

УДК 582.284:576.356:633.16

О. Л. Січняк, к.б.н., доцент,

С. Л. Міресь, к.б.н., доцент

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: sechnyak@ukr.net,

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ЕКЗО- ТА ЕНДОМЕТАБОЛІТІВ ШІІ-ТАКЕ В КОРЕНЕВІЙ МЕРИСТЕМІ ЯЧМЕНЮ

Досліджували вплив культуральної рідини гриба шіі-таке та соку з його плодкових тіл на проростання насіння ячменю та регулярність мітозу в кореневій меристемі паростків. Культуральна рідина шіі-таке достовірно зменшувала енергію проростання і схожість насіння, а також достовірно збільшувала частоту аномальних анафаз у клітинах кореневої меристеми. Сік з плодкових тіл не виявляв мутагенної активності.

Ключові слова: шіі-таке; *Lentinus edodes*, культуральна рідина; анафазний тест; ячмінь.

Останні десятиріччя суттєво збільшився інтерес до лікарського гриба шіі-таке (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing), який відноситься до базидіоміцетів. У теперішній час доведена антиканцерогенна, імуномодулювальна та віріцидна активність ряду речовин, виділених з гриба та середовища його культивування [15, 17, 20]. З'ясовано, що сік гриба має виражену антибактеріальну дію на ряд патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, яка сполучається з антигрибковою активністю [9]. В той же час є відомості про те, що гриби шіі-таке у своєму складі містять формальдегід у кількості 100–240 мг/кг., вміст якого помітно знижується під час сушіння [16]. Є повідомлення й про те, що тестування грибів *Lentinus edodes* на мутагенність в тесті Еймса дало позитивний результат [18]. Отже, питання про генотоксичність компонентів гриба, який широко використовується як для харчування, так і як джерело лікарських речовин, залишається відкритим.

Метою роботи є дослідження впливу екзо- та ендометаболітів гриба на проростання насіння та кореневу меристему ячменю.

Матеріали і методи дослідження

У дослідженні використовували штам лікарського макроміцета *Lentinus edodes* (Berk) Singer ONU F401. Оцінювали вплив екзо- (культуральна рідина) та ендометаболітів (сік) на генетичний апарат рослинного тест об'єкту, у якості якого було обрано сорт озимого ячменю-дворучки Росава, створений у

Селекційно-генетичному інституті – національному центрі насіннєзнавства і сортовивчення [8].

Для оцінки дії екзометаболітів використовували культуральну рідину, що була отримана за глибинного культивування макроміцета. Культивування здійснювали за стандартною методикою на рідкому пивному суслі (8° Бал., рН = 6,0) [1].

Дію внутрішніх метаболітів досліджували використовуючи грибний сік, який отримували шляхом механічного подрібнення плодових тіл гриба. З отриманої біомаси вичавлювали сік, який піддавався стерилізації шляхом ультрафільтрації з використанням каолінових свічок Шамберлана з розміром пір 0,12 мкм [11].

Насіння ячменю пророщували на фільтрувальному папері у чашках Петрі у термостаті при +26 °С з додаванням культуральної рідини, або соку з плодових тіл у порівнянні з пророщуванням у воді (контроль). Враховували енергію проростання (3-тя доба пророщування) і схожість насіння (7-ма доба пророщування) [7]. Вплив гриба на кореневу меристему оцінювали за допомогою анафазного тесту [4]. Статистичне опрацювання результатів досліджень виконували за допомогою критерію Стьюдента. Енергію проростання і схожість насіння оцінювали за формулами для даних альтернативної мінливості [12].

Результати дослідження та їх обговорення

За пророщування насіння ячменю з додаванням культурального середовища достовірно зменшувалася як енергія проростання, та і схожість насіння (табл. 1). Пророщування насіння з додаванням соку плодових тіл не впливало на енергію проростання та схожість насіння.

Таблиця 1

Енергія проростання і схожість насіння ячменю Росава за дії екзо- та ендометаболітів шії-таке (n=100)

Варіант досліджу	Енергія проростання, % ($\bar{x} \pm s_p$)	Схожість, % ($\bar{x} \pm s_p$)
Контроль	96±2,0	96±2,0
Культуральна рідина	85±3,6**	88±3,0*
Сік з плодових тіл	96±2,0	96±2,0

Примітка: * – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,05$

** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,01$

Причина зниження енергії проростання та схожості насіння може бути пояснена тим, що, як було встановлено іншими авторами, в культурі шії-таке на 5-ту добу культивування спостерігається високий рівень продукції похідних індолу [5, 13]. Визначені речовини являються ауксинами, обробка коріння якими звичайно інгібує їх ріст.

Вивчення клітин кореневої меристеми ячменю показало наявність як нормальних анафаз мітозу (рис. 1а), так і певної кількості клітин з аномальними поділами. Серед аномалій мітозу на стадії анафази спостерігалися клітини з відставанням хромосом, клітини з мостами (рис. 1б), та клітини з фрагментами. Різко нерівного розподілу хромосом і багатополюсних мітозів не спостерігалося. Слід зазначити, що певна кількість клітин з аномальними поділами присутня навіть і у контролі (табл. 2), що свідчить про наявність природних мутацій. Однак у варіанті досліду з використанням молодшої культури гриба спостерігалося достовірно збільшення клітин з аномальними поділами.

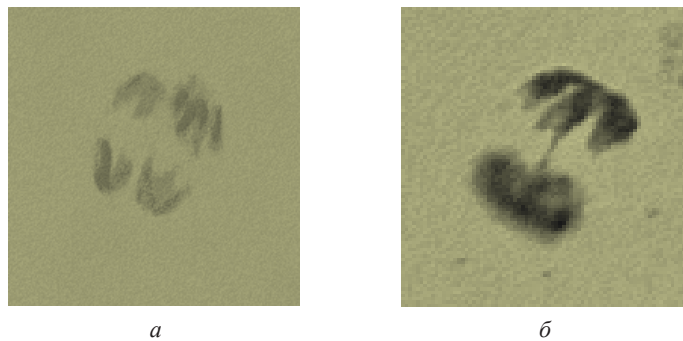


Рис. 1. Анафаза в клітині кореневої меристеми ячменю:
а) нормальна; б) з мостом. Окуляр $\times 40$, об'єктив $\times 10$.

Таблиця 2

Частота (%) нормальних та аномальних анафаз мітозу в кореневій меристемі паростків ячменю Росава за дії екзо- та ендометаболітів шії-таке

Варіант досліду	Кількість досліджених клітин	Анафази			
		нормальні	з відставанням хромосом	з мостами	з фрагментами
Контроль	225	93,3 \pm 1,7	4,0 \pm 1,3	2,2 \pm 1,0	0,4 \pm 0,4
Культуральна рідина	216	75,0 \pm 2,9	10,5 \pm 2,1**	11,6 \pm 2,2***	3,2 \pm 1,2*
Сік з плодових тіл	256	94,1 \pm 1,5	1,9 \pm 0,9	2,7 \pm 1,0	1,2 \pm 0,7

Примітка: * – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,05$

** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,01$

*** – відмінності від контролю достовірні при $p \leq 0,001$

У варіанті досліду з використанням соку плодових тіл достовірних відмінностей від контролю не спостерігалося (табл. 2). Отже, у культуральній рідині гриба містяться речовини, які мають генотоксичний ефект. Втім, у сформованих плодових тілах вони відсутні. В літературі наводяться відомості, що ба-

зидіоміцети мають різноманітні біологічно активні метаболіти вуглеводної, ліпідної та білкової природи, а саме: терпеноїди, стероїди, алкалоїди, 7 фенольних сполук [10] *L. edodes* притаманні протипухлинні, противірусні та імуномодулювальні властивості, що забезпечуються головним чином глікогенами, такими як полісахариди (лентинан), глюкани та гетероглюкани, вільні цукри (манноза, трегалоза, манітол, гліцерол, арабітол, арабіноза) [14]. Біохімічний аналіз біополімерів клітин гриба показав наявність специфічних білків, які мають функціональну активність, що характерна лише до певних фаз розвитку гриба [2, 3]. Крім того, шії-таке відноситься до деструкторів деревини і саме у фазі активного розвитку міцелію може містити речовини, що виділяються назовні, які здатні не лише руйнувати деревину, але й мати генотоксичну дію. Всупереч численним повідомленням про антипухлинну дію шії-таке є відомості про посилення токсичної дії 1,2-диметилгідразину за його тривалого введення разом з шії-таке [6]. За введення максимальної дози водної суспензії гриба (376 мг/кг) спостерігалася тенденція до зниження як кількості тварин з пухлинами, так і коефіцієнту множинності пухлин, однак зниження цих показників відбувалося насамперед за рахунок зниження кількості доброякісних пухлин [6], а саме зі злоякісними пухлинами пов'язують суттєві перебудови геному, які можливо виявити цитогенетичними методами, доброякісні пухлини пов'язують лише з генними мутаціями [19].

Таким чином, сік з плодів тіл гриба шії-таке не проявляє мутагенної активності, в той час як культуральна рідина з міцеліальної стадії гриба проявила певний ступінь генотоксичності. З'ясування того, з якими речовинами це пов'язано, потребує подальших досліджень, однак вже тепер зрозуміло, що плодів тіла варто ретельно відділяти від міцелію.

Висновки

1. Рідина з молоді культури гриба шії-таке, що містила екзометаболіти гриба, достовірно зменшувала енергію проростання і схожість насіння, а також достовірно збільшувала кількість клітин з аномальними анафазами.

2. Сік з плодів тіл гриба шії-таке, тобто ендометаболіти макроміцета, негативних ефектів не проявив.

Список використаної літератури

1. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – Киев: Наукова думка, 1988. – 176 с.
2. Ветчинкина Е. П. Изучение компонентного состава белков различных морфологических структур культивируемого ксилотрофного базидиомицета *Lentinusedodes* / Е. П. Ветчинкина, В. Е. Никитина // Успехи медицинской микологии. Том IX. Глава 6. – М.: Нац. Акад. Микол., 2007. – С. 232–235.
3. Ветчинкина Е. П. Характеристика белков, специфичных для генеративных стадий развития ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing / Е. П. Ветчинкина, Н. Ю. Селиванов, В. Е. Никитина // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Материалы V Всероссийской конференции молодых ученых. 28 сентября – 1 октября 2010 г. Саратов. – С. 22. <http://ibppm.ru>

4. Гостимский С. А. Практикум по цитогенетике / С. А. Гостимский, М. И. Дьякова, Е. В. Ивановская. – М.: Изд-во МГУ, 1974. – 172 с.
5. Гэлстон А. Жизнь зеленого растения / А. Гэлстон, П. Девис, Р. Сэттер. – М.: Мир, 1983. – 552 с.
6. Дерягина В. П. Экспериментальное изучение действия *Lentinus edodes* (Шиитаке) на рост опухоли у мышей на моделях трансплантационного и химического канцерогенеза / В. П. Дерягина, Н. И. Рыжова, А. Н. Разин // Российский онкологический журнал. – 2009. – № 1. – С. 33–38.
7. ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – Київ: Держстандарт України, 2003. – 173 с.
8. Каталог сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту. – Одеса, 2011. – 128 с.
9. Кузнецов О. Ю. Антимикробная активность и стабильность сока гриба шиитаке (*Lentinus edodes*) при длительном хранении / О. Ю. Кузнецов, Е. В. Милькова, А. Е. Соснина, Е. В. Баландцева // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2010. – Т. 15, № 3. – С. 19–23
10. Ли Ю. Лекарственные грибы в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях / Ю. Ли, Тулигуэл, Х. Бао и др.; (под общ. ред. В. А. Сысуева); НИИ с.-х. Северо-Востока. – Киров: О-Краткое, 2009. – 319 с.
11. Муравьев И. А. Технология лекарственных форм: Учебник / И. А. Муравьев – М.: Медицина, 1988. – 480 с.
12. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Высшая школа, 1973. – 319 с.
13. Щерба В. В. Соединения индольной природы в культуральной жидкости и глубинном мицелии съедобных и лекарственных грибов / В. В. Щерба, Т. А. Пучкова, О. В. Осадчая // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Сб. научн. тр. Том 3. – Минск: Бераруская навука, 2011. – С. 111–118.
14. Bisen P. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities / P. S. Bisen, R. K. Baghel, B. S. Sanodiya, G. S. Thakur // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – 17. – P. 2419-2430.
15. Kurashige S. Effects of *Lentinus edodes* administration on cancer outbreak / S. Kurashige, Y. Akuzawa, F. Endo // Immunopharmacology and Immunotoxicology. – 1997. – V. 19, № 2. – P. 175–183.
16. Mason D. J. Determination of naturally-occurring formaldehyde in raw and cooked Shiitake mushrooms by spectrophotometry and liquid chromatography-mass spectrometry / D. J. Mason, M. D. Sykes, S. W. Panton, E. H. Rippon // Food additives and contaminants. – 2004. – Vol. 21, № 11. – P. 1071–1082.
17. Suzuki H. Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) / H. Suzuki, K. Iryama, O. Yoshida // Agric. Biol. Chemistry. – 1990. – Vol. 54, № 2. – P. 479–487.
18. Von Wright A. Mutagenicity of some edible mushrooms in the Ames test / A. Wright von, J. Knuutinen, S. Lindroth // Food chem. Toxicol. – 1982. – Vol. 20, № 3. – P. 265–268.
19. Weng K. L. Exome sequencing identifies highly recurrent *MED12* somatic mutations in breast fibroadenoma / Weng Khong Lim, Choon Kiat Ong, Jing Tan // Nature Genetics. – 2014. – Vol. 46, № 8. – P. 877–880.
20. Yamamoto Y. Immunopotentiative activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM – extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia / Y. Yamamoto, H. Shirono, K. Kono, Y. Ohahi // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1997. – Vol. 61, № 11. – P. 1909–1912.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2016

А. Л. Сечняк, С. Л. Мирось

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: sechnyak@ukr.net,

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗО- И ЭНДОМЕТАБОЛИТОВ ШИИ-ТАКЕ В КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЕ ЯЧМЕНЯ

Резюме

Исследовали влияние культуральной жидкости гриба шии-таке и сока из его плодовых тел на прорастание семян ячменя и регулярность митоза в корневой системе проростков. Культуральная жидкость шии-таке достоверно уменьшила энергию прорастания и всхожесть семян, а также достоверно увеличивала частоту аномальных анафаз в клетках корневой меристемы. Сок из плодовых тел негативных эффектов не проявил.

Ключевые слова: шии-таке, *Lentinus edodes*, культуральная жидкость, анафазный тест, ячмень.

A. L. Sechnyak, S. L. Miros

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: s.l.miros@onu.edu.ua

THE CYTOGENETIC EFFECTS OF SHII-TAKE EXO- AND ENDOMETABOLITES IN THE ROOT MERISTEM OF BARLEY

Abstract

Aim: The detection of shii-take exo- and endometabolites influence on the germination of barley seeds and mitosis in the root system of seedlings. **Materials and methods:** the strain of medicinal basidiomycetes *Lentinus edodes* (Berk) Singer ONU F401 was used in the investigation. The culture liquid for getting exometabolites and the juice from the fruit body for obtaining endometabolites were used. The influence of both liquids was studied on the barley seedling by estimation of seed germination and anaphase test. **Results:** The exometabolites from culture liquid significantly reduced vigor, seed germination and significantly increased the frequency of abnormal anaphase in root meristem cells compared with the control variant while the endometabolites from juice of Shii-take fruit bodies did not show any effects.

Conclusions: The culture fluid of Shii-take has the genotoxic effect: reduced vigor, seed germination and violated the mitotic cell division. In case of juice from the fruit bodies the adverse effects were not manifested.

Keywords: Shii-take, *Lentinus edodes*, culture fluid, anaphase test, barley.

References

1. Buhalo AS (1988) Higher edible Basidiomycetes in pure culture [Vyisshie s'edobnyie bazidiomitsetyi v chistoy culture], Kiev: Naukova dumka, 176 p.
2. Vetchinkina EP, Vetchinkina EP, Nikitina VE (2007) "The study of the component composition of the proteins of different morphological structures of cultivated xylophilic basidiomycetes *Lentinus edodes*" ["Izuchenie komponentnogo sostava belkov razlichnykh morfologicheskikh struktur kultiviruемого ksilotrofnogo bazidiomitseta *Lentinus edodes*"] Uspehi meditsinskoj mikologii, Tom IX, Glava 6, pp 232-235.
3. Vetchinkina EP, Selivanov NYu, Nikitina VE (2010) "Characterization of proteins specific to generative stages of xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) Sing development" ["Harakteristika belkov, spetsifichnykh dlya generativnykh stadij razvitiya ksilotrofnogo bazidiomitseta *Lentinus edodes* (Berk.) Sing"] Strategiya vzaimodeystviya mikroorganizmov i rasteniy s okruzhayushey sredoy: Materialy V Vserossiyskoj konferentsii molodykh uchenykh. 28 sentyabrya – 1 oktyabrya, Saratov, pp 22.
4. Gostimskiy SA, Dyakova MI, Ivanovskaya EV (1974) "Workshop on cytogenetics" ["Praktikum po tsitogenetike"] M.: Izd-vo MGU, 172 p.
5. Gelston A, Devis P, Setter R (1983) "Life of a green plant" ["Zhizn' zelenogo rasteniya"], M.: Mir, 552 p.
6. Deryagina VP, Ryzhova NI, Razin AN (2009) "Experimental study of the action of *Lentinus edodes* (Shiitake) on tumor growth in mouse models of transplantation and chemical carcinogenesis" ["Eksperimental'noe izuchenie dejstviya *Lentinus edodes* (Shiitake) na rost opuxoli u myshej na modelyax transplantacionnogo i ximicheskogo kancerogeneza"] Rossijskij onkologicheskij zhurnal, No 1, pp 33-38.
7. DSTU 4138-2002. (2003) "Seeds of agricultural crops. Methods for determining quality" ["Nasinnia silskohospodarskykh kultur. Metody vyznachennia yakosti"] Kyiv: Derzhstandart Ukrainy, p 173.
8. "Product varieties and hybrids Selection and Genetics Institute" ["Kataloh sortiv ta hibrydiv Seleksiino-henetychnoho instytutu"] Odesa, 2011, 128 p.
9. Kuznecov OYu, Mil'kova EV, Sosnina AE, Balanceva EV. (2010) "Antimicrobial activity and stability of the juice shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during prolonged storage" ["Antimikrobnaya aktivnost' i stabil'nost' soka griba shiitake (*Lentinus edodes*) pri dlitel'nom xranenii"] Vestnik Ivanovskoj medicinskoj akademii, T. 15, No3, pp.19-23.
10. Li Yu, Tuliguel X, Bao i dr.; (2009) Medicinal mushroom in traditional Chinese medicine and modern biotechnology In editor: Sysuev VA ["Lekarstvenny'e griby' v tradicionnoj kitajskoj medicine i sovremenny'x bioteknologiyax"] NII s.-x. Severo-Vostoka, Kirov: O-Kratkoe, 319 p.
11. Muravev I.A. (1988) The technology of medicinal forms [Tehnologiya lekarstvennykh form: Uchebnik], M.: Meditsina, p. 480.
12. Rokickij PF (1973) Biological statistics [Biologicheskaya statistika], Minsk: Vy'she'jshaya shkola, 319 p.
13. Shherba VV, Puchkova TA, Osadchaya OV (2011) Compounds of the indole of nature in the culture fluid and submerged mycelium of edible and medicinal mushrooms [Soedineniya indolnoy prirody v kulturalnoy zhidkosti i glubinnom mitselii s'edobnykh i lekarstvennykh gribov], Sb.nauchn. tr. Tom 3, Minsk: Beraruskaya navuka, pp. 111-118.
14. Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS (2010) *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities, Current Medicinal Chemistry, Vol. 17, pp. 2419-2430.
15. Kurashige S, Akuzawa YF (1997) Endo effects of *Lentinus edodes* administration on cancer outbreak, Immunopharmacology and Immunotoxicology, Vol. 19, No 2, p. 175-183.
16. Mason DJ, Sykes MD, Pantan SW, Rippon EH (2004) Determination of naturally-occurring formaldehyde in raw and cooked Shiitake mushrooms by spectrophotometry and liquid chromatography-mass spectrometry, Food additives and contaminants, Vol. 21, No11, p. 1071-1082.
17. Suzuki H., Iryama K., Yoshida O. (1990) Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) Agric. Biol. Chemistry, Vol. 54, No 2, pp 479-487.
18. Von Wright A, Knuutinen J, Lindroth S (1982) Mutagenicity of some edible mushrooms in the Ames test, Food chem. Toxicol., Vol. 20, No 3, pp 265-268.
19. Weng KL, Choon KO, Jing T (2014) Exome sequencing identifies highly recurrent *MED12* somatic mutations in breast fibroadenoma, Nature Genetics, Vol. 46, No 8, pp 877-880.
20. Yamamoto Y, Shirono H, Kono K, Ohahi Y (1997) Immunopotentive activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM – extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Vol. 61, No 11, pp 1909-1912.