АНОТАЦІЯ

Бороменський Д.О. Біологічні особливості штамів видів роду *Ganoderma* P. Karst. з Колекції Культур Шапинкових грибів (*IBK)* – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 біологія, спеціалізація – біологія. Національна академія наук України. Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного, Київ, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню біологічно активних речовин, культурально-морфологічних та мікроморфологічних особливостей вегетативного міцелію різних штамів видів роду *Ganoderma* P. Karst. Вивченню накопичення біомаси, вмісту і виходу ендополісахаридів, ганодерових кислот та поліфенольних сполук цих штамів за різних умов культивування. Також встановленню впливу біомаси та екстрактів з неї на ріст деяких видів бактерій, мікроміцетів та вищих рослин, визначенню антиоксидантної активності цих екстрактів.

Під час дисертаційного дослідження були отримані нові дані щодо культурально-морфологічних та мікроморфологічних особливостей вегетативного міцелію 10 штамів 7 видів грибів роду *Ganoderma* з Колекції культур шапинкових грибів (*IBK*) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

За результатами вивчення швидкості радіального росту обраних штамів видів роду *Ganoderma* 4 штами було віднесено до швидкоростучих (>8мм/добу): *G. lucidum* 1904, *G. resinaceum* 2477, *G. resinaceum* 2503, *G. applanatum* 1899; встановлено 2 штами, що проявляли середню швидкість росту (4-8 мм/добу): *G. tsugae* 2024 та *G. tsugae* 2566 та 4 повільноростучі штами (<4 мм/добу): *G. tsugae* 1848, *G. oregonense* 2560, *G. carnosum* 2502, *G. sinense* 2516.

Під час вивчення впливу підвищених температур на життєздатність вегетативного міцелію було встановлено, що найбільшу стійкість до впливу

підвищених температур проявляли штами *G. resinaceum* 2477, 2503 і *G. lucidum* 1904, які зберігали здатність рости навіть після впливу температури 42 ± 0,1 °С. На прикладі штамів *G. tsugae* та *G. resinaceum* доведено, що стійкість до критично високих температур може відрізнятись у штамів одного виду: штами *G. tsugae* 2024 та *G. tsugae* 2566 зберігали життєздатність після впливу температури 38 ± 0,1 °С, а штам *G. tsugae* 1848 після впливу тієї ж температури припиняв рости. Так само міцелій штаму *G. resinaceum* 2477 ріс за температури 40 ± 0,1 °С, а міцелій *G. resinaceum* 2503 втрачав життєздатність за тієї ж температури.

Для штамів *G. tsugae* 1848, 2024, 2566, *G. sinense* 2516, *G. resinaceum* 2477, 2503, *G. carnosum* 2502, *G. oregonense* 2560 культурально-морфологічні особливості досліджені вперше. Було виявлено, що 6 з 10 штамів: *G. sinense* 2516, *G. applanatum* 1899, *G. carnosum* 2502, *G. tsugae* 1848, *G. tsugae* 2024 та *G. tsugae* 2566 при довготривалому культивуванні змінювали забарвлення міцелію. Встановлено, що 30-добові міцеліальні колонії штамів *G. resinaceum* 2503, *G. tsugae* 2024, *G. sinense* 2516 та *G. lucidum* 1904 утворювали примордії, що нехарактерно для штамів інших досліджених нами видів.

З використанням методів світлової та сканувальної електронної мікроскопії (СЕМ) нами були вперше описані такі мікроструктури вегетативного міцелію: подвійні пряжки та пряжки з анастомозами на міцелії *G. carnosum*, а також коралоподібні гіфи на міцелії *G. sinense* та *G. carnosum*.

Проведено порівняння впливу способів культивування на накопичення біомаси, вміст і вихід ендополісахаридів та ганодерових кислот міцелієм 10 штамів, 7 видів роду *Ganoderma* на рідкому живильному середовищі ГПД (глюкозо-пептон-дріжджове рідке живильне середовище). Найбільшу кількість біомаси накопичував штам *G. tsugae* 2024, що зростав протягом 14 діб у глибинній культурі – 20,3 г/л ± 0,5 г/л. Доведено, що для накопичення біомаси усіх штамів, крім *G. oregonense* 2560, спосіб глибинного культивування був ефективнішим, ніж спосіб поверхневого культивування.

Вперше наведено дані щодо накопичення біомаси міцелію та ендополісахаридів штамами *G. carnosum* та *G. oregonense* за умов поверхневого та глибинного культивування на рідкому живильному середовищі. Біомаса *G. carnosum* у поверхневій культурі на 14 добу складала 2,7 ± 0,2 г/л і у глибинній культурі – 10,5 ± 0,2 г/л, вміст ендополісахаридів становив 6,8 ± 0,2 % та 6,6 ± 0,3 % відповідно. Біомаса *G. oregonense* у поверхневій культурі на 14 добу складала 9,3 ± 0,3 г/л і у глибинній культурі – 9,5 ± 0,5 г/л, вміст ендополісахаридів був 8,2 ± 0,4 % та 7,7 ± 0,3 % відповідно.

Доведено, що глибинний спосіб культивування є ефективнішим за спосіб поверхневого культивування для накопичення ендополісахаридів чотирьох з 10 досліджених штамів грибів роду *Ganoderma*: *G. tsugae* 2566, 2024, *G. resinaceum* 2503, 2477. Найвищий вміст ендополісахаридів був накопичений міцелієм *G. oregonense* – 8,2 ± 0,4 % від сухої маси міцелію, який зростав в умовах поверхневої культури. Найвища вихід ендополісахаридів була характерна для міцелію *G. tsugae* 2024, вирощеного у глибинній культурі – 1,58 ± 0,08 г/л.

Нами вперше розроблений модифікований метод екстракції ганодерових кислот з міцелію видів роду *Ganoderma*. Запропонована зміна умов екстракції дозволяє скоротити термін першого етапу процесу в 7 разів порівняно з класичним методом та отримати аналогічну кількість ганодерових кислот.

Штами *G. sinense* 2516 та *G. tsugae* 2024 накопичували найбільшу кількість ганодерових кислот порівняно з іншими видами та штамами, тому для них була вивчена динаміка синтезу та виходу ганодерових кислот на 6-у, 8-у, 10-у, 12-у, 14-у, 16-у, 18-у та 20-у добу культивування. Водночас найвищий вміст ганодерових кислот був у міцелії штаму *G. sinense* 2516 вирощеного в глибинній культурі на 14-у добу культивування (25,2 ± 1,5 мг/г). Встановлено, що найвища вихід ганодерових кислот була характерна для міцелію *G. sinense* 2516 на 14-у добу культивування та для міцелію *G. tsugae* 2024 на 16-у добу культивування і становила приблизно 0,35 г/л.

Досліджено вміст фенольних сполук та їх вихід міцелієм штамів *G. tsugae* 2024 та *G. sinense* 2516. Під час експерименту було доведено, що найбільше їх накопичував міцелій *G. sinense* 2516 – 51,2 ± 0,1 мг/г. Найвища вихід фенольних сполук обох штамів була статистично рівною і становила 1,2 ± 0,02 мг/л.

Досліджена антиоксидантна активність метанольних, етилацетатних та водних екстрактів з біомаси міцелію *G. tsugae* 2024 і *G. sinense* 2516. Було доведено, що використання етилацетату й метанолу для отримання екстрактів, підвищує їх ефективність як антиоксидантів. Інактивація вільних радикаів екстрактами отриманими за допомогою етилацетату та метанолу, відповідно становила 93,1 і 90,6 % для *G. sinense* 2516 та 97,7 і 92,2 % для *G. tsugae* 2024. Водні екстракти *G. sinense* 2516 та *G. tsugae* 2024 проявляли слабшу антиоксидантну активність – 30,3 і 23,9 %.

Вперше отримані дані щодо антибактеріальних та антифунгальних властивостей етилацетатних і метанольних екстрактів біомаси міцелію *G. sinense* 2516 та *G. tsugae* 2024. Була доведена антибактеріальна дія метанольного екстракту *G. tsugae* 2024 на ріст *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (зона інгібування 15 мм) та етилацетатного екстракту *G. tsugae* 2024 на ріст *Escherichia coli* T. Escherich (зона інгібування 13 мм).

Доведено, що етилацетатні екстракти *G. sinense* 2516 та *G. tsugae* 2024 здатні значною мірою пригнічувати розвиток *Aspergillus niger* Tiegh.– зона інгібування була діаметром 50 мм та 34 мм відповідно. На ріст *Penicillium polonicum* K. Zaleski навпаки сильніше впливали саме метанольні екстракти. При внесенні метанольного екстракту з міцелію *G. sinense* 2516 зона інгібування росту *P. polonicum* складала 45 мм, а метанольного екстракту *G. tsugae* 2024 – 37 мм.

Вперше досліджено вплив біомаси міцелію 9 штамів 6 видів грибів роду *Ganoderma* (в концентрації 0,625 мг/мл голодного агару) на проростання насіння і ріст *Lepidium sativum* L. та *Cucumis sativus* L. Біомаса усіх видів та штамів суттєво пригнічувала ріст як коренів, так і паростків *L. sativum*.

Найсильніший інгібуючий вплив проявляла біомаса міцелію *G. tsugae* 2024 – середня довжина рослини *L. sativum* була на 80,9 % меншою порівняно з контролем. Найслабшу інгібуючу активність проявляла біомаса *G. carnosum* 2502 – середня довжина рослини *L. sativum* була на 30,7 % меншою порівняно з контролем. Визначено, що етилацетатний екстракт з біомаси міцелію *G. tsugae* 2024 суттєво пригнічує ріст *L. sativum*, а додавання 100 мкл вказаного екстракту на 100 % не дає проростати насінинам.

Біомаса міцелію *G. resinaceum* 2477 та *G. lucidum* 1904 проявляє найсильнішу інгібуючу дію на ріст *C. sativus*. Середня довжина рослини при додаванні міцелію вказаних штамів була на 61 % менша за довжину у контрольній групі в обох випадках. Доведено, що біомаса *G. sinense* 2516 може впливати як слабкий стимулятор росту *C. sativus* – середня довжина рослини при додаванні міцелію *G. sinense* 2516 була на 5 % достовірно більшою, ніж у контрольній групі.

В результаті проведених досліджень відібраний штам *G. tsugae* 2024 з Колекції культур шапинкових грибів (*IBK*) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України як біотехнологічно перспективний продуцент ендополісахаридів (1,58 ± 0,08 г/л), ганодерових кислот (0,35 ± 0,02 г/л), фенольних сполук (1,2 ± 0,02 мг/л) з високою антиоксидантною, антифунгальною та інгібуючою активністю щодо деяких вищих рослин.

Ключові слова: антиоксидантна активність, ганодерові кислоти, глибинне культивування, мікроструктури, поверхневе культивування, полісахариди, феноли, *Ganoderma*.

SUMMARY

Boromenskyi D.O. Biological features of strains of Ganoderma P. Karst. species from the *IBK* Mushrooms Culture Collection. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, specialty 091 biology, specialization – mycology

M.G. Kholodny Institute of botany, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of biologically active substances, cultural-morphological and micromorphological features of vegetative mycelium of genus *Ganoderma* P. Karst. strain diversity; the research of content of biomass, endopolysaccharides, ganoderic acids and polyphenolic compounds of these strains and production of their synthesis under different cultivation conditions; the study of the influence of mycelium biomass and its extracts on the growth of some bacteria, micromycetes and higher plants; the analysis of antioxidant activity of biomass extracts.

During the dissertation research new data were obtained on the cultural-morphological and micromorphological features of the vegetative mycelium of strain diversity (10 strains of 7 species) of *Ganoderma* fungi from the IBK Mushroom Culture Collection of M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine.

While evaluating the rate of radial growth of the genus *Ganoderma* species, 4 strains were classified as fast-growing (>8 mm/day): *G. lucidum* 1904, *G. resinaceum* 2477, *G. resinaceum* 2503, *G. applanatum* 1899; 2 strains that showed the average growth rate (4-8 mm/day): *G. tsugae* 2024 and *G. tsugae* 2566; and 4 slow-growing strains (<4 mm/day): *G. tsugae* 1848, *G. oregonense* 2560, *G. carnosum* 2502, *G. sinense* 2516.

When studying the effect of high temperatures on the viability of vegetative mycelium, it was found that the greatest resistance to high temperatures showed strains of *G. resinaceum* 2477, 2503 and *G. lucidum* 1904, which retained the ability to grow even after the exposure to 42 ± 0.1°C. On the example of *G. tsugae* and *G.*

resinaceum strains, it was proved that critically high temperatures resistance can differ within one species: strains of *G. tsugae* 2024 and *G. tsugae* 2566 remained viable after the exposure to 38 ± 0.1°C, and *G. tsugae* 1848 strain after exposure to a temperature of 38 ± 0.1 ° C stopped growing. Moreover, the mycelium of the strain *G. resinaceum* 2477 continued growing at the temperature of 40 ± 0.1 ° C, and the mycelium of *G. resinaceum* 2503 lost its viability at this temperature.

Cultural and morphological features of *G. tsugae* 1848, 2024, 2566, *G. sinense* 2516, *G. resinaceum* 2477, 2503, *G. carnosum* 2502, *G. oregonense* 2560 strains were studied for the first time. It was discovered that 6 out of 10 strains changed the color of the mycelium after long-term cultivation: *G. sinense* 2516, *G. applanatum* 1899, *G. carnosum* 2502, *G. tsugae* 1848, *G. tsugae* 2024, *G. tsugae* 2566. It was found that 30-day-old mycelial colonies of strains of *G. resinaceum* 2503, *G. tsugae* 2024, *G. sinense* 2516 and *G. lucidum* 1904 formed primordia, the uncharacteristic trait for the strains of other species studied by us.

Using light and scanning electron microscopy (SEM) methods we were first to describe the following microstructures of vegetative mycelium: double clamps and clamps with anastomoses on *G. carnosum* mycelium, as well as coral-like hyphae on *G. sinense* and *G. carnosum*.

The largest amount of biomass was accumulated by the strain *G. tsugae* 2024, which was growing for 14 days in submerged culture - 20.3 ± 0,5 g / L.

It has been proved in the research that the submerged cultivation method was more effective than the method of static liquid cultivation for the accumulation of biomass of all strains except *G. oregonense* 2560.

For the first time, data on the accumulation of mycelium biomass and endopolysaccharides by strains of *G. carnosum* and *G. oregonense* species under submerged and static liquid cultivation conditions on liquid nutrient medium were presented. The biomass of *G. carnosum* in static liquid culture on the 14th day was amounted to 2.7 ± 0,2 g/L and in submerged – 10.5 ± 0,2 g/L, the content of endopolysaccharides was 6.8 ± 0,2 % and 6.6 ± 0,3 %, respectively. The amount of *G. oregonense* biomass in surface static liquid culture on the 14th day was 9.3 ± 0,3

g/L and in submerged culture – 9.5 ± 0,5 g/L, the content of endopolysaccharides was 8.2 ± 0,4 % and 7.7 ± 0,3 %, respectively.

It was discovered that the submerged cultivation method was more effective than the static liquid cultivation method for the accumulation of endopolysaccharides for 4 out of 10 studied strains of fungi of the genus Ganoderma: *G. tsugae* 2566, 2024, *G. resinaceum* 2503, 2477. The highest content of endopolysaccharides was shown by *G. oregonense* - 8.2 ± 0,4 % of the dry mass of mycelium grown under static liquid culture conditions. The highest production of endopolysaccharide synthesis was characteristic of *G. tsugae* 2024 mycelium grown in submerged culture - 1.58 ± 0,08 g / L.

For the first time we have developed a modified method of ganoderic acids extraction from the *Ganoderma* species. This method allowed to reduce the time of the first stage of extraction by 7 times compared to the classical method and to obtain a similar amount of ganoderic acids.

The dynamics of ganoderic acid synthesis and their production by *G. sinense* 2516 and *G. tsugae* 2024 strains on the 6th, 8th, 10th, 12th, 14th, 16th, 18th and 20th day of cultivation was investigated. The highest content of ganoderic acids was detected in the mycelium of the *G. sinense* 2516 strain grown in submerged culture on the 14th day of cultivation (25.2 ± 1.5 mg / g). It was found that the highest production of the ganoderic acids synthesis was featured by the mycelium of *G. sinense* 2516 on the 14th day of cultivation and by the mycelium of *G. tsugae* 2024 on the 16th day of cultivation – 0.35 g / L for both strains.

The content of phenolic compounds and the production of their synthesis by the mycelium of *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516 strains were studied. It was demonstrated that the highest content of phenolic compounds was accumulated by mycelium of *G. sinense* 2516 - 51.2 ± 0,1 mg / g. The production of synthesis of such compounds of both strains was statistically equal and amounted to 1.2 ± 0,02 mg/L.

We were first to determine the antibacterial and antifungal properties of ethyl acetate and methanolic extracts of mycelia biomass of *G. sinense* 2516 and *G. tsugae*

2024. The antibacterial effect of ethyl acetate extract of *G. tsugae* 2024 on the growth of *Escherichia coli* T. Escherich (inhibition zone 13 mm), and methanilic extract of *G. tsugae* 2024 on *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (inhibition zone 15 mm), was observed.

It was proven that ethyl acetate extracts of *G. sinense* 2516 and *G. tsugae* 2024 significantly inhibit the development of *Aspergillus niger* Tiegh.– the inhibition zones were 5 cm and 3.4 cm in diameter, respectively. Conversely, the growth of *Penicillium polonicum* K. Zaleski was strongly influenced by methanol extracts. After the introduction of methanol extract of the mycelium of *G. sinense* 2516, the zone of growth inhibition of *P. polonicum* was 4.5 cm, and methanol extract of *G. tsugae* 2024 - 3.7 cm. The growth of *Mucor globosus* A. Fisch. was not affected by any of the extracts we used.

The effect of mycelium biomass of strain diversity (9 strains of 6 species) of *Ganoderma* fungi on *Lepidium sativum* L. and *Cucumis sativus* L. seed germination and growth was studied for the first time. The growth of *L. sativum* roots and stems was significantly inhibited by the biomass of all *Ganoderma* species and strains. The strongest inhibition effect was demonstrated by the mycelium biomass of *G. tsugae* 2024 – the average length of the *L. sativum* plant was decreased by 80.9 % compared to the control. The weakest inhibitory activity was shown by biomass of *G. carnosum* 2502 – the average length of the plant *L. sativum* was 30.7 % shorter compared to the control. It was determined that ethyl acetate extract from the mycelium biomass of *G. tsugae* 2024 significantly inhibits the growth of *L. sativum*, and the addition of 100 µl of this extract entirely prevents the germination of seeds.

The biomass of *G. resinaceum* 2477 and *G. lucidum* 1904 mycelia demonstrated the strongest inhibition effect on the growth of *C. sativus*. The introduction of the mycelia of these strains reduced the average plant length by 61 % compared to the control group in both cases. It was demonstrated that the biomass of *G. sinense* 2516 was able to act as a weak growth stimulant of *C. sativus* – the average length of the plant after the addition of *G. sinense* 2516 mycelium was 5 % greater than in the control group.

The antioxidant activity of methanol, ethyl acetate and aqueous extracts obtained from mycelium biomass of *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516 has been studied. It was established that the use of ethyl acetate and methanol to obtain extracts, increases their effectiveness as antioxidants. Antioxidant activity for ethyl acetate and methanol extracts was found to be 93,1 і 90,6 % for *G. sinense* 2516 and 97,7 і 92,2 % for *G. tsugae* 2024 respectively. Aqueous extracts of *G. sinense* 2516 and *G. tsugae* 2024 showed lower rate of antioxidant activity - 30.3 and 23.9 % respectively.

As a result of the conducted researches it was defined that *G. tsugae* 2024 strain from the IBK Mushroom Culture Collection of M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine is a biotechnologically promising producer of endopolysaccharides (1.58 g/L), ganoderic acids (0.35 g/L), phenolic compounds (1.2 mg/L) and has a high antioxidant, antifungal activity and shows inhibitory effect against higher plants.

Key words: antioxidant activity, ganoderic acids, *Ganoderma*, microstructures, phenols, polysaccharides, static liquid cultivation, submerged cultivation.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних наукових виданнях інших держав

1. Boromenskyi, D., Al-Maali, G., & Bisko, N. (2021). The influence of biomass and its extracts of *Ganoderma* species on the seeds germination and the growth of *Lepidium sativum* L. *International Journal of Applied Biology and Environmental Science*. 3(1) 1-5. https://doi.org/10.5505/ijabes.2021.87487.
2. Boromenskyi, D., Al-Maali, G., & Bisko, N. (2021). The influence of biomass of *Ganoderma* species on seed germination and seedlings growth of *Cucumis sativus* L. *Plant & Fungal Research*. 4(1), 25-29.

Статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових видань України

1. Бороменський, Д.О., & Бісько, Н.А. (2019). Мікроморфологічні особливості грибів роду *Ganoderma* (Ganodermataceae) в культурі. *Український ботанічний журнал*. 77(2), 117–124.
2. Бороменський, Д.О., & Бісько, Н.А. (2020) Вплив умов культивування на накопичення біомаси та ендополісахаридів грибами роду *Ganoderma* (Ganodermataceae) *Український ботанічний журнал*. 77(2), 117–124. https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.02.117
3. Boromenskyi, D.O., Bisko, N.A., Al-Maali, G.A., & Polishchuk O.V. (2021). The contents of ganoderic acids in mycelium of different species and strains of the genus Ganoderma (Ganodermataceae) obtained by different methods of cultivation. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. 1(84), 14-18. DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.14–18

Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. Бороменський, Д.О., & Аль-Маалі Г.А. (2018). Культуральні та мікроморфологічні особливості міцелію різних штамів грибів роду *Ganoderma*. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*, 12.
2. Бороменський, Д. О. (2019). Вміст ендополісахаридів у міцелії різних штамів грибів роду *Ganoderma* отриманого методом глибинного культивування. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*, 54.
3. Бороменський, Д.О., Герасимнюк, В.О., Кравченко, Є.І., & Мірошниченко, М.С. (2018). Інтродукція в культуру перспективних для біотехнології видів макроміцетів. *ІІ Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «біотехнологія: досвід, традиції та інновації»*, 15.
4. Веденичова, Н.П., Аль-Маалі, Г.А., Бороменський, Д.О., Бісько, Н.А., Косаківська, І.В., Гарманчук, Л.В., & Остапченко, Л.І. (2021). Протипухлинна активність цитокінінових екстрактів з міцелію лікарських грибів *Ganoderma lucidum* і *Lentinula edodes in vitro*. *Planta+ наука, практика та освіта*, 294-298.
5. Boromenskyi, D.O., & Al-Maali, G.A. (2018). Продуктивність за полісахаридами різних штамів грибів роду *Ganoderma* (P. Karst). *VII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»*, 22.