

ПРВИ НАЛАЗ БУКОВАЧЕ (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer) НА ПИТОМОМ КЕСТЕНУ (*Castanea sativa* Mill.)

ДРАГАН КАРАЏИЋ¹
ИВАН МИЛЕНКОВИЋ²

Извод: Гљива *Pleurotus ostreatus* узрокује белу трулеж на лишћарским врстама дрвећа. Плодоносна тела гљиве су месната, мека и јестива (печурке). Пошто се особито често јавља на трупцима и пањевима букве у народу је позната под називом буковача. У литератури није забележено да се јавља на питомом кестену тако да је ово први налаз. Молекуларна истраживања изолата добијеног из дрвета питомог кестена су потврдила да је у питању гљива *P. ostreatus* и секвенца прослеђена у NCBI базу података доступна је јавности под приступним кодом: KF309193.

Кључне речи: *Pleurotus ostreatus*, буковача, питоми кестен, *Castanea sativa*, Србија.

THE FIRST FINDING OF OYSTER MUSHROOM (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer) ON SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)

Abstract: The fungus *Pleurotus ostreatus* causes white rot on deciduous tree species. Its fruiting bodies (mushrooms) are fleshy, soft and edible. Its English common name is oyster mushroom. It most commonly grows on beech trunks and stumps. It has not been documented in literature that it also grows on sweet chestnut, so this is the first finding. The molecular research of the isolate obtained from sweet chestnut wood confirmed the presence of the fungus *P. ostreatus*. The partial sequence sent to the NCBI database is available to the public under the access code: KF309193.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, oyster mushroom, sweet chestnut, *Castanea sativa*, Serbia.

1. УВОД

Pleurotus ostreatus је лигниколна гљива која на лишћарским врстама узрокује белу трулеж. Веома често се јавља на сувим стаблима, мртвим деловима живих стабала, лежавинама (трупцима заосталим у шуми после сече) и пањевима. Међу лишћарским врстама особито је честа на букви (одакле и долази назив буковача) и тополама. Печурке се могу наћи скоро током целе године, али су најчешће у току јуна, јула и септембра. Када је у питању буква, ова гљива понекад колонизира и још увек жива стабла (понаша се као паразит слабости), а на тополама (нпр. црној тополи и еуроамеричким тополама) се углавном јавља на лежавинама (трупцима) и пањевима. Међу четинарским врстама до сада је констатована само на јели и то на стаблима која су претходно осушена услед напада имеле (*Viscum album* f.sp. *abietis*). Ипак,

¹ др Драган Караџић, ред. проф., Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Београд

² Иван Миленковић, дипл. инж., истраживач сарадник, Институт за шумарство, Београд

на јели је веома ретка (углавном су то биле мешовите шуме букве и јеле, па се може предоставити да је гљива са букве прешла на јелу).

P. ostreatus узрокује трулеж дрвета, па према томе наноси штете шумској привреди. Међутим, како су плодносна тела јестива, ова гљива је у народу познатија као јестива гљива. Буковача се данас и вештачки производи (на буковим трупчићима, слами, кукурузовини, пиљевини и сл.). Различите врсте печурке су веома честе на пијачним тезгама где се продају заједно са различитим поврћем и воћем. Међу печуркама најчешће су присутни шампињони, вргањ, буковача, шитаки, лисичарка, смрчак и сл. (слика 1).



Слика 1. Продаја свежих печурки на пијаци
(Фото Д. Карацић, Дизелдорф 5.05.2013)

Figure 1. Fresh mushrooms on the market place
(Photo D. Karadžić, Düsseldorf, 5.05.2013)

Буковача до сада није никада забележена на питомом кестену. У току истраживања сушења питомог кестена у околини Врања, из дрвета сувих стабала изолована је гљива *P. ostreatus*. Изолат је добијен из једне суве гране пречника 20 cm. Примарни узрок сушења ових стабала је била патогена гљива *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr (проузроковач рака коре питомог кестена). На сувим стаблима веома често су налажена и плодносна тела лигниколне гљиве *Fistulina hepatica* Schaeff.: Fr., док су печурке *P. ostreatus* ретке.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Материјал је сакупљен на подручју околине Врања (лок. Собина). Изолација је извршена из трулог дрвета суве гране. На кори гране су била присутна плодносна тела (перитецијске и пикнидске строме) патогене гљиве *Cryphonectria parasitica*. Изолација је извршена на хранљивој подлози MEA (малц-екстракт агар подлога спремљена по методу Booth, С., 1971) и на селективној подлози за изолацију трулежница из дрвета (Hale, M. D., Savory, J. G., 1976). Кључ за идентификацију културе гљиве *Pleurotus ostreatus* урађен је према методу Nobles, K. M., 1948, 1964. За израду кључа узимани су у обзир следећи критеријуми: домаћин (лишћари или четинари); боја мицелије; реакција на подлози са садржајем галне и танинске киселине; сепарација хифа (присуство или одсуство везица и сл.); присуство или одсуство специјалних структура на хифама; присуство или одсуство хламидоспора, конидија, оидија; брзина раста колоније (на 20°C); плодношење у култури после 6 недеља и промена боје агара испод колоније.

Испитивање лучења оксидаза (реакција и раст) извршено је на MEA подлози са додатком 0,5% галне и танинске киселине. На основу интензитета дифузионе зоне и брзине раста колоније на овим подлогама (после 8 и 14 дана), одређена је група којој гљива *Pleurotus ostreatus* припада (Davidson, W. R. *et al.*, 1938).

Потврда идентификације врсте, такође, урађена је на основу молекуларних истраживања (молекуларна идентификација).

Након извршене морфолошке класификације добијених изолата, одабран је репрезентативни изолат из кога је екстрахован rDNA уз помоћ GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich® GmbH, Germany), пратећи препоруке произвођача. PCR реакције су изведене помоћу прајмера ITS1f и ITS4 (White, T.J. *et al.* 1990), и то у реакцијама од по 50µl, које су садржале 50-100ng генског DNK, по 250 nM оба прајмера, по 200µM dNTP, 1 mM MgCl₂, 1 јединица *Taq* полимеразе, 1 x Q раствор, и 1 x PCR buffer (Qiagen Ltd., Valencia, CA, USA). Реакције су изведене у PTC-200™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) машини, а PCR протокол је био као у табели 1.

Табела 1. PCR протокол, време и број циклуса
Table 1. PCR protocol, time and number of cycles

Фазе PCR-a PCR steps	Температура(°C) Temperature (°C)	Време Time	Бр. циклуса Noof cycles
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	95	30 s	35
Annealing	55	30 s	
Extension	72	50 s	
Final extension	72	10 min	1

Провера успеха реакције је изведена постављањем дела продуката на 1.5% ТБЕ-агарозни гел. PCR продукти су пречишћавани помоћу A&A

Biotechnology (Gdynia, Poland) комплекта за пречишћавање пратећи упутства произвођача. Пречишћени PCR продукти су секвенцирани у реномираној лабораторији Genomed S.A., Warsaw, Poland. Слагање секвенци је изведено са допуњујућим DNK продуктима секвенцирања а резултати су поређени са NCBI колекцијом нуклеотида (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

3.1. Морфолошке карактеристике гљиве *Pleurotus ostreatus*

P. ostreatus образује плоносна тела печурке. Шешир је пречника 6-14 cm, у почетку конвексан, а затим раван, по ободу таласаст, у боји варијабилан: сив, сиво-љубичаст, сиво-плавичаст, сив са нијансом црне боје, а најчешће сиво-смеђ. Хименофор је састављен из листића. Листићи лагано силазе низ дршку, у почетку су бели, а затим са нијансом жуте боје. Дршка је 2-3 cm x 1-2 cm (дужина x ширина), ексцентрична (обично са стране), а понекад недостаје, бела са вунастом основом (слика 2). Месо је бело, пријатног мириса и укуса. Отисак спора је сивкасто-љубичаст. Базидиоспоре су субцилиндричне, величине 7,5-11 x 3-4 μm . (Караџић, Д., 2010).



Слика 2. *Pleurotus ostreatus* - плоносна тела гљиве (печурке)
Figure 2. *Pleurotus ostreatus* - fruit bodies (mushrooms)

Чиста култура изолована из питомог кестена беле је боје, полуваздушна, средње брзог раста, после 4 недеље раста присутна је колонија по ободу са бледо розикастом нијансом (слика 3). На селективној подлози (Hale, M. D., Savory, J. G., 1976), после 5-6 недеља раста на температури од 20°C почиње са производњом плоносних тела. На подлози са додатком галне и танинске киселине после 8 (односно 14) дана показује позитивну оксидазну реакцију. Интензитет реакције је на обе подлоге (МЕА са додатком 0,5% галне, односно 0,5% танинске киселине) оцењен са + + +. Дифузиона зона је светло до тамносмеђа, шири се на краткој дистанци од обода мицелије и видљива је

са горње стране. Мицелија не расте на подлози са додатком галне киселине, док је раст на подлози са танинском киселином у траговима. На основу реакције на овим подлогама и брзине раста гљива *Pleurotus ostreatus* сврстана је у 5 групу.



Слика 3. *Pleurotus ostreatus* – мицелија (чиста култура) изолована из дрвета питомог кестена (после три недеље раста на 20°C, подлога MEA)

Figure 3. *Pleurotus ostreatus* – Mat (pure culture) isolated from sweet chestnut wood (after 3 weeks of growth at 20°C, MEA medium)

Идентификациони кључ за културу *P. ostreatus* изоловану из питомог кестена је:

Key PATTERN. 1 1 1P 1 9 2 2 2 2 2 2

Објашњење кључа: 1 (домаћин: лишћари), 1 (боја бела), 1P (реакција на галној и танинској киселини: позитивна), 1 (септирање хифа: присутне везице – Clamp connections), 9 (специјалне структуре: нема), 2 (хламидоспоре: одсутне), 2 (конидије: одсутне), 2 (оидије: одсутне), 2 (брзина раста на MEA подлози: раст средње брз, петри посуда пречника 9 cm испуни се после три недеље раста), 2 (плодоношење: на подлози MEA нема плодоношења, али на селективној подлози почиње са плодоношењем после 6 недеља раста), 2 (реакција на агару: реакције на агару најчешће нема, али понекад се јавља златно жута боја после 6 недеља раста).

3.2. Молекуларна истраживања

Резултати ових истраживања дати су у тебели 2.

Коришћени ITS1f и ITS4 прајмери су без проблема амплификовали ITS секвенцу одабраног изолата. Након секвенцирања и поређења са Blast NCBI базом података, сличност са првих десет секвенци *Pleurotus ostreatus* кретала се у распону 97 – 100%, што се у потпуности поклапа са предходно извршеном морфолошком идентификацијом изолата. Секвенца је прослеђена у NCBI базу података (табела 2) и доступна је јавности под

приступним кодом: KF309193.

Табела 2. Секвенца изолата *Pleurotus ostreatus* добијеног са питомог кестена и приступни код у банци гена

Table 2. Partial sequence of *Pleurotus ostreatus* isolate from sweet chestnut wood and GenBank access code

Pleurotus ostreatus strain Vranje/19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence					
GenBank: KF309193.1					
LOCUS	KF309193	741 bp	DNA	linear	PLN 31-JUL-2013
DEFINITION	Pleurotus ostreatus strain Vranje/19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	KF309193				
VERSION	KF309193.1 GI:527178818				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Pleurotus ostreatus (oyster mushroom)				
ORGANISM	Pleurotus ostreatus Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pleurotaceae; Pleurotus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 741)				
AUTHORS	Karadzic,D.M. and Milenkovic,I.				
TITLE	Presence of Pleurotus ostreatus on different hosts in Serbia				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 741)				
AUTHORS	Karadzic,D.M. and Milenkovic,I.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (01-JUL-2013) Forest Protection, University of Belgrade-Faculty of Forestry, Kneza Visislava 1, Belgrade 11030, Serbia				
COMMENT	##Assembly-Data-START## Assembly Method :: BioEdit v. v7.1.3 Sequencing Technology :: SOLiD ##Assembly-Data-END##				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..741 /organism="Pleurotus ostreatus" /mol_type="genomic DNA" /strain="Vranje/19" /isolate="19" /host="Castanea sativa" /db_xref="taxon:5322" /country="Serbia" /collected_by="Dragan Karadzic" /identified_by="Dragan Karadzic" /PCR_primers="fwd_name: its1f, fwd_seq: cttggtcatttagaggaagtaa, rev_name: its4, rev_seq: tcctccgcttattgatg"				
misc RNA	<1..>741 /note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"				

ORIGIN

```

1 cattaatgaa ttcactatgg agttgttgct ggctcttagg ggcatgtgca cgcttctaacta
61 gtcttttcaac cacctgtgaa cttttgatag atctgtgaag tcgtctttca agtcgtcaga
121 cttgggtttgc tgggatttaa acgtctcggg gtgacaacac agtctattta cttaacacac
181 cccaaatgta tgtctacgaa tgtcatttaa tgggccttgt gcctataaac cataatacaa
241 ctttcaacaa cggatctctt ggctctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag
301 taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatccttg aacgcacctt gcgccccttg
361 gtattccgag gggcatgcct gtttgagtgt cattaaattc tcaaactcac tttggttttt
421 ttccaattgt gatgtttgga ttgttggggg ctgctggcct tgacaggctg gctcctctta
481 aatgcattag caggacttct cattgcctct gcgcatgatg tgataattat cactcatcaa
541 tagcacgcat gaatagagtc cagctctcca atcgtccgca aggacaattt gacaatttga
601 cctcaaatca ggtaggacta cccgctgaac ttaagcatat caataagcgg agggaaaagaa
661 actaacaagg attcccctag taactgcgag tgaagcggga aaagctcaaa tttaaatctt
721 ggtggtcttt ggccatccga g

```

4. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведених истраживања, дошло се до следећих закључака:

- *P. ostreatus* је проузроковач беле трулежи лишћара, а најчешће се јавља на дрвету букве и тополама;
- први пут је ова гљива изолована и из дрвета питомог кестена;
- гљива је изолована из трулих грана стабала кестена претходно убијених услед паразитске активности гљиве *Cryphonectria parasitica* (проузроковач рака коре питомог кестена);
- истражујући морфолошке карактеристике добијеног изолат гљиве из питомог кестена добијен је идентификациони кључ за културу *P. ostreatus* (Key PATTERN. 1 1 1P 1 9 2 2 2 2 2 2);
- молекуларна истраживања су потврдила да је у питању гљива *P. ostreatus* и секвенца прослеђена у NCBI базу података доступна је јавности под приступним кодом: KF309193;
- мада су изолати гљиве из питомог кестена и букве морфолошки веома слични уочена је и једна мала разлика. Изолат из питомог кестена после 5(6) недеља на селективној подлози почиње по ободу петри посуде да формира плоносна тела, док код изолат из букве то није примећено. Ово нам указује на то да је изолат из питомог кестена плоносно јачи па би могао да се искористи у практичној производњи буковаче. Свакако да ово треба потврдити даљим истраживањима *in vivo*. Уколико би се то доказало као тачно, пружа нам се могућност да коришћењем овог изолат произведемо инокулациону мицелију која би касније у директној производњи дала већи принос печурака.

Напомена: Овај рад је реализован у оквиру пројекта „Одрживо газдовање укупним потенцијалима шума у Републици Србији” (ТР 37008, Финансира Министарство за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије).

Захвалност. Аутори су посебно захвални *dr Katarzyna Sikora* (Forest Research Institute - IBL, Poland) на указаној помоћи у лабораторији приликом молекуларних истраживања.

ЛИТЕРАТУРА

- Booth, C. (1971): Methods in Microbiology. Volume 4, Academic Press, London and New York, 1-795.
- Davidson, W. R., Campbell, W. A., Blaisdell, J. D. (1938): Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. Journal of Agricultural Research, Vol. 57, No. 9., 683-695.
- Hale, M. D., Savory, J. G. (1976): Selective agar media for isolation of Basidiomycetes from wood – A Review. Int. Biodeterior. Bull. 12 (4), 112-115.
- Караџић, Д. (2010): Шумска фитопатологија. Универзитет у Београду Шумарски факултет. Београд. (стр. 1-774)
- Nobles, K. M. (1948): Studies in Forest Pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. Canadian Journal of Research, Vol. 26, Sec.C., 281-431.
- Nobles, K. M. (1965): Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. Canadian Journal of Botany, Volume 43, 1097-1139.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds), pp. 315–321. Academic Press, New York
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

THE FIRST FINDING OF OYSTER MUSHROOM (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer) ON SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)

Dragan Karadžić
Ivan Milenković

S u m m a r y

Pleurotus ostreatus is a lignicolous fungus which causes white rot on deciduous tree species. It most commonly grows on dead trees, dead parts of living trees, felled logs (remaining in the forest after felling) and stumps. Among deciduous tree species, it is especially frequent on beech (from which its Serbian common name is derived) and on poplars. Oyster mushrooms can be found almost throughout the year, but most often during June, July and September. In the case of beech, it sometimes colonises still living trees (it behaves as a parasite of weakness), and as for poplars (e.g. black poplar and Euroamerican poplars), it grows mainly on felled logs and stumps. Among coniferous species, it has so far been identified only on fir, on the trees previously killed by the attack of mistletoe (*Viscum album* f.sp. *abietis*). Still, it is very rare on fir (they were mainly mixed forests of beech and fir, so it can be presumed that the fungus was spread from beech to fir).

It has not been documented in literature that it also grows on sweet chestnut, so this is the first finding. The fungus was isolated from decayed branches of sweet chestnut trees previously killed by the parasitic effect of *Cryphonectria parasitica* (causal agent of sweet chestnut blight or bark canker disease). The following key pattern for the plantation *P. ostreatus* (KEY PATTERN 1 1 1P 1 9 2 2 2 2 2) was obtained based on the research of morphological characters of the fungal isolate from sweet chestnut. The molecular research confirmed the presence of the fungus *P. ostreatus*. The partial sequence sent to the NCBI database is available to the public under the access code: KF309193. Although fungal isolates from sweet chestnut and beech are morphologically very similar, there is a minor difference. In the isolate from sweet chestnut, fruiting bodies started forming along the margins of Petri dishes after 5(6) weeks in a selective medium, whereas this did not occur in the isolate from beech. This indicates that the isolate from sweet chestnut has a more intensive fructification potential, so it could be used in the practical production of oyster mushrooms. However, this has still to be confirmed by further research *in vivo*. If proved true, it will be possible to use this isolate in the production of the inoculation mycelium which can lead to a *higher yield of mushrooms* in direct production.