

УДК: 582.284:547.458:54.053:632.953

ГЛІКАНИ ВИЩОГО БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *Ganoderma adpersum* (Schulzer) Donk: ОТРИМАННЯ ТА АНТИФІТОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ

О. Г. Коваленко¹
О. М. Поліщук¹
С. П. Вассер²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

²Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

E-mail: udajko@ukr.net

На прикладі трьох штамів *Ganoderma adpersum*, виділених у Грузії, Китаї та Ізраїлі, показано здатність вищих грибів продукувати глікани, які є активними інгібіторами фітовірусної інфекції. Активні антивірусні препарати глікану з міцелію гриба можна отримати водною, кислотною та лужною екстракцією. Встановлено здатність глікану *G. adpersum* активувати захисні механізми рослин і пригнічувати інфекційну та репродуктивну активність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). Стійкість тютюну до ВТМ-інфекції під впливом глікану формується *de novo* за участю транскрипції РНК на матриці клітинної ДНК, чутливої до дії специфічного інгібітору цього процесу актиноміцину Д. Крім того, виявлено здатність полісахариду пригнічувати репродукцію ВТМ за системної вірусної інфекції.

Ключові слова: *Basidiomycetes*, *Ganoderma adpersum*, глікани, антивірусна активність, вірус тютюнової мозаїки, вірусостійкість рослин, актиноміцин Д, *Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium*.

Вищі гриби порядку *Basidiomycota* з давніх-давен використовують у народній медицині як лікарські засоби від багатьох захворювань. Особливо широкого вжитку ще за середньовіччя вони набули в народній медицині Сходу. Згадки про цілющі властивості базидіальних грибів у Європі та Північній Америці належать до пізньої доби, а вивчення їх як потенціальних джерел фармакологічних та медичних препаратів розпочалося лише нещодавно [1]. Вже перші дослідження показали, що базидіальні гриби є невичерпним джерелом речовин, які мають лікувальні властивості щодо численних захворювань [2, 3]. Серед лікарських речовин з грибів *Basidiomycetes* передусім заслуговують на увагу глікани та комплекси їх з протейновими компонентами — пептидоглікани та глікопротеїни, які мають різну хімічну будову й різні типи біологічної активності [4–6]. Встановлено, що ці біополімери та інші сполуки не лише здатні захищати хазяїна від дії негативних чинників навколишнього середовища [7, 8], але й можуть позитивно впливати на організми людини і тварин завдяки їхнім імуномодулювальним, антивірусним, антибактеріальним та протипухлинним властивостям, а також

здатності підтримувати загальний гомеостаз організму [9–11].

Хімічна природа і структурні особливості вуглеводвмісних біологічно активних препаратів із вищих грибів залежать від різних чинників, зокрема від виду та штаму продуцента, умов живлення, способів екстракції тощо. Вищі базидіоміцети і, зокрема, гриби роду *Ganoderma* продукують біологічно активні розгалужені глікани, що містять у головному ланцюзі (1→3)-, а в бокових відгалуженнях — (1→4)- та (1→6)-зв'язані β-D-глюкопіранозильні одиниці [3–6]. Саме з β(1→3)-глікозидними зв'язками, молекулярною масою та ступенем розгалуженості полісахаридного ланцюга асоціюють протипухлинні та інші біологічні властивості грибних гліканів [12].

З літератури відомо, що глікани, продуковані деякими бактеріями, мікроскопічними грибами та дріжджами, мають антифитовірусну активність [13, 14]. Однак, стосовно активності вуглеводвмісних полімерів вищих грибів щодо вірусів рослин в літературі є лише поодинокі роботи. Зокрема, показано, що глікопротеїн, який має лектинову активність, виділений із плодівих тіл *Agrocybe aegerita*, може пригнічувати розвиток вірусної інфекції шляхом порушення

процесу проникнення вірусних часток у клітину [15], а екзоцелюлярний глюкуроноксиломанан *Tremella mesenterica* здатен індукувати розвиток вірусостійкості у рослин, активуючи клітинний синтез *de novo* [16]. Окрім того, відомо, що сумарні полісахаридні препарати з культуральної рідини *Ganoderma lucidum* та *G. applanatum* також мають помірну антивірусну активність у рослинах тютюну [17].

Оскільки останні види виявляли лише незначну активність щодо продукування інгібіторів вірусів, метою нашої роботи було випробувати інші види грибів роду *Ganoderma* як продуценти антивірусних гліканів, зокрема *G. adspersum*. Йдеться про виділення, часткове очищення та дослідження антивірусної активності полісахаридів з міцелію даного виду.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень: три штами *G. adspersum* (П, 844 та 1259, культури Хайфського університету, Ізраїль), виділені з біоценозів Грузії, Китаю та Ізраїлю, вірус тютюнової мозаїки (ВТМ, штам U₁) як тест-вірус, рослини надчутливого до ВТМ сорту тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) Імунний 580 та його сприйнятливий мутант, який унаслідок культивування і регенерації *in vitro* втратив N-ген надчутливості, а отже, й здатність до локалізації вірусної інфекції [18]. На перших етапах досліджень як тест-рослини використовували надчутливі рослини дурману (*Datura stramonium* L.), які слугували також індикаторами інфекційності вірусу під час вивчення впливу глікану на репродукцію ВТМ у тканинах тютюну. Рослини вирощували у вегетаційному будиночку за природних умов освітлення, вологості та температури. У дослід залучали рослини у віці 4–6 справжніх листків.

Отримання препаратів глікану. В роботі було використано міцелій *G. adspersum*, вирощений за глибинного культивування на синтетичному середовищі такого складу (г/л): глюкоза — 15; пептон — 2,5; дріжджовий екстракт — 3; KH_2PO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; Na_2HPO_4 — 0,2; рН 5,5.

Принципи методики одержання препаратів глікану були такими, як і при отриманні $\beta(1\rightarrow3)\text{-}\beta(1\rightarrow6)\text{-}$ глюкану («ганодерану») з інших видів *Ganoderma sp.* [19]. Неочищені полісахаридні препарати одержували з ліофілізованого міцелію гриба водною, лужною та кислотною екстракцією.

Водна екстракція. Для отримання «водного екстракту» глікану спочатку із сировини видаляли низькомолекулярні сполуки. Для цього до сухого міцелію гриба *G. adspersum*, ретельно подрібненого у фарфоровій ступці в присутності карборунду, додавали 85% -й розчин етанолу (1:5, в/о) і кип'ятили впродовж 3 год. Процедуру екстракції спиртом повторювали тричі. Щоразу осад відокремлювали центрифугуванням (7 000 г, 15–20 хв) та використовували у подальшій роботі. Для отримання «водної» фракції глікану до звільненого від низькомолекулярних сполук гомогенату міцелію додавали воду (1:5) і кип'ятили протягом 3 год. Процедуру повторювали 5 разів. Екстракт відділяли від нерозчинних решток центрифугуванням (7 000 г, 15–20 хв) та об'єднували. Отриманий екстракт піддавали діалізу проти проточної та дистильованої води, потім упарювали до мінімального об'єму на роторному випарювачі. До концентрату додавали 1/5 об'єму суміші ізоамілового спирту та хлороформу (1:10), суміш інтенсивно струшували протягом 10 хв, центрифугували (7 000 г, 20 хв) для розділення фаз. Стадію депротейнізації екстракту в такий самий спосіб повторювали ще раз, екстракти об'єднували та висушували в сублімаційній сушарці.

Лужна екстракція. Для отримання «лужної» фракції глікану до 1/2 частини нерозчинного осаду, що залишився після водної екстракції, додавали суміш 5% -го розчину NaOH та 0,05% -го розчину NaBH_4 (1:5, в/о) і кип'ятили впродовж 5 год. Процедуру повторювали двічі. Реакцію одержаного екстракту доводили до рН 4,0 додаванням концентрованої HCl. При цьому утворювалась максимальна кількість осаду. Преципітат відділяли центрифугуванням (7 000 г, 30 хв), а центрифугат піддавали діалізу проти проточної та дистильованої води і проводили додаткове очищення від протейнових домішок, подібно до «водної» фракції. Очищений екстракт упарювали до 1/5 попереднього об'єму, а далі висушували в сублімаційній сушарці.

Кислотна екстракція. Для отримання «кислотної» фракції глікану до 1/2 частини нерозчинного осаду, що утворювався за водної екстракції, додавали 0,01М H_2SO_4 і кип'ятили протягом 4 год. Процедуру повторювали двічі. Екстракти збирали після центрифугування (7 000 г, 20 хв) і піддавали діалізу проти проточної та дистильованої води; подальшу обробку препарату проводили в той самий спосіб, що й у разі отримання лужного екстракту.

Вихід препаратів визначали ваговим методом.

Для перевірки антивірусної активності отриманих препаратів їхні водні розчини у різних концентраціях (1–2 000 мкг/мл) додавали до суспензії ВТМ (4 мкг/мл), інкубували 30 хв та інокулювали ліві половинки листків, а праві — інфікували вірусом у тій самій концентрації без полісахариду.

Ступінь пригнічення вірусної інфекції визначали, враховуючи кількість некрозів на дослідній і контрольній половинках листків, за формулою:

$$I = (1 - D/K) \times 100\%,$$

де I — відсоток інгібування некротичних уражень (некрозів);

D — середнє значення кількості некрозів у досліді;

K — те ж саме в контролі.

Дослідження протівірусних властивостей глікану проводили на рослинах тютюну сорту Імунний 580 за методами, описаними нами раніше [9]. Водні розчини глікану в концентрації 500 мкг/мл вводили субепідермально за допомогою інсулінового шприца в ліві половинки листків, а через 1, 3, 5 та 7 діб інфікували ВТМ. У праві половинки, які були контролем, вводили воду. Ступінь захисту або індукованої вірусостійкості (ІВС) вираховували за формулою, наведеною вище.

Для вивчення механізму індукованої гліканом стійкості застосовували антибіотик актиноміцин Д (АМД) як специфічний інгібітор ДНК-залежної РНК-полімерази. АМД (10 мкг/мл) вводили в міжклітинний простір одночасно з полісахаридом або через 2 доби після цього.

Для вивчення впливу глікану на репродукцію ВТМ використовували ізольовані листові диски або листя мутанту тютюну (*N. tabacum*) сорту Імунний 580, дефіцитного за N-геном надчутливості [18]. Препарат вводили субепідермально до та після інокуляції вірусом з інтервалом 30 і 60 хв. Листові диски або відокремлені від рослин листки інкубували у вологій камері 48 год при 25 °С для накопичення вірусу. Інфекційність вірусу перевіряли на рослинах-індикаторах.

Результати підрахунку некрозів піддавали статистичній обробці за параметричними критеріями різницевого методом [20]. Значущість різниць (відношень) середніх даних (*p*) у таблицях виражали символами: +++: $p \leq 0,1\%$; ++: $0,1\% < p \leq 1\%$; +: $1\% < p \leq 5\%$; 0: $p > 5\%$.

Результати та обговорення

Білий гнильний гриб *G. adspersum* спричиняє серцевинну гниль буків, беріз та інших листових порід і поширений переважно у тропічній та субтропічній ґрунтово-кліматичних зонах світу (рис. 1).



Рис. 1. Плодові тіла та спорангії гриба *G. adspersum*, що росте на березі [http://www.floralimages.co.uk]

Цей гриб можна культивувати на штучних живильних середовищах з утворенням міцелію, який легко сепарують та використовують як сировинний матеріал для отримання біологічно активних гліканів [5]. Від хімічної будови біополімерів залежить їхня біологічна, у тому числі й антивірусна, активність. Ці властивості глікополімерів зумовлені також штамовими особливостями продуцентів та умовами їх культивування. Для виявлення найбільш активних продуцентів антифітовірусних речовин у популяції *G. adspersum* нами спочатку було проведено дослідження трьох штамів цього виду гриба, виділених із різних біоценозів (Грузії, Китаю та Ізраїлю). Критеріями відбору продуцентів слугували вихід препаратів глікану та здатність їх пригнічувати розвиток ВТМ-інфекції у надчутливих рослинах.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що всі штами *G. adspersum* майже однаковою мірою здатні продукувати полісахариди, що можуть активно інгібувати інфекційність ВТМ *in vitro* (таблиця). Серед вилучених препаратів найактивнішим щодо ВТМ виявився препарат, отриманий водною екстракцією. Здатність пригнічувати вірусну інфекцію на 50% і більше у нього спостерігається, як правило, вже у концентрації 1 мкг/мл, а на 90% і вище — у концентрації 10–100 мкг/мл та дещо збільшується

ся з її підвищенням. Інші препарати також мали високий рівень інгібувальної активності, проте він був нижчим порівняно з препаратами, отриманими водною фракцією. Особливо це стосується «лужного» препара-

ту. Можливо, у процесі лужної та кислотної обробки полісахариду порушується його структура або ж водою із сировинного матеріалу вилучаються компоненти, більш активні щодо ВТМ.

Активність штамів *Ganoderma adpersum* як продуцентів гліканів, здатних пригнічувати інфекційність ВТМ на листках *D. stramonium*

Штам гриба	Препарат	Концентрація, мкг/мл	Кількість некрозів / лист		Пригнічення, %
			Дослід	Контроль	
1	2	3	4	5	6
II	Водний	1	2,5	5,2	51 ⁺⁺⁺
		10	2,1	6,3	67 ⁺⁺⁺
		100	2,3	10,4	78 ⁺⁺⁺
		500	0,4	9,8	96 ⁺⁺⁺
		1000	0,3	9,0	97 ⁺⁺⁺
		2000	0	9,2	100 ⁺⁺⁺
	Кислотний	1	17,8	32,6	45 ⁺⁺⁺
		10	17,4	34,6	50 ⁺
		100	13,8	44,8	69 ⁺⁺⁺
		500	2,8	38,1	93 ⁺⁺⁺
		1000	4,0	37,4	89 ⁺⁺⁺
		2000	3,0	34,7	91 ⁺⁺⁺
	Лужний	1	23,6	38,6	39 ⁺
		10	3,4	8,6	55 ⁺⁺
		100	3,3	11,6	72 ⁺⁺⁺
		500	2,2	8,0	72 ⁺⁺⁺
		1000	1,6	14,9	89 ⁺⁺⁺
		2000	2,2	13,0	83 ⁺⁺⁺
844	Водний	1	8,3	26,0	68 ⁺⁺⁺
		10	8,3	17,9	54 ⁺⁺⁺
		100	0,9	26,1	96 ⁺⁺⁺
		500	0,8	22,7	96 ⁺⁺⁺
		1000	0,9	24,9	96 ⁺⁺⁺
		2000	0,3	28,7	99 ⁺⁺⁺
	Кислотний	1	13,1	29,6	56 ⁺⁺⁺
		10	9,1	24,0	62 ⁺⁺⁺
		100	5,6	21,9	74 ⁺⁺⁺
		500	2,0	38,5	95 ⁺⁺⁺
		1000	0,8	25,5	97 ⁺⁺⁺
		2000	0,2	7,3	97 ⁺⁺⁺
	Лужний	1	26,8	66,3	60 ⁺⁺⁺
		10	17,9	46,5	61 ⁺⁺⁺
		100	17,0	35,3	52 ⁺⁺⁺
		500	11,3	34,8	68 ⁺⁺⁺
		1000	3,8	30,7	88 ⁺⁺⁺
		2000	3,3	17,3	81 ⁺⁺⁺

Продовження таблиці

Штам гриба	Препарат	Концентрація, мкг/мл	Кількість некрозів / лист		Пригнічення, %
			Дослід	Контроль	
1	2	3	4	5	6
1259	Водний	1	9,6	36,8	74 ⁺⁺⁺
		10	5,7	31,9	82 ⁺⁺⁺
		100	0,3	27,3	99 ⁺⁺⁺
		500	2,5	61,6	96 ⁺⁺⁺
		1000	4,1	54,5	92 ⁺⁺⁺
		2000	1,4	37,3	96 ⁺⁺⁺
	Кислотний	1	17,1	23,8	28 ⁰
		10	22,4	33,6	33 ⁺
		100	7,3	27,5	74 ⁺⁺⁺
		500	6,7	26,3	75 ⁺⁺⁺
		1000	4,8	31,1	85 ⁺⁺⁺
		2000	1,4	37,5	96 ⁺⁺⁺
	Лужний	1	26,0	27,8	6 ⁰
		10	36,2	53,7	33 ⁰
		100	11,9	33,1	64 ⁺⁺⁺
		500	17,0	31,3	46 ⁺⁺⁺
		1000	15,3	30,2	50 ⁺⁺
		2000	10,6	57,0	81 ⁺⁺⁺

Примітка: ⁺⁺⁺: $p \leq 0,1\%$; ⁺⁺: $0,1\% < p \leq 1\%$; ⁺: $1\% < p \leq 5\%$; ⁰: $p > 5\%$.

Що стосується виходу препаратів, то він у різних штамів-продуцентів був майже однаковим і становив 8,0–8,5; 11,0–11,5 і 4,0–4,5% за водної, лужної та кислотної екстракції, відповідно.

Для подальших досліджень антифітотвірної активності глікану та вивчення механізмів пригнічення розвитку ВТМ-інфекції на інших моделях нами було обрано препарат, отриманий із міцелію штаму II *G. adspersum* за водної екстракції. Цей препарат мав найвищу активність щодо ВТМ.

Антивірусна дія гліканових препаратів, вилучених з міцелію *G. adspersum*, подібно до інших полісахаридів [12–15], може ґрунтуватись, принаймні на двох імовірних механізмах: 1) активація захисних реакцій рослин, зумовлених генотипом рослини-хазяїна; 2) безпосереднє зниження репродукції чи інфекційної активності вірусу *in vivo*. Для того, щоб перевірити здатність глікану пригнічувати ВТМ-інфекцію за рахунок впливу на природні механізми стійкості, залежні від генотипу рослини [13], нами було досліджено його антивірусну активність на *N. sanderae* та *N. tabacum*. Ці види рослин за реакцією щодо інфекції ВТМ різняться тим, що у першого відсутній N-ген і, отже, механізм локалізації вірусної

інфекції (ЛВІ), хоча первинні некрози на інокульованих рослинах за звичайних умов вирощування рослин утворюються й індукована вірусостійкість (ІВС) розвивається [18].

Нашими дослідженнями було встановлено, що глікан, доданий до вірусного інокулюма в концентрації 500 та 1000 мкг/мл, пригнічував утворення локальних некрозів на 90–98% як у *N. tabacum*, так і в *N. sanderae* (рис. 2). Причому активність препарату суттєво не залежала від його дози.

Отже, ступінь пригнічення інфекційності ВТМ гліканом суттєво не залежить від генотипу хазяїна і, зокрема, від наявності в генотипі N-гена, що детермінує механізм ЛВІ, тобто, останній під впливом даного полісахариду не порушується. Проте на підставі отриманих даних не можна було виключити можливого впливу його на інші захисні механізми рослин, зокрема на формування ІВС, експресія якої не завжди корелює з наявністю механізму ЛВІ [13]. Відсутність такої кореляції показано й у використаних у наших дослідженнях рослинах *N. sanderae* [21]. Крім того, не можна було виключити можливість безпосереднього пригнічення гліканом процесу репродукції ВТМ у тканинах, завдяки чому первинні некротичні ураження, спричинювані ВТМ, на інокульованих

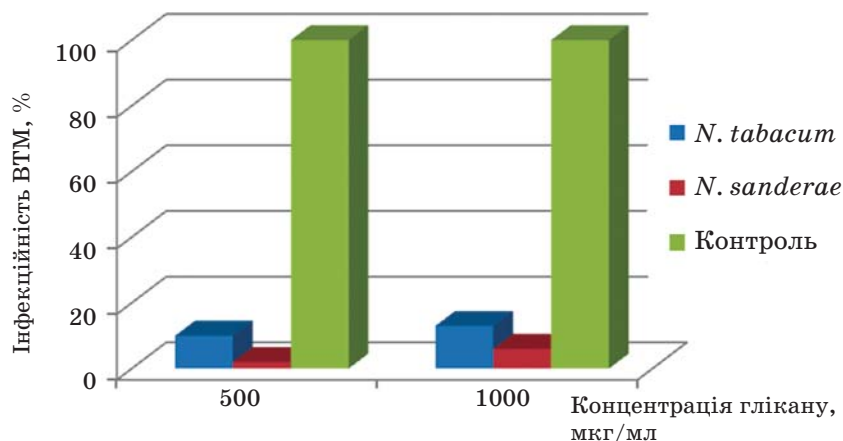


Рис. 2. Активність глікану *G. adspersum* щодо інфекційності ВТМ на рослинах *N. sanderae* та *N. tabacum*

листках не з'являються зовсім. Виходячи із цих міркувань, ми випробували глікан *G. adspersum* як можливий індуктор резистентності у «квазінадчутливих» (*N. sanderae*) і надчутливих (*N. tabacum*, сорт Імунний 580) до ВТМ різновидів тютюну.

Для дослідження індукторних властивостей глікану *G. adspersum* використовували різні концентрації (50, 100, 500 мкг/мл) препарату, екстрагованого з міцелію водою, оскільки цей препарат мав найвищий рівень антивірусної активності *in vitro* (див. табл.). У результаті було встановлено, що оптимальна концентрація даного препарату, яка, за нашими попередніми спостереженнями, також не відзначалась помітною токсичною дією щодо рослинних тканин і мала високу антивірусну активність, становила 500 мкг/мл. У такій концентрації полісахарид індукував 65% стійкості тютюну до наступної інокуляції ВТМ вже через одну добу після введення його в міжклітинний простір листків. Зі збільшенням інтервалу між введен-

ням препарату та інокуляцією індукторна активність дещо знижувалась і на 5-ту добу становила 50%, а на 7-му — 37% (рис. 3).

У процесі випробування індукторних властивостей глікану у рослинах *N. sanderae* було встановлено, що полісахарид в зазначеній концентрації не впливав на формування ІВС у цих рослинах (дані не наведено), хоча, як показано у попередніх дослідях, пригнічував розвиток локальних уражень, спричинених первинною інфекцією ВТМ (рис. 2). Отже, пригнічення вірусної інфекції у даного виду має інший характер.

Застосування інгібітора транскрипції РНК на матриці ДНК — актиноміцину Д (10 мкг/мл) на рослинах тютюну, оброблених гліканом (500 мкг/мл), за одночасного або нарзного (через 2 доби після введення індуктора) введення показало, що індукована полісахаридом стійкість повністю пригнічувалась цим антибіотиком незалежно від часу і способу його використання (рис. 4).

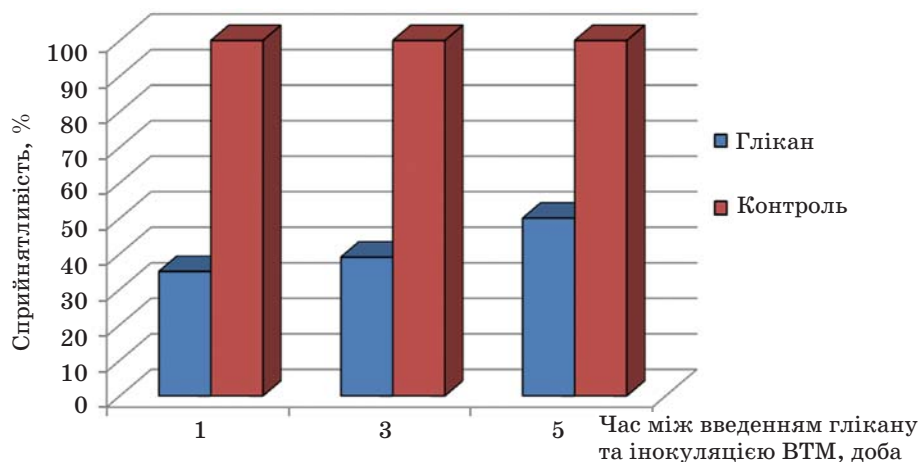


Рис. 3. Вплив глікану *G. adspersum* (500 мкг/мл) на сприйнятливості рослин тютюну сорту Імунний 580 щодо ВТМ

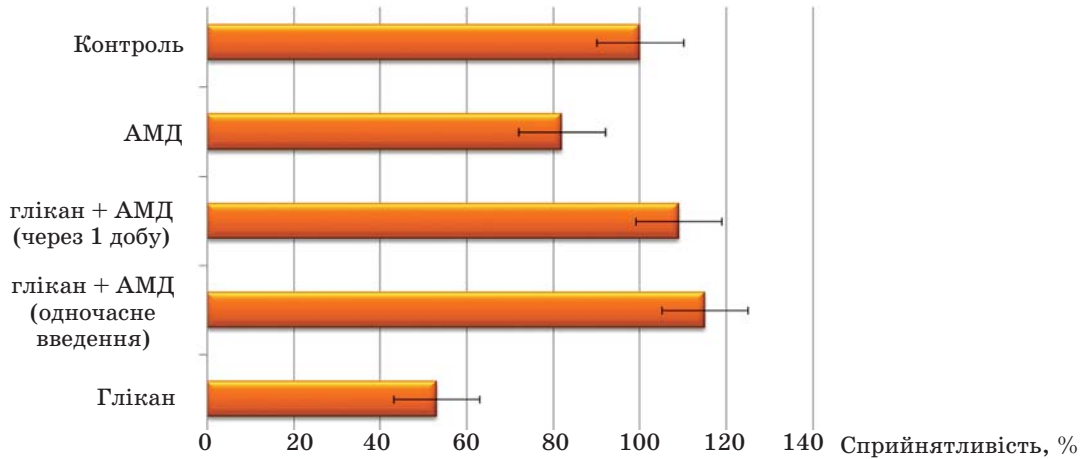


Рис. 4. Вплив АМД на розвиток стійкості рослин тютюну Імунний 580 до ВТМ, індукованої гліканом *G. adspersum*

Отже, одним з механізмів антивірусної дії глікану *G. adspersum* є активація клітинного генома, зокрема процесу транскрипції інформаційної РНК та активації синтезу нових протеїнів у клітині, необхідних для розвитку стійкості рослин до вірусної інфекції [13]. Водночас, пригнічення інфекційної активності ВТМ у чутливому виді *N. sanderae* (рис. 2) могло свідчити про інгібування репродукції вірусу в присутності полісахариду.

Дійсно, дослідження впливу глікану на репродукцію ВТМ у чутливому мутанті тютюну, що реагує на інокуляцію цим вірусом системною інфекцією, оскільки захисні механізми, контрольовані геном N, тут відсутні [18], показало, що даний полісахарид пригнічував вірусну інфекцію у разі введення в листя як до, так і після інокуляції ВТМ (рис. 5). Іншими словами, глікан справляє, очевидно, як профілактичну, так і терапевтичну дію на вірусну інфекцію. Однак слід

зазначити, що активність препарату була де-що вищою при введенні його в рослинні тканини до інокуляції, хоча рівень інгібування вірусу в усіх варіантах різнився неістотно.

Із цих спостережень випливає, що даний полісахарид може порушувати принаймні ранні етапи вірусного інфекційного процесу, які не залежать від надчутливої реакції та пов'язаних з нею захисних механізмів.

Таким чином, нашими дослідженнями встановлено здатність глікану *G. adspersum* активувати захисні механізми надчутливих рослин та пригнічувати розвиток ВТМ-інфекції в тканинах чутливого хазяїна. Тобто він має широкий спектр антивірусної активності, яка реалізується, з одного боку, безпосереднім або опосередкованим пригніченням інфекційності та репродукції вірусу *in vivo*, а з іншого — індукцією захисних реакцій надчутливих рослин *de novo*. Здатність пригнічувати репродукцію та інфекційність

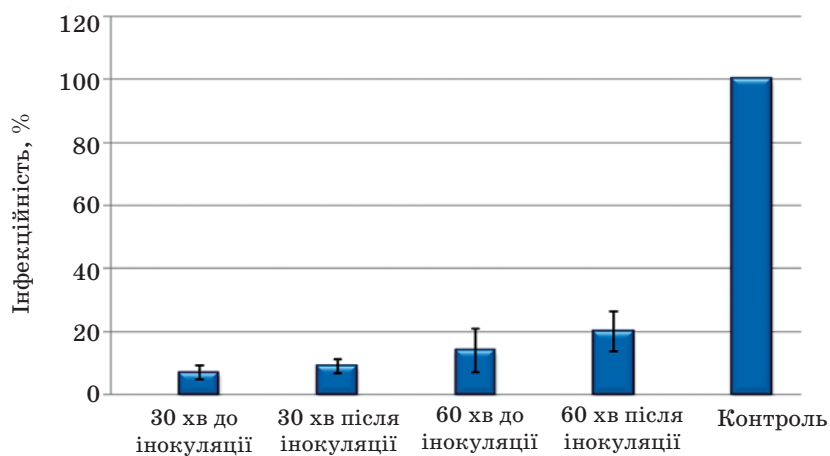


Рис. 5. Вплив глікану *G. adspersum* на репродукцію ВТМ у рослинах мутанту тютюну (сорт Імунний 580), чутливого до цього вірусу

ВТМ може бути зумовлена впливом полісахариду як на процес інфікування чутливих клітин, так і на ранні етапи репродукції вірусу, а саме: на депротейнізацію вірусної РНК та/ або початкові стадії реалізації вірусного генома в клітині хазяїна.

Отримання та виявлення антифітовірусних властивостей глікану, що продукується *Ganoderma adspersum*, є важливим для подальшого вивчення цього полісахариду. Автори мають на меті провести хроматографічне очищення, визначити молекуляр-

но-масові характеристики і моносахаридний склад виділених препаратів, а також дослідити взаємозв'язок між хімічною будовою та противірусною активністю гліканів. Отримані дані загалом можуть мати важливе значення для розроблення біологічно активних препаратів нового покоління для боротьби з інфекційними захворюваннями рослин, тварин та людини різної етіології.

Роботу виконано за фінансової підтримки УНТЦ (проект 4973).

ЛІТЕРАТУРА

1. Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Julich W. The pharmacological potential of mushrooms // eSAM. — 2005. — N 2. — P. 285–299.
2. Даниляк М. І., Решетников С. В. Лікарські гриби. Медичне застосування та проблеми біотехнології. — К., 1996. — 64 с.
3. Ooi V. E. C. Medicinally important fungi // Science and Cultivation of Edible Fungi. — Balkema Publishers, Rotterdam. — 2000. — V. 1. — P. 41–51.
4. Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) // Int. J. Med. Mushrooms. — 1999. — V. 1. — P. 9–29.
5. Wasser S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 60. — P. 258–274.
6. Поліщук О. М., Коваленко О. Г. Біологічна активність глікополімерів базидіальних грибів // Біополімери і клітина. — 2009. — Т. 25, № 3. — С. 181–193.
7. Harris B. Growing wild mushrooms a complete guide to cultivating edible and hallucinogenic mushrooms. — Oakland: Roning publishing, 2003. — 96 p.
8. Андриянова Д. А., Мейчик Н. Р., Николаева Ю. И. и др. Изучение состава функциональных групп клеточной стенки мицелиальных грибов // Иммунопатол., алергол., инфектол. — 2010. — № 1. — С. 14–15.
9. Mizuno T., Saito H., Nishitoba T., Kawagashi H. Antitumor-active substances from mushrooms // Food. Rev. Int. — 1995. — V. 11. — P. 23–61.
10. Wasser S. P., Weis A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives // Int. J. Med. Mushrooms. — 1999. — V. 1. — P. 31–62.
11. Wasser S. P., Didukh M. Y. Mushroom polysaccharides in human health care // Biodiversity of fungi. Their role in human life. — 2005. — Eds. S. K. Deshmukh, M. K. Rai. — P. 289–328.
12. Bohn J. B., BeMiller J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure — functional activity relationships // Carbohydr. Polymers. — 1995. — V. 28. — P. 3–14.
13. Дьяков Ю. Т., Коваленко А. Г. Механизмы устойчивости растений к вирусам и грибам. — М.: ВИНТИ, 1983. — 167 с.
14. Kovalenko A. G., Grabina T. D., Kolesnik L. V. et al. Virus resistance induced with mannan sulfates in hypersensitive host plants // J. Phytopath. — 1993. — V. 137, N 2. — P. 133–147.
15. Hui Sun, Chen Guang Zhao, Xin Tong, Peng Qi. A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from edible mushroom *Agrocybe aegerita* // Biochem. Mol. Biol. — 2003 — V. 36, N 2. — P. 214–222.
16. Kovalenko O. G., Polishchuk O. M., Wasser S. P. Virus resistance induced by glucuronoxylomannan isolated from submerged cultivated yeast-like cell biomass of medicinal yellow brain mushroom *Tremella mesenterica* Ritz.:Fr. (Heterobasidiomycetes) in the hypersensitive host plants // Int. J. Med. Mushrooms. — 2009. — V. 11, N 2. — P. 199–205.
17. Kovalenko O. G., Polishchuk O. M., Krupodорова T. A. et al. Screening of metabolites produced by strains of *Ganoderma lucidum* [Curt.:Fr] P.Karst and *Ganoderma applanatum* [Pirs.:Waller] Pat. for their activity against tobacco mosaic virus // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Біологія. — 2008. — Т. 51. — С. 32–34.
18. Щербатенко І. С., Олещенко Л. Т. Соматоклонна мінливість реакції надчутливості до ВТМ у протоклонів тютюну // Мікробіол. журн. — 1994. — Т. 56, № 6. — С. 35–40.
19. Path. 4769363 US, A61K/70; C07H 15/04. Beta-glucan / Musaki A., Sone Y., Yoshida M., Takeuchi K. / Заявл. 04.03.1985; Опубл. 06.09.1988.
20. Молостов А. С. Элементы вариационной статистики. — К.: Урожай, 1965. — 180 с.
21. Коваленко О. Г., Кириченко А. М. Локалізація ВТМ-інфекції і розвиток індукованої стійкості у *Nicotiana sanderae* Hort., *Datura stramonium* L. та *D. metel* L. // Мікробіол. журн. — 2004. — Т. 66, № 4. — С. 43–47.

**ГЛИКАНЫ ВЫСШЕГО
БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА
Ganoderma adspersum (Schulzer) Donk:
ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИФИТОВИРУСНАЯ
АКТИВНОСТЬ**

А. Г. Коваленко¹
О. Н. Полищук¹
С. П. Вассер²

¹Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
²Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН
Украины, Киев

E-mail: udajko@ukr.net

На примере трех штаммов *G. adspersum*, выделенных в Грузии, Китае и Израиле, показана возможность высших грибов продуцировать гликаны, являющиеся активными ингибиторами фитовирусной инфекции. Активные противовирусные препараты из мицелия гриба можно получить с помощью водной, кислотной и щелочной экстракции. Установлена способность полисахаридных препаратов из мицелия *G. adspersum* активировать защитные механизмы растений и ингибировать инфекционную и репродуктивную функцию вируса табачной мозаики (ВТМ). Устойчивость табака к ВТМ-инфекции под влиянием гликана формируется *de novo* при участии транскрипции РНК на матрице клеточной ДНК, чувствительной к действию специфического ингибитора этого процесса — актиномицина Д. Кроме того, выявлена способность полисахарида подавлять репродукцию ВТМ в растениях табака при системной вирусной инфекции.

Ключевые слова: *Basidiomycetes*, *Ganoderma adspersum*, гликаны, противовирусная активность, вирус табачной мозаики, вирусоустойчивость растений, актиномицин Д, *Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium*.

**GLYCANS OF HIGHER
BASIDIOMYCETES MUSHROOM
Ganoderma adspersum (Schulzer) Donk :
ISOLATION AND ANTYPHYTOVIRAL
ACTIVITY**

O. G. Kovalenko¹
E. N. Polishchuk¹
S. P. Wasser²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and
Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv
²Kholodny Institute of Botany of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: udajko@ukr.net

High fungi ability to produce glycans which are active inhibitors of plant virus infection has been shown in three strains of *G. adspersum* isolated in Georgia, China and Israel. The antiviral preparations may be obtained using water, acid or alkaline extraction. Ability of *G. adspersum* glycan to activate the plants protective mechanisms and to inhibit the infectious and reproductive functions of tobacco mosaic virus (TMV) has been determined. Resistance of tobacco to TMV infection under glycan influence is formed *de novo* by participation of the mechanism of RNA transcription on the cellular DNA matrix which are sensitive to influence of specific inhibitor actinomycin D. At the same time, ability of polysaccharide to suppress reproduction of TMV in plants with systemic viral infection has been found.

Key words: *Basidiomycetes*, *Ganoderma adspersum*, glycans, antiviral activity, tobacco mosaic virus, virus resistance of plants, actinomycin D, *Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium*.