О.Б. МИХАЙЛОВА, А.С. БУХАЛО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01001, Україна
abuch@botany.kiev.ua

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРЕДСТАВНИКІВ *MORCHELLACEAE* (*ASCOMYCETES*) НА АГАРИЗОВАНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Ключові слова: Morchella, Disciotis, *агаризовані живильні середовища, радіальний ріст, колонія, морфологія, склероції*

Представники родини *Morchellaceae* (Ascomycetes), або морелі, які цінуються за високі смакові якості, специфічний аромат та лікувальні властивості, в ряді країн, передусім на американському континенті, є об'єктом культивування для одержання як плодових тіл, так і міцеліальної маси [13, 15, 17]. Морелі містять до 25 % білка, всі вітаміни групи В, а також незамінні амінокислоти, необхідні для харчування людини, зокрема ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін та валін [16, 18]. Вживання *Morchella esculenta* (L.) Pers., *M. conica* Pers. та *M. deliciosa* Fr. тонізує функціонування кишкового тракту, регулює життєву енергію, зменшує запалення [3, 12, 18], а культуральна рідина після вирощування міцелію морелей виявляє протипухлинну дію до саркоми 180, аденокарценоми 755 та лейкемії L-1210 [14]. Duncan [10, 11] повідомляє, що високомолекулярний полісахарид — галактоманан, який входить до складу плодових тіл *M. esculenta*, є активним у лікуванні мієлогенної лейкемії людини, а екстракти плодових тіл *M. esculenta* та *M. elata* виявляють значний імуностимулюючий ефект.

Проте в Європі ці надзвичайно цінні гриби досі не культивуються, що можна пояснити їх недостатньою дослідженістю в умовах культури. Штучне культивування представників родини *Morchellaceae* включає вирощування чистих культур на агаризованих середовищах і потребує знання їхніх фізіологічних та морфологічних особливостей у вегетативній стадії росту. Зокрема, не з'ясовано, за яких умов у культурі утворюються склероції, пов'язані з плодоношенням морелей. Усі ці майже не досліджені аспекти біології морелевих грибів потребують наукового обґрунтування для розробки ефективних методів їх культивування, зокрема в Україні.

Нашою метою було вивчення культурально-морфологічних та ростових характеристик штамів різних видів родини *Morchellaceae*, які трапляються на території України, визначення сприятливих умов їх вирощування і підтримання у чистій культурі на агаризованих живильних середовищах різного

© О.Б. МИХАЙЛОВА, А.С. БУХАЛО, 2005

складу, а також відбір штамів для подальших досліджень, спрямованих на біотехнологічне застосування цієї групи грибів.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження були 4 види (15 штамів) родини *Morchellaceae* з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК): *Disciotis venosa* Boud. — шт. 1741; *Morchella conica* Pers. — шт. 1737, 1738, 1739; *M. esculenta* (L.) Pers. — шт. 1744, 1746, 1747, 1749, 1750, 1753, 1755, 1805, 1820; *M. semilibera* (DC) Lév. (= *Mitrophora semilibera* (DC) Lév.) — шт. 1740 [2].

Ріст і морфологію всіх культур досліджували на чотирьох живильних агаризованих середовищах: мальц-екстракт агарі (МЕА), картопляно-декстрозному агарі (КДА), агарі Чапека (ЧА), компостному агарі (КА) [4] та середовищі, рекомендованому для утворення склероціїв — вівсяно-мальц-дріжджовому агарі (ВМДА) [15]. Кислотність середовищ доводили до значення 6,5—7,0 за допомогою розчинів 1 N KOH та 1 N HCl.

Дослідження проводили на чашках Петрі діаметром 90 мм у трикратній повторності. Як інокулюм використовували агарові диски (діаметром 6 мм) з міцелієм гриба, вирізані порожнистою стерильною трубкою з ростучого краю 7-добової культури на КДА. Диски інокулювали на агаризоване середовище в середину чашки Петрі та інкубували при температурі 26 °С протягом 30 діб. Щодобово вимірювали радіус та висоту колонії у мм, щільність колонії визначали за трибальною шкалою (1— розріджена, 2 — середня, 3 — щільна). За одержаними параметрами розраховували середні значення лінійної швидкості росту (V_R) [5] та визначали показник росту колонії (ПРК), що є удосконаленням ростового коефіцієнта (РК), який ми використовували у попередніх роботах [1]. Визначаючи ПРК, враховували: h — висоту колонії (мм); g — її щільність (бали); t — вік колонії (доби); показник d (діаметр колонії), замінений на S — площу колонії (мм^2), отже, $\text{ПРК} = \frac{S \times h \times g}{t}$. ПРК коректніше, порівняно з РК, характеризує ріст, тобто накопичення маси міцелію на агаризованих середовищах.

Статистичну обробку даних виконано з використанням програми Microsoft Excel.

На кожному середовищі у процесі росту описували морфологію колонії (забарвлення, текстуру, край, реверзум). Вегетативний міцелій досліджували у світловому мікроскопі МБИ-15.

Результати досліджень та їх обговорення

Ми виявляли варіабельність морфологічних характеристик колоній на живильних середовищах різного складу (рисунки 1, 2). З описів, наведених у табл. 1, можна дійти висновку, що у досліджених видів утворювалися два основні морфологічні типи колоній: 1 — щільні, шерстисті, з добре розвиненим повітряним міцелієм, без склероціїв; 2 — розріджені, павутинисті, з великою кількістю склероціїв.

Таблиця 1. **Морфологічна характеристика колоній досліджених видів на агаризованих живильних середовищах різного складу**

Вид	Морфологічна характеристика колонії на агаризованих середовищах			
	МЕА	КДА	ЧА	ВМДА
Morchella esculenta	колонії щільні, шерстисті, з короткими сплутаними повітряними гіфами, в молодому віці білі, згодом ніжно-кремового кольору, без склероціїв, край рівний, притиснутий до субстрату, реверзум кремовий	колонії щільні, шерстисті, в центрі з коротким сплутаним повітряним міцелієм, світло-коричневого кольору, по краю колонії поодинокі склероції, край рівний, реверзум світло-коричневий	колонії розріджені, павутинисті, білі, з часом набувають коричневого кольору, дрібні склероції численні, по всій колонії, край рівний, реверзум темно-коричневий	колонії дуже розріджені, павутинисті, прозорі, з численними склероціями, особливо по краю колонії; склероції з часом утворюють скупчення 1—3 см, край рівний, реверзум темно-коричневий
M. conica	колонії середньої щільності, повстисті, білі, з часом набувають сіруватого відтінку, поодинокі склероції у невеликій кількості, край рівний, притиснутий до субстрату, реверзум світло-кремовий	колонії борошнисто-повстяні, білі, з часом коричневого кольору, склероції дрібні по всій поверхні колонії, край притиснутий до субстрату, реверзум пісочний	колонії павутинисті, розріджені, склероції численні, спочатку білі, з часом яскраво-жовті, зливаються, утворюючи скупчення до 1-3 см, край рівний, притиснутий до субстрату, реверзум світло-кремовий	колонії щільні, повстяні зі сплутаним повітряним міцелієм, без склероціїв, у молодому віці білі, з часом сіро-білого кольору; край рівний, реверзум світло-кремовий
M. semilibera	колонії розріджені, прозорі, у молодому віці білі, з часом світло-коричневі, склероції відсутні, край нерівний, притиснутий до субстрату, реверзум коричневого кольору	колонії розріджені, білі, з часом коричневі, склероції відсутні, край нерівний, притиснутий до субстрату, реверзум коричневий	колонії розріджені, прозорі, світло-коричневі, склероції нечисленні, поодинокі, край нерівний, притиснутий до субстрату, реверзум коричневий	колонії дуже розріджені, прозорі, притиснуті до субстрату, білі, з часом коричневі, склероції відсутні, край нерівний, притиснутий до субстрату, реверзум темно-коричневий
Disciotis venosa	колонії дуже розріджені, прозорі, кремового кольору, з невеликою кількістю поодиноких склероціїв у центрі колонії, край рівний, реверзум світло-коричневий	колонії щільні, повстисті, в молодому віці білі, з часом кремові, склероції відсутні, край нерівний, притиснутий до субстрату, реверзум світло-кремовий	колонії щільні, повстисті, кремового кольору, склероції відсутні, край рівний, притиснутий до субстрату, реверзум світло-коричневий	колонії розріджені, повстисті, склероції відсутні, край нерівний, притиснутий до субстрату, реверзум світло-кремовий

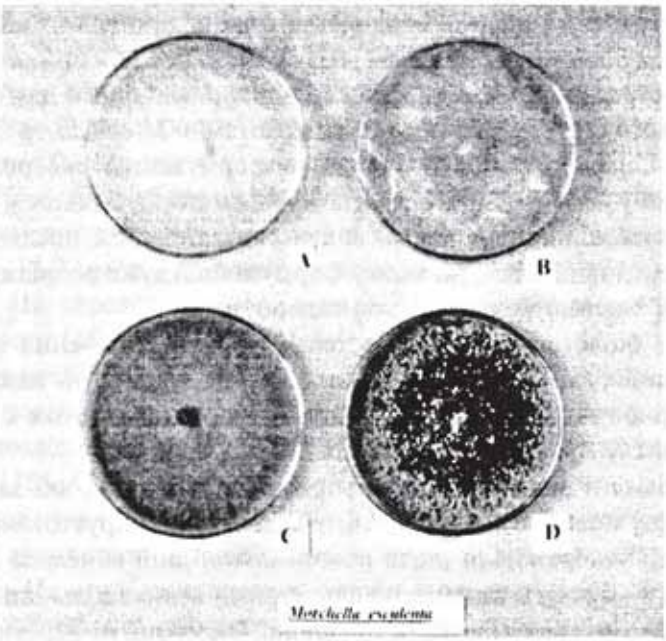

Рис. 1. *Morchella esculenta* (L.) Pers. Колонії на живильних агаризованих середовищах (14 діб). Тут і на рисунках 2—4: A — МЕА, B— КДА, C— ЧА, D — ВМДА

Fig. 1. *Morchella esculenta* (L.) Pers. Mycelial colonies on agar media (14 days). Here and on the fig. 2—4: A — malt extract agar, B — potato-dextrose agar, C — Czapek's agar, D — oatmeal-malt-yeast agar

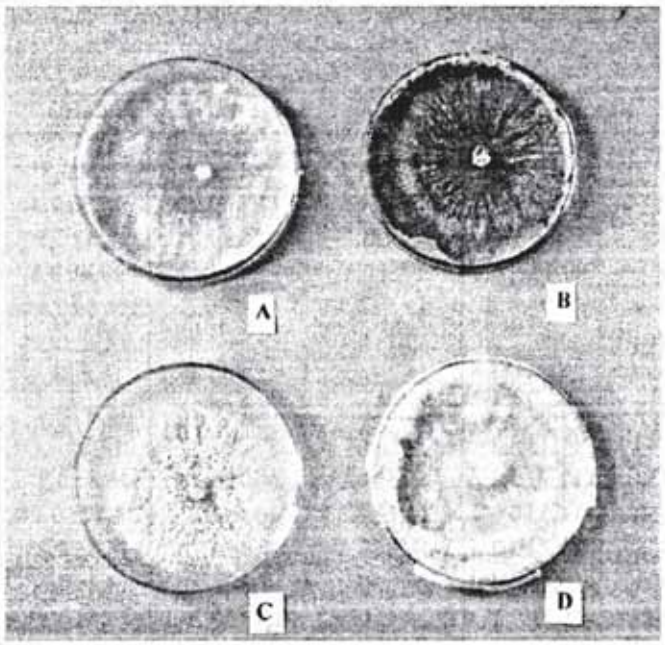

Рис. 2. *M. conica* Pers. Колонії на живильних агаризованих середовищах (14 діб)

Fig. 2. *M. conica* Pers. Mycelial colonies on agar media (14 days)

Середовище МЕА сприяло утворенню найбільш щільних колоній з добре розвиненим повітряним міцелієм і без склероціїв у *M. esculenta* та *M. conica*. Мінеральне середовище ЧА виявилося найсприятливішим для формування колоній другого типу в усіх досліджених штамів *M. conica* та 70 % штамів *M. esculenta*. Середовище ВМДА сприяло формуванню склероціїв по всій площі колоній у 80 % досліджених штамів *M. esculenta*, а також у *M. semilibera* та *D. venosa*. Найменш придатним для культивування всіх досліджених видів виявилося середовище КА, на якому формувалися дуже розріджені, павутинисті колонії з невеликою кількістю склероціїв.

Однією з біологічних особливостей морелей є утворення в життєвому циклі склероціїв, які, на думку деяких авторів, відіграють важливу роль у виживанні гриба за несприятливих екологічних умов, а також є необхідною стадією розвитку при утворенні плодових тіл [7, 8].

Усі досліджені види в культурі формували склероції, які за класифікацією Buscot [6] можна віднести до типу EES (ранні інкрустовані склероції). Такі склероції утворюються після повної колонізації міцелієм живильного середовища (3—4 доба). Одночасно формується велика кількість склероціїв, особливо багато по краю міцеліальної колонії. Склероції не перевищують 0,2—0,5 мм у діаметрі, деякі зливаються між собою та швидко змінюють колір з білого на темно-коричневий. Склероції другого типу LIS (пізні ізольовані), які досягають 5—8 мм у діаметрі, є нечисленними, рівномірно розташову-

Таблиця 2. **Швидкість радіального росту колоній досліджених штамів на різних агаризованих живильних середовищах**

Вид, штам	Середовище / швидкість лінійного росту, V_R, мм/добу				
	МЕА	КДА	ЧА	ВМДА	КА
D. venosa 1741	2,5±0,9*	5,5±0,3	5,2±0,2	2,3±0,3*	3,8±0,1
M. conica 1737	15,2±0,2	14,1±0,1	17,1±0,2*	15,9±0,4	12,7±0,4*
M. conica 1738	8,0±0,3	6,6±0,1	12,5±0,6*	8,3±0,5	7,4±0,1*
M. conica 1739	8,4±0,7	6,2±0,6	13,2±0,2*	10,4±0,8	9,7±0,1*
M. esculenta 1744	15,7±0,5	15,5±0,1	13,9±0,2	11,6±0,4*	6,1±0,2*
M. esculenta 1746	13,5±0,4	13,1±0,4	18,7±0,3*	14,2±0,1*	11,5±0,1*
M. esculenta 1747	13,4±0,1	18,2±0,1	17,3±0,4*	10,6±0,5	6,1±0,2
M. esculenta 1748	12,5±0,2	11,8±0,8	18,7±0,7*	15,4±0,4*	9,8±0,3*
M. esculenta 1749	17,1±0,3	9,1±0,4	13,7±0,4	12,8±0,1	9,7±0,3*
M. esculenta 1750	12,7±0,5	15,5±0,1	14,0±0,2*	18,8±0,3*	11,7±0,1
M. esculenta 1753	14,3±0,9	13,1±0,7	13,6±0,3	11,87±0,2*	10,5±0,5*
M. esculenta 1755	15,3±0,2	10,6±0,5	17,9±0,7*	15,8±0,3*	11,5±0,3*
M. esculenta 1805	15,8±0,4	14,2±0,2	18,2±0,3*	18,1±0,1*	11,2±0,2
M. esculenta 1820	15,7±0,1	17,5±0,5	17,7±0,3*	14,5±0,4*	10,2±0,5*
M. semilibera 1740	1,5±0,2	3,3±0,4	3,0±0,3*	8,3±0,2*	2,3±0,3

Примітка: « * » — утворювалися склероції.

ються по всій поверхні колонії і залишаються відокремленими, ми не спостерігали.

В усіх досліджених видів ми фіксували склероції тільки першого типу.

Для характеристики росту колоній використовували такі показники, як швидкість радіального росту та показник росту колонії (ПРК). Більше половини (60 %) всіх досліджених культур найбільшу швидкість радіального росту мали на синтетичному середовищі ЧА (табл. 2). Найвищими показниками (18,2—18,7 мм/добу) характеризувалися штами 1746, 1748, 1805 *M. esculenta*. На середовищах МЕА та КДА була повільнішою радіальна швидкість росту (15,8—13,5 мм/добу).

Morchella semilibera та *D. venosa* на всіх досліджених середовищах відзначалися дуже повільним радіальним ростом — не більше 8,3 мм/добу (табл. 2).

На всіх досліджених середовищах з найбільшою швидкістю ростуть штами *M. esculenta* 1755, 1805, 1820 та *M. conica* 1737.

Універсальним механізмом вегетативного росту є апікальне подовження гіфи та її галуження, що відбувається за умови вирощування на целофановій плівці. На агарі спостерігається ріст у трьох напрямках. Проте при розрахунках радіальної швидкості росту на агаризованому середовищі не враховуються галуження гіф, структура та щільність колонії [9]. Тому крім радіальної швидкості росту, ми визначали показник росту колонії (ПРК), який враховує ці параметри.

За величиною ПРК досліджені штами розподілилися так: найбільші значення ПРК — у *M. conica* шт. 1737 та *M. esculenta* шт. 1749, 1755, 1805, 1820;

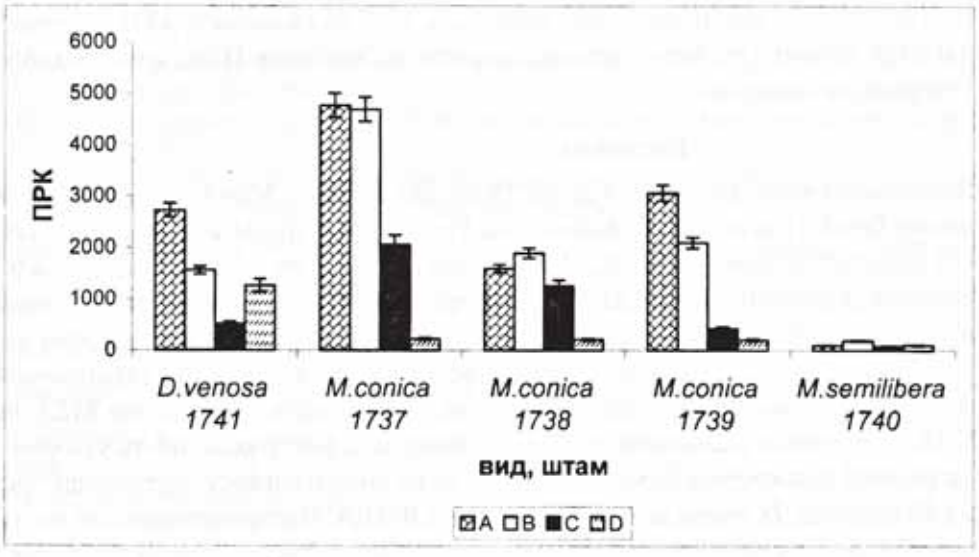

Рис. 3. Ріст колоній *M. conica* Pers., *M. semilibera* (DC) Lév. та *Disciotis venosa* Boud. на агаризованих живильних середовищах

Fig. 3. The colony growth of *M. conica* Pers., *M. semilibera* (DC) Lév., and *Disciotis venosa* Boud. on agar nutritional media

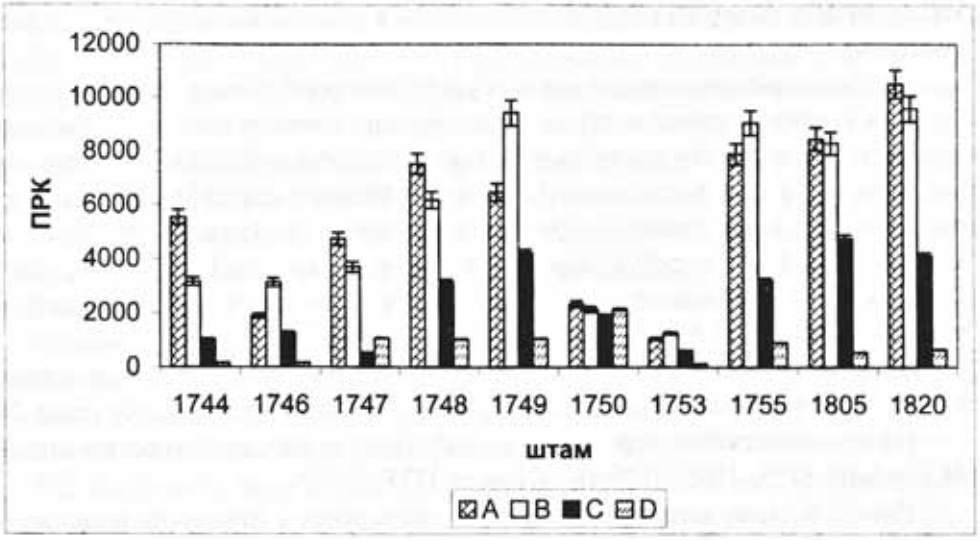

Рис. 4. Ріст колоній *M. esculenta* (L.) Pers. на агаризованих живильних середовищах
Fig. 4. The colony growth of *M. esculenta* (L.) Pers. on agar nutritional media

середні значення ПРК мали деякі штами *M. esculenta* (1747, 1748, 1744), а також *M. conica* шт. 1739. Найнижчі значення ПРК зафіксовано у *M. semilibera* шт. 1740, *D. venosa* шт. 1741, а також у деяких штамів *M. esculenta* (1746, 1750, 1753) та *M. conica* шт. 1738 (рисунки 3, 4).

Таким чином, для міцеліального росту найсприятливішими були МЕА та КДА середовища, для утворення склероціїв — ВМДА та ЧА. Для подальших досліджень відібрано штами 1805, 1820, 1755 *M. esculenta* та 1737 *M. conica*, які мали найвищі радіальну швидкість росту та значення ПРК, а також добре утворювали склероції.

Висновки

Досліджено чисті культури 4 видів 15 штамів родини *Morchellaceae*: *Disciotis venosa* Boud. (1 штам), *Morchella conica* Pers. (3 штами), *M. esculenta* (L.) Pers. (10 штамів), *M. semilibera* (DC) Lév. (1 штам) на чотирьох агаризованих живильних середовищах і показано, що склад живильного середовища впливає на ріст і морфологію міцеліальних колоній досліджених видів, зокрема на утворення склероціїв. Найкращими середовищами для росту вегетативного міцелію *M. conica* та *M. esculenta* виявилися комплексні середовища МЕА та КДА. У *M. conica* найбільша радіальна швидкість росту колоній та утворення великої кількості склероціїв відзначено на синтетичному середовищі ЧА, а у *M. esculenta, D. venosa* та *M. semilibera* — на ВМДА. Несприятливим для росту колоній та утворення склероціїв усіх досліджених видів був компостний агар.

Для подальших досліджень відібрано штами 1805, 1820, 1755 *M. esculenta* та штам 1737 *M. conica*, які мали найвищі значення радіальної швидкості росту та показника росту колонії і добре утворювали склероції.

1. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. И.А. Дудка. — Киев: Наук. думка, 1988. — 144 с.
2. *Бухало А.С., Митропольская Н.Ю.* Каталог культур (*Basidiomycotina*) / АН Украины. Ин-т ботаники. — Препр. — Киев, 2001. — 60 с.
3. *Денисова Н.П.* Лечебные свойства грибов: Этномикологический очерк. — С.-Пб.: Изд-во С.-Пб. ГМУ, 1998. — 59 с.
4. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
5. *Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Чоловська О.В.* Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу // Укр. ботан. журн. — 2000. — **57**, № 2. — С. 119—126.
6. *Buscot F.* Mycelial differentiatin of *Morchella esculenta* in pure culture // Mycol. Res. — 1993. — **97**, № 2. — P. 136—140.
7. *Buscot F., Bernillon J.* Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta* // Mycol. Res. — 1991. — **95**, № 4. — P. 752—754.
8. *Buscot F., Roux J.* Association between living roots and ascocarps of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier // Transactions of the British Mycol. Soc. — 1987. — **89**, № 3. — P. 249—252.
9. *Chang S., Miles P.G.* Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmentel impact. — London; New York; Washington: CRC Press, 2004. — 450 p.
10. *Duncan J.G.* Isolation of Galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *M. esculenta* // J. Agric. Food Chem. — 2002. — **50**, № 6. — P. 5683—5685.
11. *Duncan J.G., Cibula W., Ross S.* Survery of Souheast North American and Growing Macromycetes (Higher Basidiomycetes and Ascomycetes) spophores for Biological Activity // Int. J. Med. Mushr. — 2003. — **5**. — P. 169—178.
12. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. — Santa Cruz: Botan. Press, 1996. — 251 p.
13. *Ower R., Mills G.L., Malachowski J.A.* Cultivation of *Morchella*. — 1986. — U.S. Patent 4.594.809.
14. *Semerdžieva M., Veselský J.* Léčivé houby dřive a nyní. — Praha: Academia, 1986. — 177 p.
15. *Stamets P.* Growing gourment and medicinal mushrooms. — Hong Kong: Ten Speed Press, 2000. — 574 p.
16. *The biology* and cultivation of edible Mushrooms / Eds. S.T. Chang, W.A. Hayes. — New York; London: Acad. Press, 1978. — 819 p.
17. *Volk T.J., Leonard T.* Cytology of the life cycle of Morchella // Mycol. Res. — 1990. — **96**. — P. 399—406
18. *Ying J., Mao X., Ma Q., Zong Y., Wen H.* Icones of medicinal fungi from China / Translated by X. Yuehan. — Beijing: Science Press, 1987. — 575 p.

Рекомендує до друку
І.О. Дудка

Надійшла 02.02.2005

О.Б. Михайлова, А.С. Бухало

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *MORCHELLACEAE* (*ASCOMYCETES*) НА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Исследовали рост и культуральные особенности 15 штаммов 4 видов семейства *Morchellaceae* (*Disciotis venosa, Morchella conica, M. esculenta, M. semilibera*) на четырех агаризованных питательных средах. Для роста мицелия всех видов наиболее благоприятными были комплексные среды: мальц-экстракт агар и картофельно-декстрозный агар, об-

разованию склероциев способствовал овсяно-мальц-дрожжевой агар. Наименее пригодным для роста исследованных культур был компостный агар. Морфологические характеристики колоний зависели от состава питательных сред. У исследованных штаммов были различными как скорость радиального роста, так и показатель роста колоний. Наилучшие показатели роста колоний отмечены у шт. 1748, 1755, 1805, 1820 *M. esculenta* на мальц-экстракт агаре и картофельно-декстрозном агаре. Наибольшей скоростью радиального роста характеризовались штаммы 1748, 1755, 1805, 1820 *M. esculenta* и 1737 *M. conica*, которые отобрали для дальнейших исследований.

O.B. Mykchaylova, A.S. Buchalo

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF MORELS PURE CULTURES (*MORCHELLACEAE, ASCOMYCETES*) ON AGAR NUTRITIONAL MEDIA

Growth and morphologic characteristics (15 strains) of morels *Disciotis venosa, Morchella conica, M. esculenta, M. semilibera* were investigated on 4 agar nutritional media. For the speed of radial mycelial growth complex agar media malt extract and potato dextrose were the best. For sclerotia formation oatmeal yeast agar was the most favorable. The less suitable for mycelial growth of morels cultures was compost agar. The morphology of mycelial colonies varied and was depended on the nutritional media content. Fast growing strains of *M. esculenta* (1748, 1755, 1805, 1820) and *M. conica* (1737) were selected for the future investigations.