



УКРАЇНА

(19) UA (11) 36013 (13) A

(51) 6 A01G1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ПРОРОСТАННЯ СПОР ВИЩОГО БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *HERICIUM ERINACEUS*

(21) 99105730

(22) 20.10.1999

(24) 16.04.2001

(33) UA

(46) 16.04.2001, Бюл. № 3, 2001 р.

(72) Поєдинок Наталія Леонідівна, Бухало Ася  
Сергіївна, Потьомкіна Жанна В'ячеславівна

(73) Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, Інститут фізики Національної академії наук України

(57) Спосіб активації проростання спор вищого базидіального гриба *Hericium erinaceus* оснований на впливі лазерного випромінювання на базидіоспори, який **відрізняється** тим, що обробку ведуть в червоній частині спектра в дозах від 45 до 230 мДж/см<sup>2</sup>.

Винахід належить до біотехнології, і, зокрема, до способу стимуляції проростання базидіоспор при отриманні чистих міцеліальних моноспорових культур із спорового порошку.

Відомий спосіб отримання чистих міцеліальних моноспорових культур з базидіоспор на сусло-агаровому середовищі (пивне сусло 8°C по Бал-лингу, агар-агар 2%, вода 1л, рН 7) при 26-28°C. Посів базидіоспор виробляли в чашки Петрі у вигляді однорідної суспензії з відомою концентрацією спор (див.: Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. та ін. Вищі їстівні базидіальні гриби в поверхневій та глибинній культурі. — К.: Наук. думка, 1983).

Недоліком цього способу є те, що успіх проростання спор залежить від правильного підбору концентрації спор, яка підбирається для кожного виду і інколи для кожного плодового тіла.

Відомий спосіб виділення гіменомицетів із базидіоспор на чашках Петрі з мальц-жстракт агаром і доданням 6 ppm хлорамфеніколу при охолодженні (див.: Н. Kreisel, F. Shcauer, Cristav Fischer Verlag. Methoden des mykologischen Laboratoriums. Stuttgart, New York. 1987.)

Недоліком вищезгаданих методів є те, що таким чином базидіоспори не всіх видів можуть бути доведені до проростання

Відомі засоби активації проростання базидіоспор базидіальних макроміцетів в період спокою тепловою обробкою (спори виду *Agaricus* інкубують при t° не менше 28°C), додаванням активованого вугілля або дріжджів *Rhodotorula* в живильне середовище (більше ектомікоризні, гіменомицети і гастероміцети) (див.: Там же).

Недоліком цих методів є їх ефективність по відношенню тільки до спор, які знаходяться в стані

спокою, а також обмеженням застосуванням тільки до видів роду *Agaricus*. Базидіоспори представників родів *Hericium*, *Hydrocybe*, *Camatophyllus* вищезазначеними засобами не були доведені до проростання.

Відомий різноманітний вплив різноманітних джерел світла на зростання плодоношення і спороношення у окремих видів грибів. Одним видом для спороношення необхідне світло, у інших світло гнобить спороношення, треті нормально спороносять і в темряві і на світлі. Різні спектри і різна довжина хвилі стимулює або гнобить ту чи іншу фазу розвитку (вегетативне зростання, плодоношення та ін.) або впливає на будь-які фізіологобіохімічні показники (пігментування, біохімічна активність і т. і.) (див.: Жданова Н.І., Василевська А.І. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. — К.: Наук. думка, 1982). Відомі факти, що свідчать про стимулюючу дію УФ-променів (джерело — лазер ЛГИ-21) на урожайність штамів печериці двоспорової (див.: Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. і ін. Вищі їстівні базидіоміцети в поверхневій та глибинній культурі. — К.: Наук. думка, 1983). Міцелій гриба інокулювали на живильна середовище (сусло-агар) в кварцові пробірки і поміщали на 3 доби в термостат, де підтримувалася температура на рівні 24-25°C. На 4-у добу колонії гриба, які досягали 1-2 мм в діаметрі, опромінювали, використовуючи експозиції 10 с, 1 і 5 хв. Стимулююча дія лазерного випромінювання зростала із збільшенням щільності енергії випромінювання в межах від 0,16 до 4,80 Дж/см. При опроміненні міцелію вешенки звичайної γ променями (5-10 крад) спостерігали деяке збільшення урожайності плодових тіл (див.: Rygava et al. *Wiv ozareni*

(19) UA (11) 36013 (13) A

mycelia nf vynosí hlívy ustricne, Pest. Zamh., 1975, 13, № 1, p. 85-86.)

Недоліком цього способу маємо вважати наступне. УФ-випромінювання є одним із видів електромагнітних випромінювань по довжині хвилі, що розташоване між видимим світлом і рентгеновськими променями. Збудження атомів в макромолекулах при УФ-випромінюванні робить їх високореакційноздатними і викликає різноманітні фотохімічні реакції. Найважливішою з них є димеризація піримідинів. Це супроводжується розірванням водневих зв'язків між ланками ДНК навпроти димера та локальною денатурацією дволанкової молекули ДНК, що приводить до зміни її конфігурації. Іонізація атомів, що входять до складу макромолекули ДНК, під впливом у променів дає поштовх до проходження різноманітних радіаційно-хімічних реакцій, що ведуть до змін їх макромолекул. Як наслідок цих процесів - виникнення небажаних мутацій і зникнення корисних ознак та поява небажаних (див.: Захаров І.А., Ковальцова С.В., Кожина Т.Н. і ін. Мутаційний процес у грибів. - Наука, 1980).

Відомі способи стимулювання зростання дріжджів і *E. coli* шляхом впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання у видимій ділянці спектру (He-Ne лазер 632,8 нм). Величина ефекту стимуляції залежить також і від інтенсивності світла даної довжини хвилі (див.: Кару Т.І. Про молекулярний механізм терапевтичної дії випромінювання низькоінтенсивного лазерного світла: Доп. Акад. Наук. - 1986. - Т. 291. - № 5. - С. 1245-49).

Однак до теперішнього часу не вивчена дія випромінювання низькоінтенсивного лазерного світла на зростання і розвиток базидіоміцетів.

В основу винаходу способу стимуляції проростання базидіоспор при отриманні чистих міцеліальних моноспорових культур із спорового порошку *Hericium erinaceus* поставлена задача активації проростання спор впливом лазерного випромінювання (He-Ne лазер) в червоній частині спектру в дозах від 45 до 230 мДж/см<sup>2</sup>, в результаті чого забезпечується збільшення кількості пророслих спор у 10-10<sup>6</sup> разів у різних штамів, скорочуються терміни проростання, збільшується швидкість зростання моноспорових культур, що значно спрощує їх виділення в чисту культуру і подальшу селекційну роботу з ними.

Поставлена задача вирішується шляхом впливу лазерного випромінювання на споровий порошок штамів He-2, He-6 і He-13, які поміщені в стерильні, без кришок чашки Петрі, в дозах 45, 230 і 650 мДж/см<sup>2</sup>. Шляхом серії розведень готували водні спорові суспензії однакової концентрації для всіх штамів і висівали їх на сусло-агар рівномірно розподіляючи шпателем по всій поверхні середовища. Інкубували в темряві при температурі 26°C. Кількість пророслих спор визначали мікроскопіюванням. Окремо пророслі спори, що лежать разом з кусочком агару, ізолювали на пробірки з сусло-агаром. Вирослі міцеліальні культури аналізували на наявність пряхок і каріотичність міцелію. Забарвлення ядер проводилося за методикою Гимза (див.: Дудка І.А., Вассер С.П., Элланская І.А. и др.

Методы экспериментальной микологии. - К.: Наук. думка, 1982. - 550 с.) У монокаріотичних культур вивчалася динаміка зростання. Як контрольні, брали моноспорові культури, отримані аналогічним способом із спор, що не були піддані впливу лазерного випромінювання.

На фігурі показана динаміка росту моноспорових культур *Hericium erinaceus*.

Суть винаходу пояснюється прикладами.

Приклади застосування лазерного випромінювання для поліпшення проростання спор

Лазерним випромінюванням в дозах 45, 230, 650 мДж/см<sup>2</sup> впливали на споровий порошок штамів He-2, He-6 і He-13, як сказано вище. Відсоток проростання спор визначали як відношення пророслих спор до загального числа посіяних спор. Мікроскопіювання і підрахунок пророслих спор здійснювали кожні 24 години.

Подані в табл. 1 результати показують, що лазерне випромінювання в дозах від 45 до 230 мДж/см<sup>2</sup> здатне активізувати процес проростання базидіоспор в 10 раз у штама He-13, в 100 раз у He-6 і в 10 у He-2, причому лазерна обробка тим ефективніша, чим нижчі вхідний відсоток проростання спор.

Приклади застосування лазерного випромінювання для скорочення термінів проростання базидіоспор

Дослідження проводили вищезазначеним способом. Проростання спор контролювали кожні 12 годин. Отримані результати (табл. 2) дозволяють стверджувати, що лазерне випромінювання скорочує терміни проростання спор з 7 до 3-х діб.

Приклади виділення чистих моноспорових культур і застосування лазерного випромінювання для стимуляції їхнього зростання.

Обробку базидіоспор лазерним випромінюванням проводили вищезазначеним в прикладі 1 способом. Готували водну суспензію спор із розрахунку 100 спор на 1 мл і розподіляли її рівномірно на поверхні агаризованого середовища в чашках Петрі (100 спор на чашку). Інкубували в темряві при 26°C 14 діб. Пророслі спори ізолювали на окремі пробірки із сусло-агаром. У вирослих міцеліальних культур контролювали каріотичність міцелію вищезазначеними способами. Динаміку зростання моноспорових ізолятів вивчали на сусло-агарі. В центр чашки Петрі із середовищем поміщали диск агаризованого середовища (діаметр 3 мм) з міцелієм культури, що досліджується. Діаметр вирослих колоній-вимірювали кожні 2 доби. Як можна побачити з наведених на фігурі даних, лазерне випромінювання стимулювало зростання моноспорових культур майже в 3 рази.

Наведені в прикладах показники застосування лазерного випромінювання для активації базидіоспор *Hericium erinaceus* при виділенні моноспорових ізолятів, показують, що лазерне випромінювання в червоному спектрі в дозах 45-230 мДж/см<sup>2</sup> скорочує терміни проростання спор базидіоспор, значно збільшує відсоток їх проростання і стимулює зростання моноспорових культур.

Таблиця 1

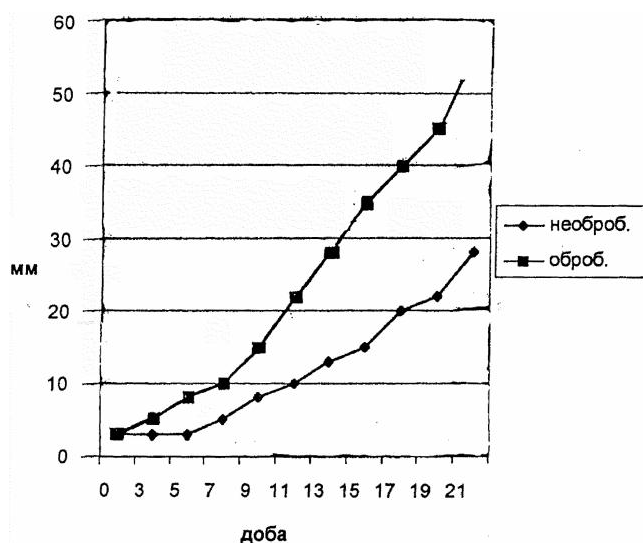
Вплив лазерного випромінювання (червоний спектр) на проростання базидіоспор *Heřicium eřipaseus*

Штам	% проростання базидіоспор							
	Через 72 години				Через 96 години			
	Без опромінення	45 мДж/см <sup>2</sup>	230 мДж/см <sup>2</sup>	650 мДж/см <sup>2</sup>	Без опромінення	45 мДж/см <sup>1</sup>	230 мДж/см <sup>2</sup>	650 мДж/см <sup>2</sup>
He2	0	1,6	8,6	0	$0,9 \cdot 10^{-6}$	2,75	11,42	0
He6	0	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$6,6 \cdot 10^{-6}$	0	$0,6 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0
He13	9,6	13	36	0	13,6	82	98	0

Таблиця 2

Вплив лазерного випромінювання на терміни проростання базидіоспор *Heřicium eřipaseus*

Доза опромінення, мДж/см <sup>2</sup>	Доба						Поява повітряного міцелію (доба)
	3	5	7	9	12	14	
Контроль	відсотки						10
0	0	0	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	
45	1,6	2,8	4,5	4,8			7
230	8,3	13,0	13,3	13,3			7
650	0	0	0	0	0	0	



Фіг.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
 Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
 (044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2001 р. Формат 60x84 1/8.  
 Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
 (044) 268-25-22