


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного

На правах рукопису

Григанський Андрій Пилипович

БІОЛОГІЯ ВИДІВ РОДУ *AGARICUS* L.: FR. EMEND. KARST.
У ЧИСТІЙ КУЛЬТУРІ



(03.00.24 - мікологія)

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ, 1995

Дисертація в рукописі

ЛНБ України ім.В.Стефаніка

Робота виконана у в.



ім. М.Г. Холодного НАН Укр.

00761186 (Т)

Науковий керівник - Лауреат Державної премії УРСР, доктор біологічних наук А.С. Бухало.

Офіційні опоненти - чл.-кор. НАН України, доктор біологічних наук С.П. Вассер.

- кандидат біологічних наук

І.А. Еланська.

Провідна організація - Донецький державний університет.

Захист відбудеться "...." 1995 р. о
..... год. на засіданні спеціалізованої Вченої ради
Д 50.06.01 в Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН
України за адресою: 252004, Київ-4, вул. Терещенківська, 2.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за адресою: 252025,
Київ-25, вул. В. Житомирська, 28.

Автореферат розісланий "...." 1995 р.

/ Вчений секретар

спеціалізованої Вченої ради

кандидат біологічних наук

І.Л. Навроцька

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сучасна мікологічна наука при вирішенні питань систематики, походження та еволюції грибів значну увагу приділяє вивченню вегетативної стадії їх розвитку в культурі як додатковому таксономічному критерію і джерелу цінних даних при таксономічних та філогенетичних побудовах. Використання культуральних ознак вищих *Basidiomycetes* дозволяє виробити єдину концепцію виду на основі вивчення повного циклу гриба, а не лише вищої стадії плодоношення, якій раніше приділяли основну увагу. Культуральний метод дозволяє ввести нові морфологічні та фізіолого-біохімічні критерії, подібні до тих, що широко використовують в мікробіології. Під *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. займає визначне місце в системі вищих *Basidiomycetes* як типовий в порядку *Agaricales* Clem., за кількістю представників та значенням їх у природних екосистемах, наявністю в складі роду видів цінних їстівних грибів, які є найбільш поширеними у світі об'єктами промислового культивування. Класифікація роду *Agaricus* традиційно побудована переважно за макро- та мікроморфологічними ознаками плодових тіл його представників. Таксономічна концепція роду, кількість видів у ньому і філогенетичні зв'язки між ними досить неоднозначно трактуються різними дослідниками (Pilát, 1951; Singer, 1975, 1986; Вассер, 1980, 1985; Гарібова, 1982; Bohus, 1995). Кількість ознак для таксономічної характеристики роду може бути значно збільшена при вивченні вегетативної стадії росту, яку можна дослідити в чистій культурі. Культурально-морфологічні ознаки детально досліджено лише у *A. bisporus* і *A. bitorquis* - видів, що культивуються промислово. Певну увагу приділено також видам,

перспективним для впровадження в промислове грибівництво, і таким, що досить часто трапляються в природних умовах (Chang, Hayes, 1978; Flegg, Spencer, Wood, 1985; Singer, Harris, 1987). Більшість відомих видів печериць в культурі досліджені дуже неповно або не досліджені зовсім. Всебічне вивчення біології культур різних видів роду *Agaricus* в чистій культурі сприятиме побудові більш досконалої класифікації цього роду та розширенню сфери їх практичного застосування. Дослідження чистих культур видів печериць особливо актуальне ще й тому, що абсолютна більшість представників роду в природі є рідкісними і підтримання їх в колекціях культур - ефективний шлях збереження генофонду.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було різнобічне вивчення біологічних особливостей 17 видів роду *Agaricus* в чистій культурі із застосуванням арсеналу сучасних методів та визначення таксономічного і екологічного значення встановлених характеристик. Для досягнення поставленої мети вирішувались такі завдання:

1. Охарактеризувати ріст культур з використанням ротового коефіцієнта та морфологію міцеліальних колоній на агаризованих середовищах різного складу.
2. Дослідити вплив температурного фактора на ріст, морфологію та життєдатність культур.
3. Виявити особливості морфології структурних елементів вегетативного міцелію методами світлової, флуоресцентної та скануючої електронної мікроскопії.
4. Визначити спектр ензимів культур з використанням якісних кольорових хімічних реакцій.
5. Дослідити кількість ядер у клітинах, вміст в ядрах

ДНК та флуоресценцію гіф вегетативного міцелію і визначити можливість використання цих ознак як таксономічних критеріїв.

6. Використати отримані дані для таксономічної та екологічної характеристики досліджених культур.

7. З'ясувати можливість вирощування промислових штамів *A. bisporus* та *A. bitorquis* на поживних середовищах, що включають відходи технології виробництва зернового посівного міцелію.

Основні положення, що вносяться на захист:

1. Досліджені морфологічні і фізіолого-біохімічні характеристики вегетативного міцелію культур видів роду *Agaricus* (тип, температурні межі та швидкість росту колоній, пряжки, анаморфи, кількість ядер у клітинах, вміст ДНК в ядрах, флуоресценція та інкрустація гіф) мають таксономічне значення.

2. Культурально-морфологічні ознаки (тип колоній, еназиматичні тести) корелюють з екологічним статусом видів.

Наукова новизна і практична цінність. Із застосуванням широкого арсеналу сучасних методик досліджено вегетативну стадію 17 видів типового для порядку *Agaricales* роду *Agaricus*, більшість яких є рідкісними в мікобіоті України. В чистій культурі ці види раніше зовсім не вивчалися або були досліджені неповно. Одержані нові відомості щодо їх біології у вегетативній стадії росту. Вперше методом СЕМ досліджені мікроструктури вегетативного міцелію більшості видів і зроблені висновки про їх таксономічне або функціональне значення; встановлено спектр еназимів, що характеризують основні шляхи метаболізму культур; оцінено ріст культур; описана морфологія колоній і визначена їх кореляція з екологічним

статусом видів; встановлене відношення до температурного фактора. Одержані нові для роду *Agaricus* відомості про вміст ДНК в ядрах і флюоресценцію гіф, про кількість ядер у клітинах вегетативного міцелію та висловлена думка про таксономічне значення цих ознак на рівні виду або роду. Отримані дані з біології досліджених культур сприятимуть збереженню генофонду видів печериць, зокрема рідкісних, у спеціалізованих колекціях.

Як єдиний компонент поживних агарових середовищ в біотехнології промислового культивування видів роду *Agaricus* запропоновано використовувати відвари зерна, що є відходами виробництва посівного міцелію. Встановлено, що домінуючий в шампінйонних компостах термофільний дейтеромицет *Humicola insolens* стимулює ріст культур копрофільних видів роду *Agaricus*. Характеристики дикорослих штамів *A. bisporus* та *A. bisporus*, а також перспективних для промислового вирощування інших видів роду *Agaricus* можуть бути використані при впровадженні цих штамів у виробництво. Вісім штамів чотирьох видів, виділених дисертантом з плодкових тіл дикорослих печериць, передані в Колекцію культур *Basidiomycotina* Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Апробація роботи та публікації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на засіданнях відділу мікології, сектора спорових рослин та Вченої ради Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного; лабораторії фізіології та семінарі зі спеціальності "Ботаніка" Інституту ботаніки Регенсбурзького університету (Регенсбург, Німеччина, 1994, 1995), IV Нараді з промислового культивування їстівних грибів (Донецьк, 1993); науковій конференції "Охорона гено-

фонду рослин в Україні" (Кривий Ріг, 1994); VII Міжнародно-му конгресі з проблем мікології (Прага, Чехія, 1994); V Міжнародному мікологічному конгресі (Ванкувер, Канада, 1994), 20-й конференції Німецького товариства друзів та дослідників грибів (Крефельд, Німеччина, 1995), 20-му з'їзді Чехословацького мікробіологічного товариства (Острава, Чехія, 1995), 5-му з'їзді Товариства мікології і ліхенології Німеччини (Грайфовальд, Німеччина, 1995).

Робота виконана у відділі мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Частина фізіологічних та мікроскопічних досліджень була проведена в лабораторії фізіології грибів Інституту ботаніки Регенсбурзького університету, за що ми щиро дякуємо проф. Х.П. Моліторісу та проф. А. Брезіньському.

За матеріалами досліджень опубліковано вісім праць.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, шести розділів експериментальної частини, висновків та списку літератури, що містить 307 найменувань. Дисертація викладена на 193 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 11 таблицями і 39 рисунками.

Розділ 1. Напрямки досліджень видів роду *Agaricus* L.:

Fr. emend. Karst. в чистій культурі. Огляд літератури.

Під *Agaricus* займає важливе місце в таксономії класу *Basidiomycetes*, природних екосистемах, є важливими для діяльності людини (Вассер, 1980; Singer, Harris, 1987). Незважаючи на те, що морфологію плодових тіл, ареали та екологію видів роду досить давно і повно досліджували багато видатних мікологів (Konrad, Maublanc, 1948-1952; Moeller, 1950-1951; Pilat, 1951; Heinemann, 1953; Singer, 1975, 1986; Вассер,

1980, 1985; Bohus, 1990), у вегетативній стадії росту більш детально вивчено лише *A. bisporus* та *A. bitorquis* - види, що культивуються промислово (Treschow, 1944; Dijkstra, 1976; Chang, Hayes, 1978; Flegg, Spencer, Wood, 1985; Stamets, 1994). Дослідженнями з окремих аспектів біології в фази міцеліального росту в чистій культурі охоплено менш як 10% видів роду (Semerdzieva, 1965; Гарибова, Шалашова, 1973; Гарибова, Сафрай, 1980; Raper, Kaye, 1980; Гарибова, 1982).

Розділ 2. Об'єкти і методи дослідження

Об'єктами дослідження були 27 штамів 17 видів роду *Agaricus* з колекції культур вищих *Basidiomycetes* відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Вивчення росту і морфології чистих культур представників роду проведено на чашках Петрі на агаризованих середовищах різного складу: картопляно-глюковому агарі (КГА), сусло-агарі (СА), агаризованому глюкозо-пептон-дріжджевому екстракті (ГПДА), компостному агарі (КА) та агаризованих відварах зерна злакових культур: пшениці, жита, ячменю та проса. Культури, крім спеціальних дослідів, інкубували при 26 °С. Вплив температурного фактору досліджено на КГА при 4, 22, 26 та 37 °С. Оцінку росту проводили за допомогою ростового коефіцієнта (РК) (Бухало, 1988). Біотичну дію *Humicola insolens* на культури видів роду *Agaricus* вивчали при сумісному їх культивуванні на СА та КА (Op den Kamp et al., 1990). Спектр ензимів вивчали з використанням кольорових хімічних тестів за програмою скринінгу, описаною у праці Х.П. Моліторіса та К. Шаумана (Molitoris, Schaumann, 1986).

У світловому мікроскопі культури досліджували за загальноприйнятою методикою (Методи експериментальної мікології).

гии, 1982). Забарвлювали препарати (цитофлюорохромом DAPI) та флуорометрію ядер проводили за методикою, описаною у праці В. Майкнер та А. Брезінського (Meixner, Bresinsky, 1988), а скануючу електронну мікроскопію (СЕМ) досліджених культур - за модифікованим методом Е. Квательбаума та Г. Карнера (Buchalo, Zakordonec, Sasek, 1983).

Одержані результати статистично оброблені за загальноприйнятими методиками (Лакін, 1973). У таблицях і розрахунках наведені середні дані не менш як трьох-чотирьох повторностей. Таблиці і діаграми побудовані в MICROSOFT EXCELL 5.0 та MICROSOFT WORD 6.0. Для підтвердження поділу досліджених видів роду *Agaricus* на екологічні групи використано математичний експрес-метод для класифікації біологічних об'єктів ФЛАМЕНКО (Котов, Терентьева, 1992).

Розділ 3. Культурально-морфологічне дослідження на агаризованих поживних середовищах

Швидкість росту колонії є одним з найважливіших фізіологічних характеристик будь-якого мікроорганізму, зокрема і гриба. Ми характеризували ріст міцеліальних колоній значенням ростового коефіцієнта (РК) культури.

Значення РК всіх культур на використаних середовищах не перевищувало 50 балів (Табл. 1). Тому всі досліджені нами види роду *Agaricus* віднесені, за класифікацією А.С. Бухало (1988), до категорії повільноростучих. Для росту вегетативного міцелію більшості видів роду *Agaricus* найкращим середовищем виявився СА. Найнижчими ростові показники були на КА (РК < 5). Нам не вдалося встановити чіткої кореляції між належністю виду до певної еколого-трофічної групи і величиною РК. Показано, що РК на еталонному поживному середовищі при пев-

Табл. 1. Рістий коефіцієнт (РК) колоній видів *Agaricus* на різних поживних середовищах

РК= (щільність x висота x діаметр)/вік колоній

Вид, штам	Рістий коефіцієнт/середовище			
	СА	КГА	КА	ГПДА
Підрід <i>Agaricus</i>				
<i>A. bresadolianus</i> 104	1,7	1,1	1,4	1,4
<i>A. campestris</i> 144	4,1	7,2	1,9	2,8
<i>A. vaporarius</i> 293	1,9	1,5	1,0	5,0
<i>A. squamuliferus</i> 124	9,0	15,4	2,4	4,7
- - 158				1,3
<i>A. sylvaticus</i> 37	4,6	3,3	1,0	3,1
<i>A. subfloccosus</i> 292	15,1	12,3	4,2	9,1
<i>A. bisporus</i> 4	4,4	3,5	2,3	3,6
- - 36	3,7	4,5	2,1	6,1
- - 288	6,4	4,2	3,2	10,5
- - 289	6,3	4,4	3,3	5,8
- - 290	8,4	5,9	4,5	6,9
<i>A. bitorquis</i> 143	7,0	4,8	1,7	4,1
<i>A. bernardiiformis</i> 156	8,4	3,7	0,0	1,5
Підрід <i>Flavoagaricus</i>				
<i>A. excellens</i> 145	20,9	6,5	0,9	1,3
<i>A. maskae</i> 157	6,9	3,2	0,0	4,2
<i>A. sylvicolus</i> 17	2,9	2,4	0,7	3,9
<i>A. macrocarpus</i> 114	8,1	3,3	1,6	2,5
- - 150	1,9	1,4	1,0	2,5
<i>A. abruptibulbus</i> 284	14,4	9,6	2,4	7,6
<i>A. fissuratus</i> 208	4,1	3,4	3,4	2,3
<i>A. arvensis</i> 14	4,4	5,1	3,2	5,0
- - 15	41,5	39,0	24,2	31,1
- - 285	4,6	4,6	2,3	3,3
- - 286				1,1
<i>A. xanthodermus</i> 27				2,2
- - 294	1,2	1,4	0,9	2,6
(Середнє значення)	(7,8)	(5,5)	(1,7)	(5,1)

СА - сусло-агар

КГА - картопляно-глюкозний агар

КА - компостний агар

ГПДА - глюкозо-пептон-дріждж екстр.-агар

ній температурі культивування є важливою характеристикою штаму певного виду.

Щодо температурного фактора всі досліджені види є мезофілами (Підоплічко, 1953), але між ними виявлені певні відмінності. Міцелій більшості видів характеризується адатністю до повільного росту при 4 °С. У *A. bernardiiformis*, *A. bitorgius*, *A. campestris*, *A. sylvaticus*, *A. sylvicolus* спостерігався слабкий ріст при 37 °С. Оптимальна температура міцеліального росту деяких штамів одних і тих же видів (наприклад, *A. arvensis*, *A. bisporus*, *A. macrocarpus*) відрізняється, але в цілому температурні межі росту всіх штамів одного й того ж виду подібні між собою.

На використаних нами середовищах рієні представники роду *Agaricus* утворюють різноманітні за текстурою, забарвленням та іншими ознаками міцеліальні колонії. Ці культуральні ознаки залежать не тільки від належності культури до певного виду, але й від складу поживного середовища. Проведені дослідження показали значну диференціацію культурально-морфологічних ознак у різних представників роду *Agaricus*, які можна звести, за різними класифікаціями до трьох (Гарибова, Сафрай, 1982) або шести (Rareg, Кауе, 1980) основних типів, і підтвердили доцільність розподілу роду на три екологічні групи: сапротрофи-копрофіли, лучні та підтиличні сапротрофи. Незважаючи на певний суб'єктивізм оцінок культуральних ознак, тип колонії, за нашими даними, можна вважати ознакою цілком характерною для окремих видів, яка може бути використана як додатковий таксономічний критерій.

Ми вперше дослідили особливості росту і взаємодії культур рієних представників роду *Agaricus* з термофільним ґрун-

товим мікроміцетом *H. insolens* при сумісному культивуванні на СА та АК. Показано стимулюючу дію вегетативного міцелію всіх видів печериць на ріст *H. insolens*. Виявлено, що предоставники екологічної групи сапротрофів-копрофілів, насамперед *A. bisporus*, адатні до росту на поверхні колонії *H. insolens*, тимчасом як ріст колоній інших видів при контакті з колонією мікроміцета припиняється.

Ми вивчали можливість використання агаризованих відварів зерна пшениці, жита, ячменю і проса для лабораторного культивування різних видів шампінйонів. Серед агаризованих відварів алаків найкращий ріст культур, порівняно з таким на СА, КГА та КА, забезпечував агаризований відвар ячменю, а повільніший спостерігався на відварі жита. Одержані результати свідчать, що агаризовані відвари алакових культур, які є відходами виробництва посівного міцелію, доцільно використовувати для вирощування культур видів роду *Agaricus* в лабораторній практиці та при приготуванні маточної культури в промисловому грибівництві.

Розділ 4. Ензиматичні тести

Для таксономічної характеристики вищих *Basidiomycetes* використовують кольорові хімічні реакції на наявність певних еназимів, які проводять як на поверхні плодових тіл, так і на поверхні міцеліальних колоній (Singer, 1975; Stalpers, 1978, Вассер, 1980).

За допомогою якісних та напівкількісних кольорових еназиматичних реакцій (18 тестів) ми вперше в культурах роду *Agaricus* дослідили спектр еназимів, які досить повно характеризують метаболізм вуглецевих і азотних сполук, ліпідів, а також окисно-відновні процеси досліджуваних видів. Ми вияви-

ли, що представники роду *Agaricus* за наявності протеази і ензимів обміну вуглецевих сполук та інтенсивності забарвлення цих реакцій помітно поступаються видам дереворуйнуючих грибів, культури яких ми використовували нами для порівняння. В усіх досліджених нами видів зазначено відсутність нітрат-редуктази, що взагалі характерно для вищих *Basidiomycetes*. Тести на наявність ксиланази, тирозинази, ліпази та інтенсивність забарвлення реакції на *B*-глюкозидазу відрізняються у представників різних підродів роду *Agaricus*, що дозволяє за цією ознакою провести чітку фізіологічну межу між культурами цих таксонами. Показано, що наявність або відсутність певного ендриму, а також інтенсивність забарвлення реакції є штампспецифічними ознаками. Наявність ксиланази (Рис. 1) та інтенсивність забарвлення реакції на *B*-глюкозидазу та-

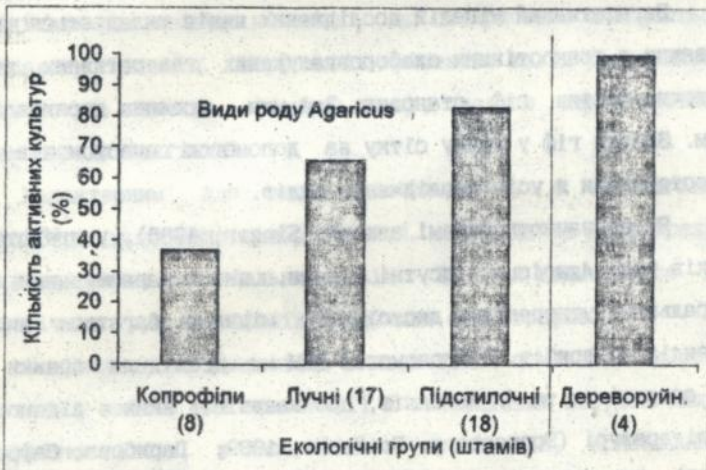


Рис. 1. Наявність ксиланази в культурах видів, що належать до різних трофічних груп

кож характеризують належність культур досліджуваних видів до різних екологічних груп. Таким чином, результати проведеного еназиматичного дослідження видів роду *Agaricus* можуть бути використані для екологічної і таксономічної характеристики представників роду, а також для скринінгу перспективних штамів-продуцентів тих чи інших еназимів.

Розділ 5. Мікроскопічне дослідження видів роду *Agaricus*

Ряд авторів показали, що мікроскопічні структури міцелію у вищих *Basidiomycetes* є важливою таксономічною характеристикою виду у вегетативній стадії росту, які несуть також інформацію про фізіологічний стан культури. Мікроскопічні дослідження представників роду *Agaricus* дуже неповні і виконані переважно методами світлової мікроскопії. Ми вперше вивчили значну кількість видів роду із застосуванням скануючої електронної та флуоресцентної мікроскопії.

Вегетативний міцелій досліджених видів складається переважно з тонкостінних слаборозгалужених генеративних гіф. Товщина клітин гіф становить 2-4 мкм, довжина досягає 150 мкм. Злиття гіф у єдину сітку за допомогою анастомозів ми спостерігали в усіх досліджених видів.

Як зазначають окремі автори (Singer, 1986), у представників роду *Agaricus* відсутні пряжки, які є характерними латеральними утвореннями диплоїдного міцелію багатьох видів базидійних грибів. За допомогою СЕМ ми дослідили пряжки у *A. campestris* та *A. arvensis*, про наявність яких є відомості в літературі (Sonnenberg, Fritsche, 1989; Гарибова, Сафрай, 1980). Пряжки у цих видів класичної форми, але без отвору та інкрустації на поверхні.

Відомо, що нестатеве спороношення відіграє важливу роль

в екології та еволюції грибів, зокрема вищих базидіоміцетів. Стадія анаморфи є суттєвим таксономічним критерієм на рівні виду у вищих *Basidiomycetes* (Nobles, 1958; Решетников, 1990). Ми виявили стадію анаморфи у восьми видів: *A. abruptibulbus*, *A. arvensis*, *A. bernardiiformis*, *A. fissuratus*, *A. macrocarpus*, *A. maskae*, *A. squamuliferus*. У них спостерігалась фрагментація міцелію на короткі паличковидні артро-сопри. Здатність утворювати стадію анаморфи зберігається в усіх досліджених штамів одного виду - отже є специфічною видовою ознакою.

Інкустація гіф міцелію була описана лише для кількох представників роду *Agaricus* (Бухало, 1988; Whitney, Arnott, 1987). Ми виявили утворення кристалів різноманітних форм та розмірів на гіфах усіх досліджених видів. За допомогою X-ray аналізу і при встановленні розчинності кристалів у різних органічних розчинниках показано, що ці кристали складаються з оксалату кальцію. Морфологія кристалів та їх різноманітність можуть служити, на нашу думку, певною таксономічною ознакою роду *Agaricus*.

Характерним для видів *A. bisporus*, *A. vaporarius*, *A. subfloccosus*, меншою мірою для *A. arvensis* та *A. campestris* є утворення міцеліальних тяжів. Ці види відносяться до екологічних груп копрофілів та лучних сапротрофів.

Незважаючи на важливість використання показника ядерного статусу клітин для таксономії і еволюційних побудов вищих базидійних грибів, є лише кілька публікацій, прив'язаних представникам роду *Agaricus*, в яких наводиться кількість ядер (Hou, Elliott, 1978; Sonnenberg, Fritsche, 1989; Wang, Wc, 1974). Ми встановили, що кількість ядер в клітинах окре-

мих видів відрізняється. Мінімальну кількість ядер у клітині (по два) мають *A. bitorquis*, *A. bresadolianus*, *A. squamuliferus*, *A. subfloccosus*, *A. xanthodermus*. Штами *A. abruptibulbus*, *A. macrocarpus*, *A. maskae*, *A. sylvicolus*, *A. vaporiarius* містять по два-чотири ядра. Чотири ядра в більшості клітин має *A. excellens*. Клітини *A. bisporus*, *A. campestris*, *A. fissuratus* містять здебільшого по чотири-шість ядер, *A. arvensis* - чотири-вісім, *A. sylvaticus* - шість-вісім ядер. Найбільша кількість ядер (4-10) характерна для *A. bernardiiformis*, причому переважають клітини з парною їх кількістю. Різні штами одного й того ж виду в основному виявилися подібними між собою за середньою кількістю ядер у клітині. Таким чином, можна вважати, що кількість ядер у клітинах вегетативного міцелію різних видів печериць є чіткою додатковою видовою таксономічною ознакою, за якою можна розрізняти види, близькі між собою морфологією плодових тіл і вегетативного міцелію.

Така важлива таксономічна ознака, як кількість хромосом, досі знаходить дуже обмежене застосування в таксономії грибів через труднощі їх підрахунку методами мікроскопії. Однак цитофлуоресцентними методами можливо точно і коректно виміряти вміст ДНК в окремому ядрі (Duran, Gray, 1989). Для представників роду *Agaricus* до наших досліджень подібні дані були відсутні. За 100% ми приймали вміст ДНК у ядрах *A. bisporus* 4, забарвлених DAPI. Найнижчий порівняно з контролем вміст ДНК у ядрі мають *A. abruptibulbus*, *A. arvensis*, *A. macrocarpus* 114, *A. maskae*, *A. sylvaticus* - 60-70% від такого у *A. bisporus* 4. Близько половини досліджених культур подібні між собою за цією характеристикою і мають значення інтен-

Підрид *Agaricus*

Підрид *Flavoagaricus*

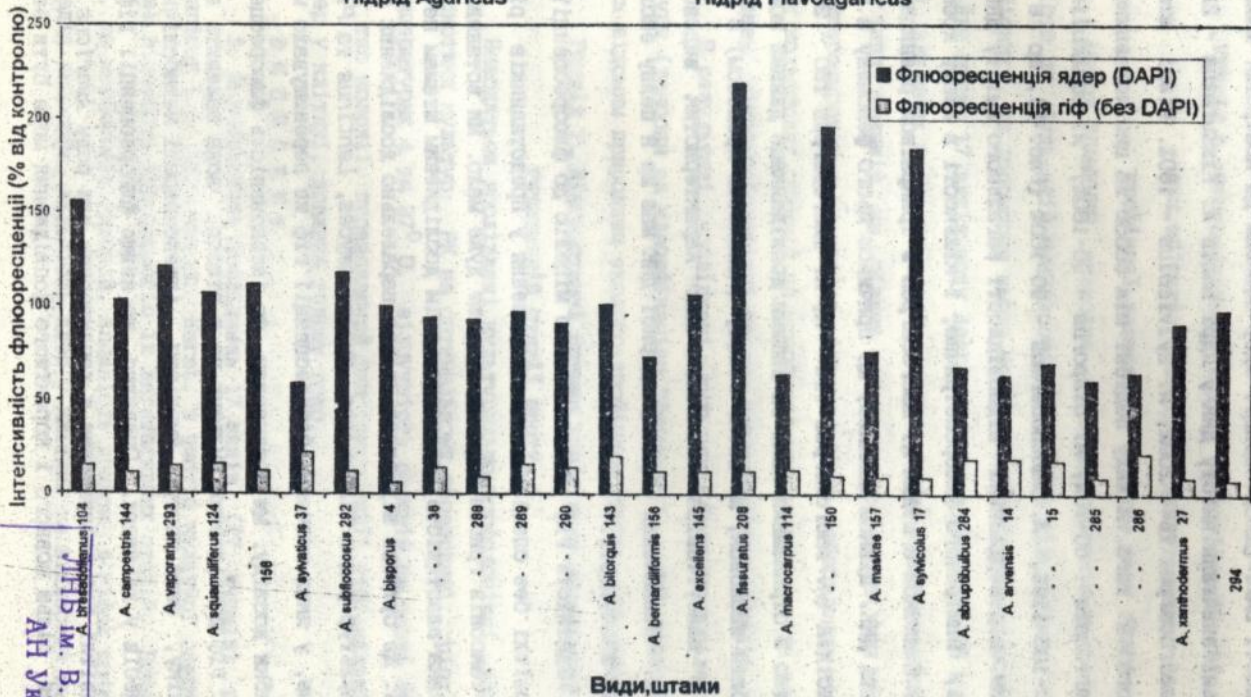


Рис. 1. Міст ДНК у ядрах та флюоресценція гіф

сивності DAPI-флуоресценції ядер бдиьке до контролю. Макимальні значення вмісту ДНК у ядрі мають *A. fissuratus* - 220%, *A. macrocarpus* 15 - 200%, *A. sylvicolus* - 180%. Ріані штами одного й того ж виду подібні між собою за цим показником: *A. arvensis* - 60-70%, *A. bisporus* - 90-100%, *A. squamuliferus* -105-115%, *A. xanthodermus* - 90-100% (Рис. 2), що є ще одним підтвердженням відповідності загального вмісту ДНК у ядрі, виміряного флуорометрично, і кількості в ньому хромосом. Винятком є штами *A. macrocarpus* з трикратною різницею у вмісті ДНК. Ціаьком можливо, що причиною цього феномену є поліплоїдія (*A. macrocarpus* 114 - n, *A. macrocarpus* 150 - 3n). Згідно з отриманими нами та іншими дослідниками даними можна зробити висновок, що обсяг геному (кількість хромосом) є одною з найсуттєвіших таксономічних характеристик видового рівня. Визначення вмісту ядерної ДНК має ще й певну екологічну значущість.

Здатність гіф вегетативного міцелію до флуоресценції в УФ-світлі без спеціального забарвлення у представників різних таксонів грибів вивчена поки ще дуже мало. Ми встановили, що така властивість характерна всім дослідженим штамам печериць. Це суттєво відрізняє їх від паралельно досліджених нами культур родів *Flammulina*, *Kuehneromyces*, *Lentinus* та *Pleurotus*, у яких значення флуоресценції гіф не перевищувало меж похибки досліду. Ми встановили, що інтенсивність флуоресценції гіф досліджених культур не є сталою, вона залежить від їх віку, фази росту, ймовірно, інтенсивності метаболічних процесів у клітинах. Очевидно, що явище флуоресценції гіф в УФ-світлі без забарвлення є характерним для роду *Agaricus* і після більш повного і коректного дослідження може бути зап-

ропонуване як додатковий таксономічний критерій.

Розділ 6. Застосування методу класифікації біологічних об'єктів "Фламенко" для уточнення еколого-трофічної належності культур роду *Agaricus*

Метод ФЛАМЕНКО дозволяє групувати організми за подібністю по будь-якій сукупності ознак - як кількісних, так і якісних. За допомогою цього методу ми побудували класифікаційну схему 17 видів роду *Agaricus*, представлених 25 штамми, для яких були визначені наведені нижче характеристики: РК і типи колоній на різних поживних середовищах при різних температурах культивування, інтенсивність забарвлення хімічних кольорових реакцій на монофенол-монооксигенази та пероксидазу, мікроморфологічні ознаки вегетативного міцелію.

В результаті досліджені культури були розподілені на групи (таксони за класифікацією "Фламенко"), які відповідають відомим природним еколого-трофічним групам роду *Agaricus*.

Розділ 7. Діагностичні ознаки видів роду *Agaricus* у вегетативній стадії росту

Наводяться досліджені культурально-морфологічні характеристики культур: РК на оптимальному середовищі, ріст при температурах 4 та 37⁰ С, відсутність реакцій на певні ензими, тип колонії, переважаючий тип інкрустації гіф, кількість ядер у клітині, довжина геному тощо.

ВИСНОВКИ

1. В результаті досліджень 17 видів (27 штамів) роду *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. в чистій культурі одержані нові відомості про біологію їх вегетативних стадій. Показано, що морфологія колоній, наявність прямих з гіфами прямих, стадія анаморфи, кількість ядер у клітині та відносний вміст

ДНК у ядрі є таксономічними ознаками на рівні виду. Тип колоній та якісні еназиматичні тести характеризують належність виду до тієї чи іншої екологічної групи. Види *A. bresadolianus*, *A. excellens*, *A. macrocarpus*, *A. subfloccosus*, *A. xanthodermus* досліджені в чистій культурі вперше.

2. Показано, що текстура та забарвлення колоній є сталими ознаками досліджених видів при культивуванні в певних умовах. За типом міцеліальних колоній досліджені види можна розділити на три групи, які в основному корелюють з відомими для видів цього роду природними екологічними групами: копрофіли - *A. bisporus*, *A. bitorquis*, *A. subfloccosus*, *A. vaporarius*; лучні сапротрофи - *A. arvensis*, *A. campestris*, *A. xanthodermus*; підстилочні сапротрофи - *A. abruptibulbus*, *A. bernardiiformis*, *A. bresadolianus*, *A. excellens*, *A. fissuratus*, *A. macrocarpus*, *A. maskae*, *A. squamuliferus*, *A. sylvaticus*, *A. sylvicolus*.

3. Дослідженням мікроструктур вегетативного міцелію, яке для більшості видів вперше проведено із застосуванням СЕМ, встановлено, що пряжки характерні для *A. arvensis* та *A. campestris*, стадія анаморфи (артроспори) зустрічається у *A. abruptibulbus*, *A. arvensis*, *A. bernardiiformis*, *A. fissuratus*, *A. macrocarpus*, *A. maskae*, *A. squamuliferus*; на вегетативному міцелії усіх досліджених культур утворюються численні кристали оксалату кальцію різних форми та розміру.

4. Отримані нові дані про кількість ядер в клітинах гіф досліджених видів. Показано, що різні види чітко різняться між собою за цим критерієм. Мінімальна кількість ядер (два) встановлена у *A. bitorquis*, *A. bresadolianus*, *A. squamuliferus*, *A. subfloccosus* та *A. xanthodermus*; максимальна (4-10)

у *A. bernardiiformis*.

Б. Вперше визначена відносна кількість ДНК у ядрах клітин міцелію досліджених видів і показано, що ця ознака є видоспецифічною. Мінімальний вміст ДНК у ядрі (60-70% від контролю) мають *A. abruptibulbus*, *A. arvensis*, *A. macrocarpus* 114, *A. maskae*, *A. sylvaticus*. Максимальна кількість ДНК (180-220%) визначена для *A. fissuratus*, *A. macrocarpus* 150, *A. sylvicolus*. Виходячи із вмісту ДНК, у досліджених видів роду вираховані кількість хромосом у ядрах, довжина геному, в окремих видів встановлена ді- і триплоїдія.

Б. Вперше показана здатність культур роду *Agaricus* до флюоресценції гіф в ультрафіолетовому світлі без забарвлення.

7. За допомогою якісних кольорових ензиматичних тестів в культурах досліджених видів вперше встановлений спектр ензимів, що характеризує метаболізм вуглеводів, ліпідів, азотних сполук та окисно-відновні процеси. Показано, що наявність чи відсутність певного ензиму та інтенсивність забарвлення реакції є штампспецифічною ознакою. Результати тестів на ліпазу, монофенол-монооксигенази, *B*-глюкозидазу відрізняються у представників різних внутрішньородових таксонів роду *Agaricus*. Тести на ксиланазу (наявність ензиму) та *B*-глюкозидазу (інтенсивність забарвлення) характеризують також належність культур досліджуваних видів до різних екологічних груп.

Б. Встановлено, що за швидкості росту, який характеризується показником ростового коефіцієнта (РК), досліджені види роду *Agaricus* належать до категорії повільноростучих. Значення РК міцеліальних культур на різних середовищах є характерними для кожного штаму і змінюються в залежності від складу поживного середовища і температури культивування.

9. Показано, що по відношенню до температурного фактора всі досліджені види є мезофілами. Більшість з них здатна до росту при 4 °С, культури видів *A. bernardiiformis*, *A. bitortus*, *A. campestris*, *A. sylvaticus*, *A. sylvicolus* ростуть при 37 °С. Оптимумом міцеліального росту для більшості культур є 26 °С.

10. Встановлено, що ґрунтовий дейтеромицет *Humicola insolens*, який домінує в компостах при промисловому культивуванні *A. bisporus*, на агаризованих середовищах стимулює ріст культур копрофільних видів роду *Agaricus*.

11. При застосуванні різних культурально-морфологічних критеріїв певного еволюційного значення (наявність прямих, стадія анаморфи, кількість ядер у клітинах) підтверджено положення про те, що представникам роду *Agaricus* притаманне явище гетеробатмії.

12. Із застосуванням математичного експрес-методу "Фламенко" підтверджено правомірність поділу досліджених видів роду *Agaricus* за культурально-морфологічними ознаками на еколого-трофічні групи копрофілів, лучних та підстилочних сапротрофів.

13. Запропоновано використовувати відходи виробництва зернового міцелію (відварів зерна) як єдиного поживного компонента агаризованих поживних середовищ при лабораторному та промисловому культивуванні видів роду *Agaricus*.

За матеріалами дисертації опубліковані такі праці:

1. Григанский А.Ф. Исследование видов рода *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. в чистой культуре // 4-е Совещание по промышленному культивированию съедобных грибов (Донецк, окт. 1993): Теа. докл. - Донецк, 1993. - С. 29-30.

2. Григанський А.Ф., Бухало А. С. Рост грибов рода *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. в глибокій культурі // Там же.- С. 30-31.

3. Григанський А.Ф., Бухало А.С. Під *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. в чистій культурі // Укр. ботан. журн.- 1994.- 51, N 2/3.- С. 178-189.

4. Григанський А.Ф. Дослідження культуральних ознак видів роду *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. на агаризованих поживних середовищах// Там же.- 1994.- 51, N 4.- С. 73-81.

5. Григанський А.Ф., Бухало А. С. Сканиюча електронна мікроскопія вегетативного міцелію видів роду *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. // Там же.- 1994.- 51, N 6.- С. 72-83.

6. Григанський А.Ф., Бухало А.С. Збереження рідкісних видів печериць в чистій культурі // Конф. по збереженню генотипу рідкісних рослин (Кіровоград, 1994): Тез. доп.- Донецьк, 1994.- С. 20.

7. Buchalo A., Sasek V., Grigansky A. Criteria for the classification of *Agaricales* in pure culture // 7-th International Congress of Mycological Division (Prague, Juli, 1994): Abstr.- Prague, 1994.- P. 86.

8. Buchalo A., Sasek V., Grigansky A. Classification of *Agaricales* in Vegetative Stage of Growth // V International Mycological Congress (Vancouver, August, 1994): Abstr. - Vancouver, 1994.- P. 24.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ПІД *AGARICUS*, ЧИСТА КУЛЬТУРА, МОРФОЛОГІЯ, ФІЗІОЛОГІЯ, ЕКОЛОГІЯ.

Griganski A.Ph. Biology of species of genus *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. in pure culture. Ph. D. thesis. Speciality 03.00.24 - Mycology. M.G. Kholodny Institute of Botany.

National Academy of Sciences of Ukraine. Kiev, 1995.

17 species of the genus *Agaricus* were studied in vegetative stage of growth. Characteristics of morphology, growth rate and metabolism of pure cultures on different nutrient media and under different temperature parameters were investigated and their taxonomic and ecological significance are discussed. It is shown that the presence of clamp connections and anamorph stage, relative amount of nuclear DNA and number of nuclei per cell have the taxonomic significance on species level. Type of colony on different agar media and the results of qualitative enzyme tests have the correlation with the ecological status of the species.

Григанский А.Ф. Биология видов рода *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. в чистой культуре. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.24. - Микология. Институт ботаники им. Н.Г. Холодного. Национальная Академия наук Украины. Киев, 1995.

Исследованы 17 видов рода *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. в вегетативной стадии роста. Изучены характеристики морфологии, роста и метаболизма чистых культур на различных питательных средах и при различных температурах, обсуждаются их таксономическая и экологическая значимость. Показано, что наличие пряжек и стадии анаморфы, относительное содержание ядерной ДНК и количество ядер в клетках имеют таксономическое значение на видовом уровне. Типы колоний на различных агаризованных средах и результаты качественных энзиматических тестов коррелируют с экологическим статусом видов.

Підписано до друку 12.09.95 р. Формат 60x84/16
Папір офсетний. Умовн.-друк.аркуш. 1,0.
Об.-вид.аркуш 1,0. Тираж 100 . Замовл. 375 .

Поліграф. Ділян. Інституту електродинаміки АН України,
252680, Київ-57, проспект Перемоги, 56

44822

Journal of Botany of the USSR, 1966.

17 species of the genus *Agaricus* were studied in vegetative stage of growth. Characteristics of morphology, growth rate and relationship of pure cultures on different nutritive media and under different temperature parameters were investigated and their taxonomic and ecological significance was discussed. It is shown that the existence of clear vegetative and anatomical stages, relative aspect of nuclear size and number of nuclei per cell have the taxonomic significance on species level. Type of colony on different agar media and the results of qualitative enzyme tests have the correlation with the ecological status of the species.

Резюме: 17 видов грибов рода *Agaricus* L.: Fr. изучены в вегетативной стадии роста. Исследованы особенности морфологии, скорости роста и взаимоотношения чистых культур на различных питательных средах и при различных температурных параметрах. Обсуждается их таксономическое и экологическое значение. Показано, что наличие четкой вегетативной и анатомической стадий, относительный аспект размера ядра и количества ядер на клетку имеют таксономическое значение на уровне вида. Тип колонии на различных средах и результаты качественных тестов ферментов коррелируют со статусом вида.

Агариковые: 17 видов грибов рода *Agaricus* L.: Fr. изучены в вегетативной стадии роста. Исследованы особенности морфологии, скорости роста и взаимоотношения чистых культур на различных питательных средах и при различных температурных параметрах. Обсуждается их таксономическое и экологическое значение. Показано, что наличие четкой вегетативной и анатомической стадий, относительный аспект размера ядра и количества ядер на клетку имеют таксономическое значение на уровне вида. Тип колонии на различных средах и результаты качественных тестов ферментов коррелируют со статусом вида.

443222

AB 33.043