

УДК 606:615.322:631:871

ПРОДУКУВАННЯ ФІТОГОРМОНІВ ЦИТОКІНІНОВОЇ ПРИРОДИ МІЦЕЛЯРНОЮ БІОМАСОЮ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ

Н.П. ВЕДЕНИЧОВА, Г.А. АЛЬ-МААЛІ, Н.А. БІСЬКО, І.В. КОСАКІВСЬКА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
01601 Київ, вул. Терещенківська, 2
e-mail: vedenicheva@ukr.net

Досліджували продукування цитокінінів базидієвими грибами з метою створення препаратів з грибної сировини з високою цитокініноюю активністю для тестування на терапевтичну дію, виробництва лікувально-профілактичних харчових добавок і чистих лікарських засобів. Для цього вперше методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) проведено якісний і кількісний аналіз цитокінінів міцелярної біомаси штамів *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Pleurotus nebrodensis*, *Grifola frondosa*, *Sparassis crispa*. Ідентифіковано зеатин (*транс*- і *цис*-форми), зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид, ізопентеніладенозин, ізопентеніладенін, проте усі ці форми виявлено лише в одного виду (*G. lucidum* штам 1900). Найбільший сумарний вміст цитокінінів визначено в *F. officinalis* штам 5004. У міцелярній біомасі *T. versicolor* штам 353 і *G. lucidum* штам 1900 встановлено найвищу продуктивність синтезу рибозидних форм цитокінінів (зеатинрибозиду й ізопентеніладенозину), які мають терапевтичні властивості (антипроліферативна й цитотоксична дія на ракові клітини). *F. officinalis* штам 5004, *T. versicolor* штам 353, *G. lucidum* штам 1900 розглянуто як перспективні види базидієвих грибів для розробки біотехнології отримання з їхньої міцелярної біомаси препаратів з високою біологічною активністю.

Ключові слова: базидіоміцети, лікарські гриби, цитокініни, фітогормони.

Гриби утворюють окреме царство живих істот — Fungi. За клітинною будовою і характером метаболічних перетворень вони мають ознаки як рослин, так і тварин. У тварин і рослин однією з найважливіших регуляторних систем є гормональна. Життєдіяльність цих організмів контролюють гормони, які запускають усі без винятку життєві програми й керують ними впродовж онтогенезу. Наявність такої системи у грибів поки що залишається невизначеною. Здатність до синтезу фітогормонів виявлено у 35 видів грибів різних таксономічних груп, проте функціональне значення знайдених сполук поки що не встановлено [2]. Вивчено в основному мікроскопічні фітопатогенні гриби, які спричиняють аномальний ріст тканин рослини-хазяїна й утворення пухлин. Встановлено, що одним із характерних симптомів грибного ураження є підвищення в кілька разів рівня цитокінінів у цих тканинах [17, 23].

Цитокініни — поліфункціональні гормони рослин, які беруть участь у регуляції їх росту й розвитку, зокрема контролюють поділ клітин, стимулюють утворення та активність меристем пагонів, форму-

ють атрагувальну здатність тканин, гальмують процес старіння листків, інгібують ріст і галуження кореня, беруть участь у регуляції процесу проростання насіння, формуванні відповіді на стресові впливи тощо [19, 37]. До класу цитокінінів належать похідні аденіну — сполуки, близькі за структурою, але з різною біологічною активністю й нерівнозначними функціями. Молекули гормону з певними варіаціями структури бічного ланцюга, вірогідно, медіують різні біологічні сигнали: на сьогодні встановлено участь *транс*-зеатину та ізопентеніладеніну в передачі довгостанційних сигналів відповідно в акропетальному й базипетальному напрямках уздовж осі рослини [29].

Продуктування цитокінінів фітопатогенними грибами у високих кількостях показано при вирощуванні їх у культурі [8, 34]. У *Fusarium moniliforme* виявлено включення міченого аденіну в цитокініни, що свідчить про синтез гормону *de novo* [38]. Встановлено здатність біотрофного гриба *Claviceps purpurea* експресувати гени, які кодують ключові ферменти біосинтезу цитокінінів [17]. Вважають, що загальна стратегія паразитарних грибів полягає в застосуванні цитокінінів для маніпулювання розвитком рослини-хазяїна, при цьому вони можуть не тільки використовувати власні синтезовані гормони, а й змінювати експресію генів синтезу цитокінінів в окупованій рослині [10, 32].

Перші повідомлення про детектування біотестовими методами у плодкових тілах базидієвих грибів цитокінінкової активності з'явилися у 1970-ті роки. Активність, що відповідала зеатину й зеатинрибозиду, виявлено в *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach та *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer [14], у 6 видів роду *Rhizopogon* та 22 видів роду *Hebeloma* [13]. Пізніше прецизійними методами було доведено наявність зеатинрибозиду в базидіомах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm [1], зеатину — в *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. і *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill [26], *транс*-зеатину — у 18 видів макроміцетів, зокрема *Boletus impolitus* Fr., *Ptychoverpa bohemica* (Krombh.) Boud., *Volvariella speciosa* (Fr.) Singer, *Amanita gemmata* (Fr.) Bertill. та ін. [36]. Нещодавно за допомогою мас-спектрометрії вдалося виявити 7 форм цитокінінів у 20 видів лісових грибів [23].

Дослідження рістрегулювальних речовин плодкових тіл їстівних грибів привертає особливу увагу, що зумовлено необхідністю отримання екологічно чистого білкового продукту шляхом підвищення продуктивності культивованих грибів. Переважна більшість базидіоміцетів виявляє лікарські властивості, тому з початку XXI ст. активно обговорюється питання щодо розвитку нового наукового напрямку з вивчення медичних характеристик грибів («medicinal mushroom science») [40]. Які біохімічні складові грибов є діючими речовинами з лікувальним ефектом, на сьогодні залишається нез'ясованим. Водночас терапевтичні властивості цитокінінів, зокрема імуномодулювальну й протипухлинну дію цих фітогормонів, доведено [6, 20, 22]. У зв'язку з цим актуальним є питання про взаємозв'язок лікувальних властивостей грибів і синтезованих у їхніх клітинах цитокінінів. Раніше ми встановили, що міцелій *Lentinus edodes* (Berk.) Singer містить на порядок більше цитокінінів, ніж плодові тіла. Врахувавши все вищезгадане, ми поставили за мету провести скринінг базидієвих грибів, дослідити їх міцелярну біомасу стосовно продукування цитокінінів і визначити види, які активно синтезують ці гормони.

Методика

Вивчали базидієві макроміцети *Pleurotus nebrodensis* (Inzenga) Quel., *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray, *Laricifomes officinalis* (Vill.: Fr.) Kotl. Et Pouzar (*Fomitopsis officinalis*), *Sparassis crispa* (Fr.) Fr., *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst і *Trametes versicolor* (L.) Lloyd., які в традиційній східній медицині здавна застосовують для лікування і профілактики численних захворювань. Дослідження проводили зі штамми чистих культур *F. officinalis* 5004, *S. crispa* 314, *G. lucidum* 1900, *T. versicolor* 353, *G. frondosa* 976 та *P. nebrodensis* 2035, які зберігаються в Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, що має статус Національного надбання.

Міцеллярну біомасу вирощували в умовах термостата в темряві за температури 26 ± 1 °C у колбах Ерленмейера місткістю 250 мл з 50 мл рідкого середовища. Інокуляцію здійснювали фізіологічно активним міцелієм за методикою, розробленою для міцеліальних грибів [3], у кількості 10 % об'єму. Перед інокуляцією проводили мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища і посівного матеріалу. Для культивування *F. officinalis* 5004 та *S. crispa* 314 використовували рідке поживне середовище такого складу, г/л: глюкоза — 30,0; NH_4NO_3 — 3,5; KCl — 0,5; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; пивне неохмелене сушло (15° за Балінгом) — 115 мл; pH 5,0. *G. lucidum* 1900, *T. versicolor* 353, *G. frondosa* 976 і *P. nebrodensis* 2035 культивували в рідкому поживному середовищі такого складу, г/л: глюкоза — 25,0; пептон — 3,0; дріжджовий екстракт — 3,0; KH_2PO_4 — 1,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,25; pH 6,5. Кислотність середовищ доводили до необхідних значень 1 н розчинами KOH та HCl .

Міцеллярну біомасу після культивування грибів висушували в сушильній шафі за температури +105 °C до сталої маси і зважували на аналітичних вагах (Mechanika Precyzyjna, Польща). Продуктивність грибів визначали як абсолютно суху біомасу кожного виду в перерахунку на 1 л поживного середовища. Продуктивність синтезу цитокінінів обчислювали як загальну кількість цитокінінів в абсолютно сухій біомасі кожного виду лікарського гриба в перерахунку на 1 л поживного середовища.

Виділення й очищення цитокінінів із міцеллярної біомаси, їх якісне і кількісне визначення проводили з використанням модифікованих підходів, які застосовують при дослідженні рослин [24]. Прийоми та їх пристосування до роботи з міцеллярною біомасою грибів дібрано вперше. Наважку міцеллярної біомаси 10 г гомогенізували в електричному гомогенізаторі (Mechanika Precyzyjna, Польща) у 80 %-му розчині етанолу. Подрібнений до повної однорідності матеріал екстрагували 80 %-м розчином етанолу з розрахунку 10 мл розчину на 1 г наважки. Екстрагування повторювали тричі (2 год + 2 год + 20 год), після кожного етапу екстракт піддавали вакуумній фільтрації, а сухий залишок заливали новою порцією етанолу. Всі процедури проводили на холоді для запобігання ферментативному або окиснювальному руйнуванню гормону. Об'єднаний екстракт випарювали на роторному випарнику (Unipan, Польща) під вакуумом за температури +50 °C до водної фази. Водний залишок проморожували впродовж 24 год у морозильній камері за -20 °C, після чого різко розморожували для повнішого руйнування клітин і субклітинних структур. Розморожений екстракт підкислювали 1 М розчином HCl

до рН 2,5 і центрифугували упродовж 30 хв на центрифугі К 24 (Janetzky, Німеччина) за 15 000 об/хв й температури +4 °С. Надосадову рідину підлужували 1 М розчином NaOH до рН 8,0 і чотириразово фракціонували з водонасиченим *n*-бутанолом у пропорції 1 : 1. Об'єднаний бутанольний екстракт випарювали під вакуумом за температури +50...55 °С досуха і в такому вигляді зберігали у морозильній камері за –20 °С. Для подальшого очищення застосовували іонообмінну хроматографію. Сухий залишок розчиняли в 0,1 М розчині HCl, вносили в колонку 20×2 см Bio-Rad (США) зі смолою Dowex 50Wx8 (Serva, Німеччина) в H⁺-формі, промивали дистильованою водою, після чого елюювали 0,1 М розчином аміаку (5 вільних об'ємів колонки). Елюат випарювали під вакуумом за температури +50 °С досуха. Завершальний етап виділення цитокінінів здійснювали за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехія) або Silicagel 60 F₂₅₄ (Merk, Німеччина) розміром 20×20 см. На пластини наносили сухий залишок, розчинений в 1 мл 96 %-го етанолу, зліва наносили маркери цитокінінів. Пластини вміщували вертикально у хроматографічну камеру Desaga (Німеччина) із сумішшю розчинників ізопропанол : аміак : вода (10 : 1 : 1, за об'ємом). Після підйому розчинника до верхнього краю пластини висушували, зони, які при перегляді в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 254 нм) на хемоскопі Desaga (Німеччина) відповідали маркерам цитокінінів, елюювали 96 %-м етанолом. Елюати висушували досуха і зберігали при –20 °С.

Остаточний якісний і кількісний аналіз цитокінінів проводили методом ВЕРХ на рідинному хроматографі високого тиску Agilent 1200 LC з діодноматричним детектором G 1315 B (США). Використовували колонку Eclipse XDB-C 18 (США), 2,1×150 мм, розмір часточок — 5 мкм. Елюцію виконували в системі розчинників метанол : вода (37 : 63, за об'ємом). Аналітична довжина хвилі детектора становила 269 нм. Ідентифікували піки методом внутрішніх стандартів, кількісне визначення проводили методом абсолютного калібрування. Аналіз та обробку хроматограм здійснювали із програмним забезпеченням Chem Station, версія В.03.01 у режимі on line. Маркерами слугували стандартні розчини *транс*- і *цис*-зеатину, зеатинрибозиду, ізопентеніладенозину, ізопентеніладеніну та зеатин-О-глюкозиду (Sigma, США). Для приготування стандартних розчинів наважку цитокініну розчиняли в 0,05 мл 1 М КОН, потім нейтралізували 1 М HCl і розбавляли у 40–50 %-му етанолі або метанолі.

Досліди проводили в дворазовому біологічному й триразовому аналітичному повтореннях. Результати оброблено статистично ($p \leq 0,05$) з використанням дисперсійного аналізу та програм Microsoft Excel 2003 і Statistica 6.0.

Результати та обговорення

Унаслідок аналізу міцелярної біомаси шести видів лікарських макроміцетів було виявлено зеатин (*транс*- і *цис*-форми), зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид, ізопентеніладенозин та ізопентеніладенін (табл. 1). Усі перелічені цитокініни містились у міцелярній біомасі лише одного виду — *G. lucidum* 1900. Найповніше в досліджених видів були представлені гормони зеатинового типу, які зазвичай домінують у вищих рослин [29]. У міцелярній біомасі всіх досліджених видів грибів за винятком

ТАБЛИЦЯ 1. Вміст цитокінінів у міцелярній біомасі лікарських грибів (нг/г сухої речовини)

Вид, штам	<i>t-Z</i>	<i>c-Z</i>	ZR	iPa	iP	ZG	Σ
<i>Pleurotus nebrodensis</i> , штам 2035	1847±90	1489±71	882±39	0	0	4437±218	8655
<i>Grifola frondosa</i> , штам 976	2028±95	2363±108	0	0	0	1102±53	5493
<i>Fomitopsis officinalis</i> , штам 5004	1893±87	3034±147	3400±161	0	0	3892±182	12219
<i>Sparassis crispa</i> , штам 314	2256±109	1019±46	2262±111	0	215±9	0	5752
<i>Trametes versicolor</i> , штам 353	2201±105	4869±233	1506±71	0	0	62±3	8638
<i>Ganoderma lucidum</i> , штам 1900	834±38	1986±92	1020±45	322±14	142±6	713±32	5017

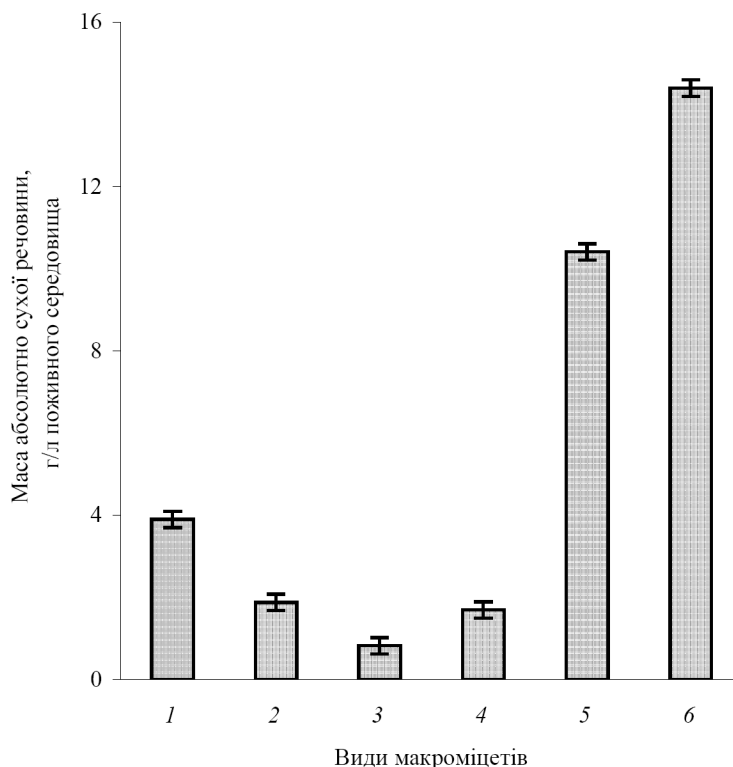
П р и м і т к а. Тут і в табл. 2: *t-Z* — *транс*-зеатин; *c-Z* — *цис*-зеатин; ZR — зеатинрибозид; iPa — ізопентеніладенозин; iP — ізопентеніладенін; ZG — зеатин-О-глюкозид.

G. lucidum 1900 був відсутній ізопентеніладенозин, а ізопентеніладенін містився в незначних кількостях лише у *S. crispa* 314 і *G. lucidum* 1900, що опосередковано вказує на припинення або дуже низький рівень синтезу цитокінінів прямим ізопентеніладенінзалежним (мевалонатним) шляхом. Цей шлях характерний для вищих рослин, функціонує також в організмах тварин, грибів і бактерій, локалізований у цитоплазмі і мітохондріях [15, 19]. Разом з цим наявність доволі великих кількостей *цис*-зеатину в усіх досліджених видів грибів свідчить про можливість значного внеску розпаду тРНК у пул цитокінінів, оскільки *цис*-зеатин утворюється саме таким шляхом [30].

Отже, отримані результати підтвердили незначний рівень прямого біосинтезу цитокінінів на дослідженій стадії розвитку міцелярної біомаси грибів і вказали на необхідність перевірки інтенсивності продукування цих гормонів на інших стадіях для отримання вищого виходу цитокінінів.

Міцелярна біомаса різних видів грибів відрізнялася також і за кількісним вмістом різних форм цитокінінів (див. табл. 1). У *P. nebrodensis* 2035 найвищим був вміст кон'югованої форми — зеатин-О-глюкозиду. У *G. frondosa* 976 відносно високий рівень вільних зеатинових форм — *транс*- і *цис*-зеатину. Міцелярна біомаса *F. officinalis* 5004 характеризувалася значною концентрацією зв'язаних зеатинів — рибозиду тая О-глюкозиду. У *S. crispa* 314 домінували цитокініни *транс*-зеатин і зеатинрибозид, у *T. versicolor* 353 і *G. lucidum* 1900 — *цис*-зеатин. Загалом якісний склад цитокінінів міцелярної біомаси досліджених грибів вирізнявся видоспецифічністю, що типово і для рослинних організмів [43].

Кількісний вміст окремих форм цитокінінів у міцелярній біомасі досліджених макроміцетів варіював у межах 40—200 нг/г сирої речовини. Для тканин вегетуючих рослин така концентрація гормонів у пере-



Біологічна продуктивність лікарських макроміцетів:

1 — *P. nebrodensis* 2035; 2 — *G. frondosa* 976; 3 — *F. officinalis* 5004; 4 — *S. crispa* 314; 5 — *T. versicolor* 353; 6 — *G. lucidum* 1900

рахунку на масу сирої речовини вважається невисокою. Вона є типовою для органів на завершальних стадіях росту, тоді як швидкорослі частини рослин із високим мітотичним індексом містять цитокінінів на порядок більше [15, 37]. Оскільки, як зазначалось в окремих дослідженнях, шляхи біосинтезу і метаболізму цитокінінів у різних організмів можуть відрізнятися [34], з урахуванням того, що гриби належать до окремого царства живих істот, порівнянням вмісту гормонів у міцелярній біомасі і рослинних тканинах неможливо зробити озназначні висновки стосовно відповідності характеру накопичення гормонів інтенсивності ростових процесів грибів. На сьогодні відомості щодо динаміки вмісту цитокінінів у грибних тканинах на різних стадіях онтогенезу в науковій літературі відсутні.

Міцелярна біомаса усіх досліджених видів лікарських макроміцетів містила велику кількість вологи (90—96 %). Згідно з розрахунком концентрації ендогенних цитокінінів на одиницю маси сухої речовини, сумарний вміст цих гормонів значно перевищує такий у рослин [15, 37]. Найвищий він у *F. officinalis* 5004 (понад 12 мкг/г сухої речовини), найнижчий — у *G. lucidum* 1900 (5,017 мкг/г сухої речовини). За однакових умов культивування міцелярна біомаса в досліджуваних видів грибів нарастала різними темпами (рисунок).

За отриманими результатами розраховано продуктивність синтезу цитокінінів у міцелярній біомасі базидієвих грибів, яка відображає пропорцію між вмістом цитокінінів і швидкістю наростання міцелярної біомаси (табл. 2).

ТАБЛИЦЯ 2. Продуктивність синтезу цитокінінів лікарськими грибами в культурі (мкг/л поживного середовища)

Вид, штам	t-Z	c-Z	ZR	iPa	iP	ZG	Σ
<i>Pleurotus nebrodensis</i> , штам 2035	7,09±0,32	5,72±0,25	3,39±0,14	0	0	17,12±0,68	33,30
<i>Grifola frondosa</i> , штам 976	3,81±0,17	4,44±0,20	0	0	0	2,07±0,09	10,33
<i>Fomitopsis officinalis</i> , штам 5004	1,58±0,07	2,53±0,11	2,84±0,13	0	0	3,25±0,15	10,21
<i>Sparassis crispa</i> , штам 314	3,84±0,16	1,73±0,08	3,85±0,18	0	0,36±0,01	0	9,78
<i>Trametes versicolor</i> , штам 353	22,81±0,9	50,44±2,4	15,596±0,6	0	0	0,64±0,003	89,48
<i>Ganoderma lucidum</i> , штам 1900	12,01±0,54	28,60±1,30	14,69±0,2	4,63±0,2	2,04±0,09	10,27±0,48	72,25

Порівняння вмісту цитокінінів (див. табл. 1) і даних щодо продуктивності біосинтезу цитокінінів (див. табл. 2) показало, що ці показники мають різний характер. Так, *F. officinalis* 5004, у міцелярній біомасі якого визначено найвищий сумарний вміст цитокінінів, мав незначну продуктивність, тоді як у *G. lucidum* 1900 спостерігалася зворотна ситуація — невисокий відносно інших видів рівень ендогенних цитокінінів на фоні високої продуктивності. Порівнянням концентрацій цитокінінів у міцелярній біомасі базидіоміцетів із їхньою продуктивністю виявлено, що оптимальним це співвідношення було в *T. versicolor* 353, продуктивність якого збігалася зі значним вмістом і широким спектром цитокінінів.

Отже, виконаний аналіз засвідчив, що всі досліджені види базидієвих грибів продукують гормони цитокінінової природи у значній кількості. Завдяки цілющим лікарським властивостям ці макроміцети широко застосовують у традиційній східній і народній медицині, гомеопатії. Зокрема, *P. nebrodensis* — цінний їстівний гриб, який містить незамінні для людини амінокислоти, жирні кислоти, мікроелементи і вітаміни, що робить його корисним у дієтичному харчуванні [16]. Порошок, отриманий з його міцелярної маси і плодкових тіл, а також водні екстракти пригнічували в дослідних тварин ріст пухлин за перорального та ін'єкційного застосування [18, 46]. Плодові тіла, міцелій та окремі метаболіти з їстівного гриба *G. frondosa* виявляють антибактеріальну, антивірусну, антифунгальну, протипухлинну та імуностимулювальну дію, регулюють кров'яний тиск, мають антидіабетичні властивості [4, 42]. *F. officinalis* здавна застосовували у народній медицині східні слов'яни для лікування цукрового діабету, підвищеної функції щитоподібної залози, лихоманки, неврастенії, жовтяниці, астми [40]. У країнах Південно-Східної Азії *F. officinalis* широко відомий понад 2000 років і входить до складу багатьох лікувально-профілактичних засобів [41]. Екстракти *S. crispa* чинять онкостатичний, імуномодельований та антиметастатичний ефекти [21, 44, 45]. Лікарський потенціал *G. lucidum* і *T. versicolor* виявляється в протипухлинних,

імуностимулювальних, антибактеріальних, антивірусних, гепатопротекторних, протизапальних властивостях [9, 27, 28].

Лікувальні характеристики цих грибів зазвичай пов'язують із наявністю у них біологічно активних речовин — полісахаридів та специфічних сполук тритерпенового ряду. Згідно з результатами наших досліджень, міцелярна біомаса грибів містить значну кількість гормонів цитокінінової природи. Разом із тим відомо, що цитокініни мають цінні терапевтичні властивості. На відміну від рослин, де цитокініни слугують стимуляторами поділу клітин [31], у тварин і людини ці речовини викликають апоптоз і блокують клітинний цикл широкого спектра ракових клітин [39]. Вони змінюють морфологію й дезорганізують актиновий цитоскелет клітин карциноми сечового міхура [7], блокують синтез ДНК, підвищують рівень інгібітора циклінозалежної кінази [33], індукують гени, задіяні в негативній регуляції перебігу клітинного циклу ракових клітин епітелію [12]. Цитокініни також інгібують реплікацію ентеровірусу людини [35], чинять цитотоксичну та імуномодулювальну дію, сприяють проліферації природних клітин-кілерів [11]. Наведені відомості щодо лікувальних властивостей грибів і дані стосовно біологічної дії цитокінінів на клітини тварин і людини передбачають існування певного зв'язку між ними. Оскільки міцелярна біомаса грибів містить велику кількість цитокінінів, не виключено, що саме ці речовини є одним із компонентів, що забезпечує терапевтичний ефект. Встановлено, що антипроліферативна і цитотоксична дія на ракові клітини властива переважно рибозидним формам цитокінінів [5, 25, 39]. Згідно з отриманими нами результатами, в міцелярній біомасі *S. crispa* 314 близько 50 % цитокінінового пулу становили рибозидні форми — зеатинрибозид та ізопентеніладенозин (див. табл. 1). Найвища продуктивність рибозидів виявлена у міцелярній біомасі *T. versicolor* 353 і *G. lucidum* 1900 (див. табл. 2). Отже, зазначені види базидіоміцетів перспективні для отримання з їхньої міцелярної біомаси препаратів з високою біологічною активністю для подальшого тестування на терапевтичний ефект і використання для виробництва лікувально-профілактичних засобів.

Таким чином, ми встановили здатність міцелярної біомаси базидієвих грибів продукувати цитокініни у значних кількостях за вирощування в культурі. Найвищий сумарний вміст цитокінінів взагалі і рибозидних форм зокрема визначено у *F. officinalis* 5004. Найбільшу продуктивність синтезу цитокінінів, у тому числі й рибозидів, виявлено в міцелярній біомасі *T. versicolor* 353 і *G. lucidum* 1900. Такі характеристики міцелярної біомаси досліджених видів грибів дають підставу вважати їх перспективними для подальших розробок, спрямованих на створення біотехнології отримання біологічно активних продуктів.

Автори широко вдячні старшим науковим співробітникам відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України канд. біол. наук Н.Ю. Митропольській та канд. біол. наук О.Б. Михайловій за участь у культивуванні грибів і наукові консультації.

Робота виконана за фінансової підтримки Національної академії наук України за цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства».

1. Веденечева Н.П., Генералова В.М., Бісько Н.А. та ін. Фітогормональний комплекс гливи звичайної // Укр. ботан. журн. — 1997. — 54, № 3. — С. 266–271.

2. Ситник К.М., Мусатенко Л.И., Васюк В.А. та ін. Гормональний комплекс рослин і грибів. — К.: Академперіодика, 2003. — 186 с.
3. Соломко Э.Ф., Митропольская Н.Ю. Получение посевного материала *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. глубинным методом // Микология и фитопатология. — 1994. — **28**, № 3. — С. 34—39.
4. Adachi Y., Okazaki M., Ohno N., Yadomae T. Enhancement of cytokinin production by macrophages stimulated with (1—3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa* // Biol. Pharmacol. Bull. — 1994. — **17**. — P. 1554—1560.
5. Bifulco M., Malfitano A.M., Proto M.C. et al. Biological and pharmacological roles of N₆-isopentenyladenosine: an emerging anticancer drug // Anticancer. Agenst. Med. Chem. — 2008. — **8**. — P. 200—204.
6. Casati S., Ottria R., Baldoli E. et al. Effects of cytokinins, cytokinin ribosides and their analogs on the viability of normal and neoplastic human cells // Anticancer. Res. — 2011. — **31**. — P. 3401—3406.
7. Castiglioni S., Casati S., Ottria R. et al. N₆-isopentenyladenosine and its analogue N₆-benzyladenosine induce cell cycle arrest and apoptosis in bladder carcinoma T24 cells // Anticancer. Agents Med. Chem. — 2013. — **13**. — P. 672—678.
8. Castillo G., Torrecillas A., Nogueiras C. et al. Simultaneous quantification of phytohormones in fermentation extracts of *Botryodiplodia theobromae* by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2014. — **30**. — P. 1937—1946.
9. Chen X., Hu Z.P., Yang X.X. et al. Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colorectal cancer // Int. Immunopharmacol. — 2006. — **6**. — P. 499—508.
10. Choi J., Choi D., Lee S. et al. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? // Trends Plant Sci. — 2011. — **16**. — P. 388—394.
11. Ciaglia E., Pisanti S., Picardi P. et al. N₆-Isopentenyladenosine, an endogenous isoprenoid end product, directly affects cytotoxic and regulatory functions of human NK cells through FDPS modulation // J. Leukocyte Biol. — 2013. — **94**. — P. 1207—1219.
12. Colombo F., Falvella F.S., De Cecco L. et al. Pharmacogenomics and analogues of the antitumour agent N₆-isopentenyladenosine // Int. J. Cancer. — 2009. — **124**. — P. 2179—2185.
13. Crafts C.B., Miller C.O. Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi // Plant Physiol. — 1974. — **54**. — P. 586—588.
14. Dua I.S., Jandaik C.L. Cytokinins in two cultivated edible mushrooms // Sci. Hort. — 1979. — **10**. — P. 301—304.
15. Frebort I., Kowalska M., Hluska T. et al. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation // J. Exp. Bot. — 2011. — **62**. — P. 2431—2452.
16. Gargano M.L., Zervakis G.I., Venturella G. Cultivation and nutritional value of *Pleurotus nebrodensis* // *Pleurotus nebrodensis*, A Very Special Mushroom. — Sharjah: Bentham Science Publishers, 2013. — P. 99—120.
17. Hinsch J., Vrabka J., Oeser B. et al. De novo biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea* // Environ. Microbiol. — 2015. — **17**. — P. 2935—2951.
18. Hobbs Ch. Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. — Santa Cruz: Botanica Press, 1995. — 251 p.
19. Kieber J.J., Schaller G.E. Cytokinins // The Arabidopsis Book. — 2014. — 11:e0168.doi:10.1199/tab.0168.
20. Kolyachkina S.V., Tararov V.I., Alexeev C.S. et al. N₆-substituted adenosines. Cytokinin and antitumor activities // Collect. Czech. Commun. — 2011. — **76**. — P. 1361—1378.
21. Kwon A.H., Qiu Z., Hashimoto M., Kimura T. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetes rats // Amer. J. Surgery. — 2009. — **197**. — P. 503—509.
22. Molinsky J., Klanova M., Koc M. et al. Roscovitine sensitizes leukemia and lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis // Leuk Lymphoma. — 2013. — **54**. — P. 372—380.
23. Morrison E.N., Knowles S., Hayward A. et al. Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis // Micologia. — 2015. — **107**. — P. 245—257.
24. Musatenko L., Vedenicheva N., Vasyuk V. et al. Phytohormones in seedlings of maize hybrids differing in their tolerance to high temperatures // Russian J. Plant Physiol. — 2003. — **50**. — P. 499—504.
25. Ottria R., Casati S., Manzocchi A. et al. Synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity of some novel isopentenyladenosine derivatives // Bioorg. And Med. Chem. — 2010. — **18**. — P. 4249—4254.

26. *Ozcan B.* GA3, ABA and cytokinin production by *Lentinus tigrinus* and *Laetiporus sulphureus* fungi cultured in the medium of olive oil mill waste // Turk. J. Biol. — 2001. — **25**. — P. 453–462.
27. *Patel S., Goyal A.* Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review // Biotechnology. — 2012. — **2**. — P. 1–15.
28. *Paterson R.R.* Ganoderma — a therapeutic fungal biofactory // Phytochemistry. — 2006. — **67**. — P. 1985–2001.
29. *Romanov G.A.* How do cytokinins affect the cell? // Russian J. Plant Physiol. — 2009. — **56**. — P. 268–290.
30. *Schafer M., Brutting C., Meza-Canales I.D. et al.* The role of *cis*-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions // J. Exp. Bot. — 2015. — **66**. — P. 4873–4884.
31. *Schaller G.E., Street I.H., Kieber J.J.* Cytokinin and the cell cycle // Curr. Opin. Plant Biol. — 2014. — **21**. — P. 7–15.
32. *Spichal L.* Cytokinins — recent new and views of evolutionally old molecules // Funct. Plant Biol. — 2012. — **39**. — P. 267–284.
33. *Spinola M., Colombo F., Falvella F.S., Dragani T.A.* N₆-isopentenyladenosine: A potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers // Int. J. Cancer. — 2007. — **120**. — P. 2744–2748.
34. *Stik W.A., Van Staden J.* Flow of cytokinins through the environment // Plant Grow. Regul. — 2010. — **62**. — P. 101–116.
35. *Tararov V.I., Tijmsa A., Kolyachkina S.V. et al.* Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N₆-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication // Eur. J. Med. Chem. — 2015. — **90**. — P. 406–413.
36. *Turker M., Demirel K., Uzun Y. et al.* Determination of phytohormones level in some dried and fresh macrofungi taxa // Phyton — Annales rei Botanicae. — 2005. — **45**. — P. 145–157.
37. *Vankova R.* Cytokinin regulation of plant growth and stress responses // Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications / Ed L.-S. Tran, S. Pal. — N.Y., Heidelberg, Dordrecht, London: Springer Science + Business Media, 2014. — P. 55–80.
38. *Van Staden J., Nicholson R.I.D.* Cytokinins and mango flower malformation II. The cytokinin complement produced by *Fusarium moniliforme* and the ability of the fungus to incorporate [8-¹⁴C] adenine into cytokinins // Physiol. Mol. Plant Pathol. — 1989. — **35**. — P. 423–431.
39. *Voller J., Zatloukal M., Lenobel R. et al.* Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study // Phytochemistry. — 2010. — **71**. — P. 1350–1359.
40. *Wasser S.P.* Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges // Biomed. J. — 2014. — **37**. — P. 345–356.
41. *Wasser S.P.* Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems // Int. J. Med. Mushrooms. — 2010. — **12**. — P. 1–16.
42. *Wasser S.P., Weis A.L.* Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review) // Int. J. Med. Mushrooms. — 1999. — **1**. — P. 31–62.
43. *Werner T., Schmulling T.* Cytokinin action in plant development // Curr. Opin. Plant Biol. — 2009. — **12**. — P. 527–538.
44. *Yamamoto K., Inose T., Kimura T. et al.* Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of beta-1,3-d-glucan purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa* // Biol. Pharmaceut. Bull. — 2009. — **32**. — P. 503–509.
45. *Yoshikawa K., Kokudo N., Hashimoto T. et al.* Novel phthalate compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), Hanabiratakelide A-C, exhibiting anticancer related activity // Biol. Pharmaceut. Bull. — 2010. — **33**. — P. 1355–1359.
46. *Zhang J., Huang C.* Study on germplasm characteristics of *Pleurotus nebrodensis* in China // Int. J. Med. Mushrooms. — 2007. — **9**. — P. 365.

Отримано 16.05.2016

ПРОДУЦИРОВАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ ЦИТОКИНИНОВОЙ ПРИРОДЫ
МИЦЕЛЯРНОЙ БИОМАССОЙ БАЗИДИЕВЫХ ГРИБОВ*Н.П. Веденичева, Г.А. Аль-Маали, Н.А. Бисько, И.В. Косаковская*

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали продуцирование цитокининов базидиевыми грибами с целью создания препаратов из грибного сырья с высокой цитокининовой активностью для тестирования на

терапевтическое действие, производства лечебно-профилактических пищевых добавок и чистых медицинских препаратов. Для этого впервые методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проведен качественный и количественный анализ цитокининов мицелиарной биомассы штаммов *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Pleurotus nebrodensis*, *Grifola frondosa*, *Sparassis crispa*. Идентифицированы зеатин (*транс*- и *цис*-формы), зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид, изопентениладенозин, изопентениладенин, однако все эти формы обнаружены только у одного вида (*G. lucidum* штамм 1900). Наибольшее суммарное содержание цитокининов определено у *F. officinalis* штамм 5004. В мицелиарной биомассе *T. versicolor* штамм 353 и *G. lucidum* штамм 1900 установлена наивысшая продуктивность синтеза рибозидных форм цитокининов (зеатинрибозид и изопентениладенозина), которым присущи терапевтические свойства (антипролиферативное и цитотоксическое действие на раковые клетки). *F. officinalis* штамм 5004, *T. versicolor* штамм 353, *G. lucidum* штамм 1900 рассмотрены как перспективные виды базидиальных грибов для разработки биотехнологии получения из их мицелиарной биомассы препаратов с высокой биологической активностью.

CYTOKININS PHYTOHORMONES PRODUCTION BY BASIDIOMYCETES MICELIAL BIOMASS

N.P. Vedenicheva, G.A. Al-Maali, N.A. Bisko, I.V. Kosakivska

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine

For the first time the HPLC method was used to identify cytokinins and to determine their content in micelial biomass of six mushroom species (*Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomitopsis officinalis*, *Pleurotus nebrodensis*, *Grifola frondosa*, *Sparassis crispa*). Basidiomycetes were studied for cytokinins production for the purpose to prepare medicines from fungal raw material with a high cytokinin activity for therapeutic effects and to produce medicinal — prophylactic food additives and pure drugs. *Trans*- and *cis*-zeatin, zeatin riboside, zeatin-O-glucoside, isopentenyladenosine, isopentenyladenine were found, but only one species (*G. lucidum*) contained all these forms. The cytokinins highest total content was revealed in *F. officinalis*. The *T. versicolor* and *G. lucidum* micelial biomass showed the highest production of riboside-type cytokinins (zeatin riboside and isopentenyladenosine), which possess therapeutic properties (antiproliferative and cytotoxic effects on cancer cells). *F. officinalis*, *T. versicolor* and *G. lucidum* are regarded as perspective basidiomycetes for the biotechnological development to obtain drugs with a high biological activity from micelial biomass.

Key words: basidiomycetes, medicinal mushrooms, cytokinins, phytohormones.