часть поверхности непигментированного мицелия, она образуется непосредственно перед началом плодоношения, под ее поверхностью начинают формироваться примордии. В процессе эволюции эта структура, вероятно, появилась как защитный механизм, предохраняющий мицелий и формирующиеся плодовые тела от неблагоприятных воздействий окружающей среды: избытка освещения, пересыхания мицелия, снижения проницаемости клеточных стенок для токсичных веществ и патогенов. По ряду признаков данная морфоструктура напоминает склероции – стадии покоя грибов, образующиеся в ответ на неблагоприятные внешние раздражители.

Установлено, что при выращивании на агаризованном пивном сусле на чашках Петри культуры *G. lucidum* и *L. edodes*, при оптимальной температуре культивирования для данных видов (26°C), образовывали примордии на 30 – 35 сутки и плодовые тела на 45 – 60 сутки после инокуляции. Плодовые тела развивались в непосредственной близости к мицелиальной пленке или на ней и были прочно прикреплены к пленке основанием ножки (Рис. 1 А, В). Мицелиальная пленка трутовика кожистая очень плотная имела насыщенный бежевый цвет и формировалась в основном по центру колонии. У шиитаке данная структура плотная бархатистая заполняла большую часть

поверхности мицелия, в основном по краям, и была темно коричневого цвета из-за большого количества меланина внутри и на поверхности клеток.

Базидиомицет *G. frondosa* при данных условиях культивирования не образовывал примордий и плодовых тел на протяжении 80 суток эксперимента. Несмотря на это майтаке на поверхности непигментированного мицелия формировал мицелиальную пленку спустя 1.5 месяца культивирования, которая была менее плотная, чем у других базидиомицетов, заполняла всю поверхность чашки и имела бежево-рыжеватый цвет, отмечено также небольшое количество экссудата. В отличие от всех остальных изучаемых в данной работе видов базидиомицетов, культура *P. ostreatus* не образовывала мицелиальную пленку ни при каких условиях культивирования, по всей вероятности эта стадия морфогенеза для вешенки не является характерной. Несмотря на то, что *P. ostreatus* является быстрорастущей культурой, при данных условиях выращивания даже спустя 2.5 месяца эксперимента образования базидиом не наблюдалось (Рис. 2 А, В).

При тех же условиях культивирования (на чашках Петри с сусло-агаровым субстратом), но после холодного стресса (14 суточные культуры грибов выдерживали 72 часа при температуре 4°C), на 21 – 23 сутки от начала культивирования *P. ostreatus*, *G. lucidum* и на 25 – 30 сутки *L. edodes*, *G. frondosa*, формировали плодовые тела. После холодного шока колонии характеризовались высокой скоростью роста и уже спустя 1 – 2 недели непосредственно на чашках Петри на уплотненном и слегка пигментированном мицелии, (мицелиальная пленка только начинала формироваться), базидиомицеты формировали примордии, которые в последующем при освещении выросли у трутовика лакированного и шиитаке в типичные плодовые тела (Рис. 3 А, В), а два других базидиомицета майтаке и вешенка формировали атипичные базидиомы (Рис. 3 С, D). Таким образом, сроки плодоношения базидиомицетов сократились в два раза, и кроме того, культуры *G. frondosa* и *P. ostreatus* не образующие ранее плодовые тела, после стресса стали способны к формированию базидиом.

При культивировании базидиомицетов на жидкой питательной среде в колбах с пивным суслом при стационарных условиях после холодного стресса (14 суточные культуры выдерживали 72 часа при температуре 4°C), наблюдали плодоношение. Образование примордиев и плодовых тел в глубинной культуре для ксилотрофных базидиомицетов не характерно. Однако, посредством температурного стресса нам удалось получить базидиомы макромицетов методом погруженного культивирования при стационарных условиях. Культуры грибов последовательно образовывали все характерные для данных видов стадии морфогенеза – непигментированный мицелий, пигментированный мицелий, мицелиальную пленку (кроме *P. ostreatus*), примордии и плодовые тела (Рис. 4 А, В). Все базидиомицеты формировали типичные плодовые тела, кроме культуры *G. lucidum*, которая была способна к образованию типичных и атипичных базидиом (Рис. 4 С, D). Базидиомицет *G. frondosa* не образующий типичных базидиом на сусло-агаровом субстрате, в жидкой культуре при стационарном выращивании после холодного шока формировал типичные для данного вида плодовые тела (Рис. 5).

Ряд исследований указывает на способность некоторых штаммов чистых культур *G. lucidum* образовывать атипичные плодовые тела, которые не развиваются в типичные базидиомы при поверхностном культивировании на агаризованных и жидких средах (Seo, Shin, 1995; Postnova *et al.*, 2009). Коралловидные атипичные плодовые тела, тем не менее, были способны к формированию жизнеспособных базидиоспор. Такие абиотические факторы, как освещенность, аэрация, pH и некоторые источники углеродного и азотного питания не влияли на способность культур к образованию атипичных плодовых тел и, следовательно, этот признак может считаться штаммовым.

Попытка получить плодовые тела изучаемых базидиомицетов при твердофазном и глубинном культивировании на синтетической среде в условиях оптимальной температуры и холодного шока не увенчалась успехом, данные культуры ни

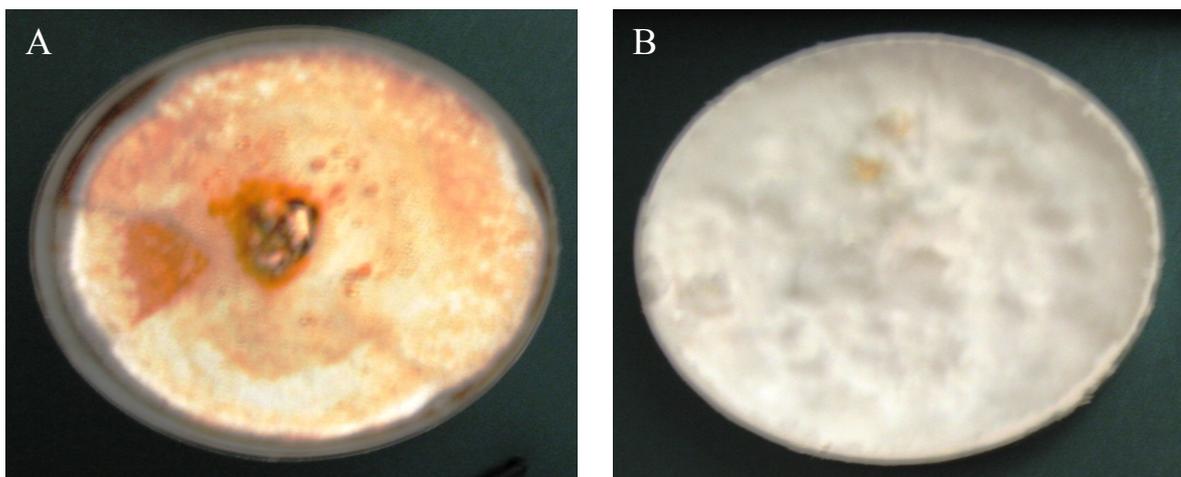
примордиев, ни типичных, ни атипичных плодовых тел не формировали. Очевидно, что данная минеральная среда, часто используемая в экспериментах для выращивания базидиомицетов, для получения базидиом ксилотрофных макромицетов не пригодна.

В дальнейшем мы исследовали способность «стрессовых» культур *G. lucidum* и *L. edodes* к плодоношению на древесном субстрате в лабораторных условиях, наиболее приближенным к промышленному культивированию. Оказалось, что при одинаковых условиях первоначального культивирования базидиомицетов на жидком пивном сусле, 14 суточный мицелий, взятый в качестве инокулята, и подверженный холодному шоку, характеризовался более высокой скоростью колонизации субстрата и в 1.5 – 2 раза быстрее формировал плодовые тела, чем культура не подверженная температурному стрессу. Формирование мицелиальной пленки и базидиом трутовика лакированного начиналось еще в темноте, а после начала освещения, штамм *G. lucidum* 1315 образовывал атипичные плодовые тела с жизнеспособными базидиоспорами (Рис. 6 А), именуемые в литературе «оленьи рога» (Stamets, 1993). Базидиомицет шиитаке при температурном стрессе на опилочно-зерновом субстрате в два раза быстрее, по сравнению с инокулятом не подверженным холодному воздействию,

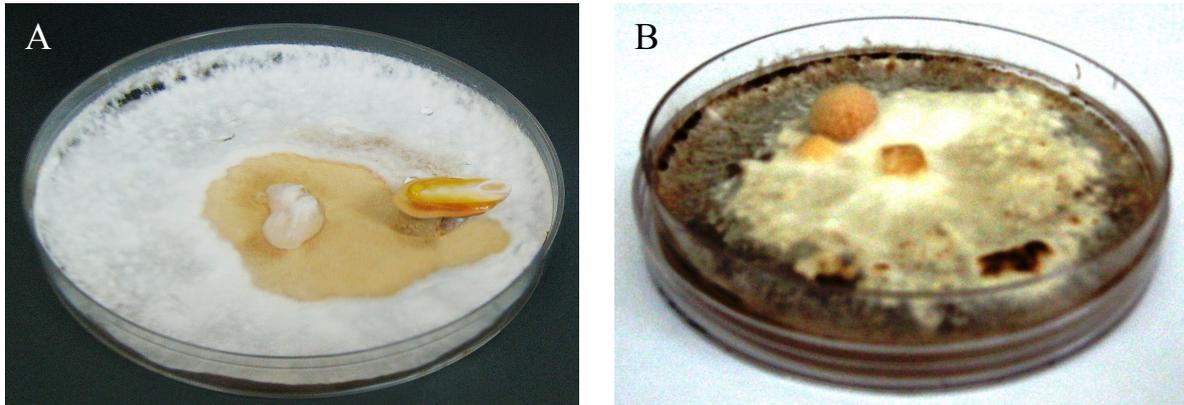
формировал коричневую мицелиальную пленку, которая покрывала большую часть поверхности не пигментированного мицелия и образовывал большое количество примордиев и типичных плодовых тел (Рис. 6 В).

При инокулировании субстрата мицелием культур *G. lucidum* и *L. edodes*, выращенным на жидкой минеральной среде в стрессовых условиях и без них, колонизация опилочно-зернового субстрата происходила очень медленно, и плодовые тела либо получить не удавалось, либо плодоношение начиналось на 1 – 2 месяца позже.

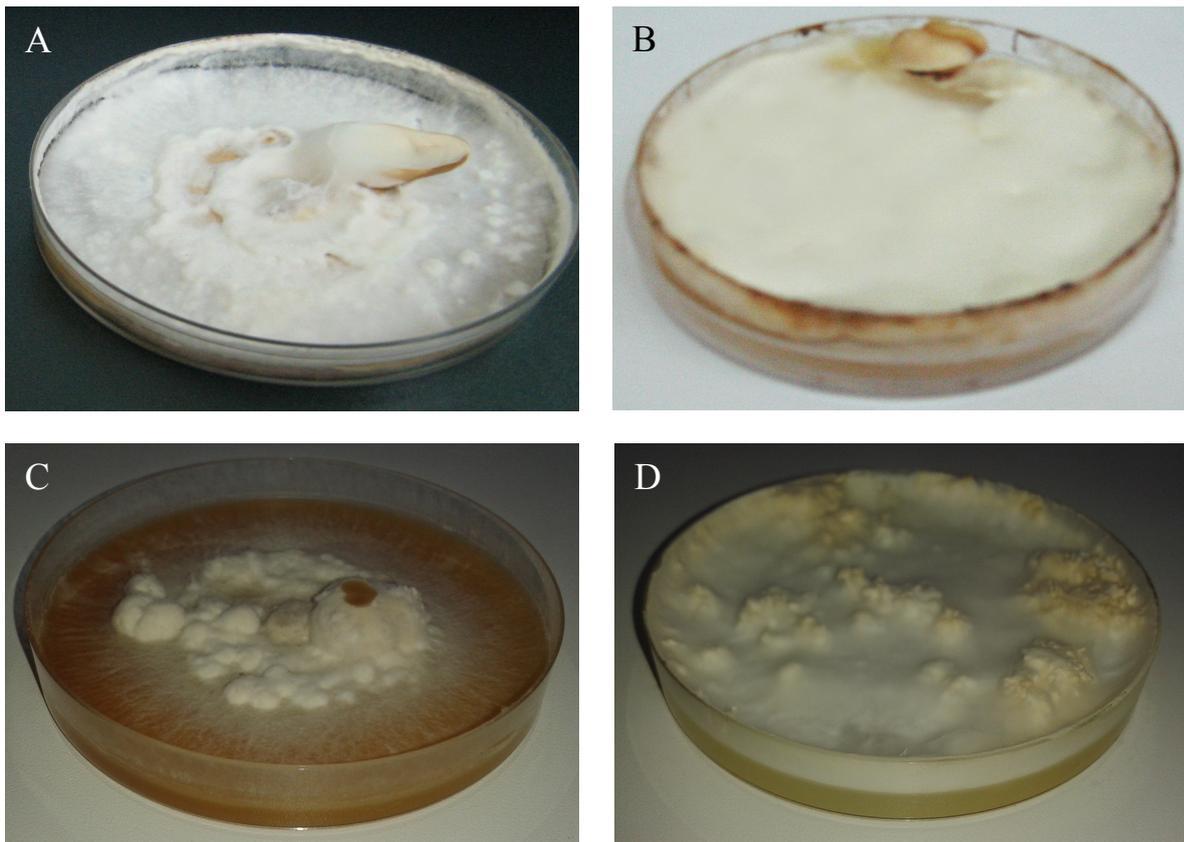
Таким образом, в настоящей работе посредством холодного стресса получили примордии и плодовые тела базидиомицетов *G. lucidum*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *P. ostreatus*, на агаризованной и впервые на жидкой среде с пивным суслом. Кроме того, использование в качестве инокулята мицелия подверженного холодному шоку, стимулировало и ускоряло процесс плодообразования. На наш взгляд, предложенная модификация способа культивирования биотехнологически значимых базидиомицетов, путем воздействия низких температур на стадии дикариотического мицелия, позволяет получить плодовые тела грибов методом погруженного культивирования и сократить сроки плодообразования в лабораторных и промышленных условиях, что имеет важное прикладное значение.



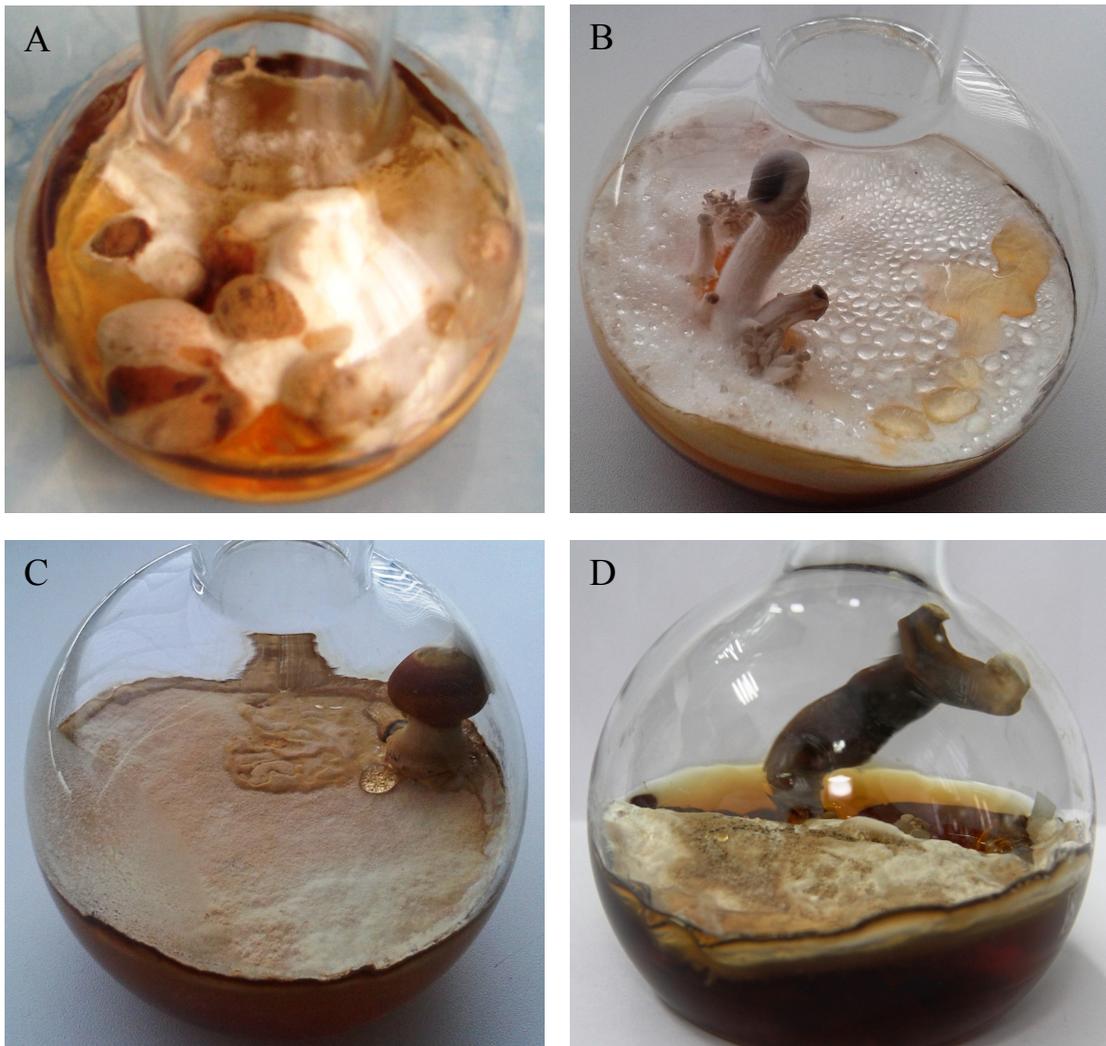
**Figure 1.** Образование плодовых тел у *G. lucidum* (A) и *L. edodes* (B) при твердофазном культивировании с сусло-агаровым субстратом на чашках Петри.



**Figure 2.** Мицелий базидиомицетов *G. frondosa* (A) и *P. ostreatus* (B) при твердофазном культивировании с сусло-агаровым субстратом на чашках Петри.



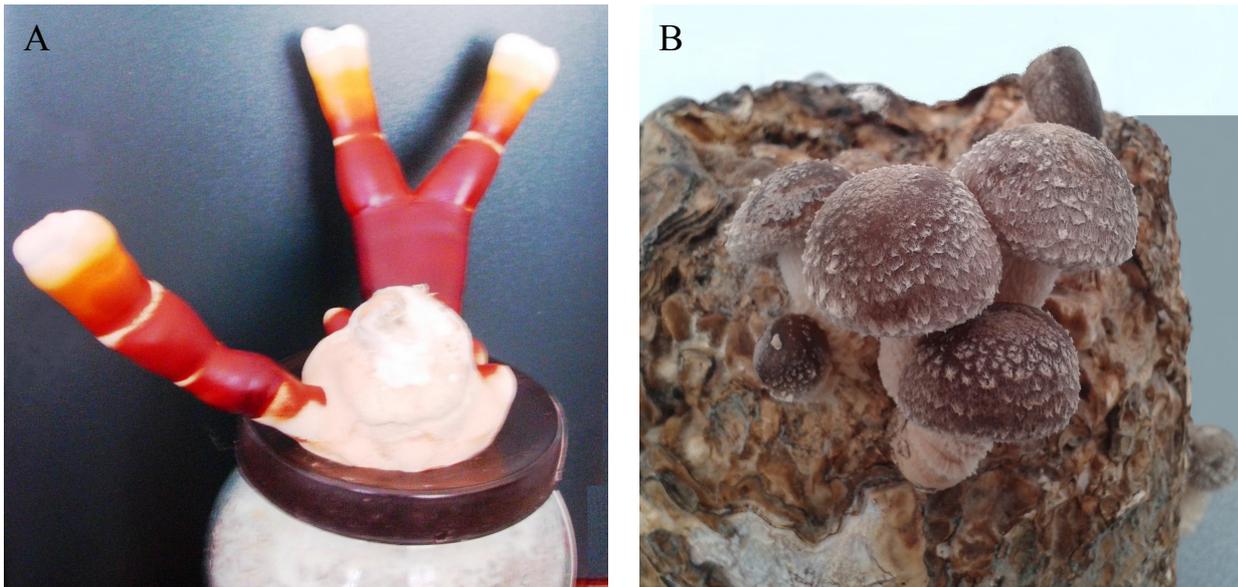
**Figure 3.** Образование плодовых тел у базидиомицетов *G. lucidum* (A), *L. edodes* (B), *G. frondosa* (C) и *P. ostreatus* (D) при твердофазном культивировании с сусло-агаровым субстратом на чашках Петри при холодном стрессе.



**Figure 4.** Образование типичных плодовых тел у базидиомицетов *L. edodes* (A), *P. ostreatus* (B), *G. lucidum* (C) и атипичных базидиом *G. lucidum* (D) при культивировании на колбах с пивным суслом после холодного стресса.



**Figure 5.** Образование типичных плодовых тел у базидиомицетов *G. frondosa* при культивировании на колбе с пивным суслом после холодного стресса.



**Figure 6.** Образование атипичных базидиом у *G. lucidum* (A) и типичных плодовых тел у *L. edodes* (B) при культивировании на опилочно-зерновом субстрате после холодного стресса.

## ACKNOWLEDGEMENT

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-02926).

## REFERENCES

- Baldrian P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 215–242.
- Ball D.W. (2006) Concentration Scales for Sugar Solutions. *J. Chem. Educ.*, **83**, 1489–1491.
- Bender S., Lonergan G.T., Backhaus J., Cross R.F., Dumitrach-Anghel C.N., Baker W.L. (2001) The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Int. J. Med. Mushr.*, **3(1-2)**, 118 p.
- Feofilova E.P. (2004) Mycelial fungi as a source for obtaining new medical products with immunomodulating, antitumoral, and wound healing activities. *Immun. Allerg. Infect. (Moscow)*, **1**, 27–33.
- Garibova L.V., Antimonova A.V., Zavyalova L.A., Krasnopol'skaya L.M. (2003) Growth and morphological features of *Ganoderma lucidum* mycelium depending on culture conditions. *Mikol. Fitopatol.*, **37(3)**, 14–19.
- Ikekawa T. (2001) Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms. *Int. J. Med. Mushr.*, **3**, 291–298.
- Konska G. (2006) Lectins of higher fungi (Micromycetes) – Their occurrence, physiological role, and biological activity. *Int. J. Med. Mushr.*, **8(1)**, 19–30.
- Krasnopol'skaya L., Belitsky I., Avtonomova A., Soboleva N., Usov A., Isakova E., Libenson A., Bukchman V. (2005) Screening system for medicinal basidiomycetes antitumor extracts. *Int. J. Med. Mushr.*, **7**, 423–425.
- Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic. Microbiol.*, **41**, 185–227.
- Lobanok A.G., Babitskaya V.G., Plenina L.V., Puchkova T.A., Osadchaya O.V. (2003) Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **39**, 60–64.
- Postnova E.L., Zavyalova L.A., Insarova I.D. (2009) Formation of fruit bodies and primordia of *Ganoderma lucidum* in vitro and influence of abiotic factors on this process. *Mikol. Fitopatol.*, **43(4)**, 299–306.

- Przybylowicz P., Donoghue J. (1991) Shiitake Growers Handbook: the Art and Science of Mushroom Cultivation. Kendall/Hunt Publ, Dubuque, pp.217.
- Ren M., Ye L., Hao X., Ren Z., Ren S., Xu K., Li J. (2014) Polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and *Lentinus edodes* enhance 5-fluorouracil-mediated H22 cell growth inhibition. *J. Tradit. Chin. Med.*, **34(3)**, 309–316.
- Seo G.S., Shin G.C. (1995) Formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum* isolates on a nutrient agar medium. *Mycoscience*, **36**, 1–7.
- Stamets P. (1993) Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press, Berkeley, pp. 552.
- Wang K.P., Zhang Q.L., Liu Y., Wang J., Cheng Y., Zhang Y. (2013) Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from *Lentinus edodes*. *J. Agric. Food. Chem.*, **41(98)**, 49–58.
- Wasser S.P., Weis A.L. (1999) Medicinal Properties of Substances Occuring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). *Int. J. Med. Mushr.*, **1**, 31–62.
- Wasser S.P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 258–274.
- Wu H., Tao N., Liu X., Li X., Tang J., Ma C., Xu X., Shao H., Hou B., Wang H., Qin Z. (2012) Polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One*, **7(12)**, 51–57.
- Xie J.T., Wang C.Z., Wicks S., Yin J.J., Kong J., Li J., Li Y.C., Yuan C.S. (2006) *Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells. *Exp. Oncol.*, **28**, 25–29.
- Yukawa H., Ishikawa S., Kawanishi T., Tamesada M., Tomi H. (2012) Direct cytotoxicity of *Lentinula edodes* mycelia extract on human hepatocellular carcinoma cell line. *Biol. Pharm. Bull.*, **35(7)**, 1014–1021.