

ПЕРЕДУМОВИ ДІЇ ЗМІШАНИХ ІНФЕКЦІЙ

базидієвих грибів у закритих агробіоценозах на печериці

Мета. Вивчити функціональні особливості патогенів, ізольованих з *Agaricus bisporus*, залежно від таксономічних груп. **Методи.** Предмет дослідження — ізоляти патогенних бактерій та виділена тотальна РНК з *Agaricus bisporus*, що проявлялися як первинні інфекції на стадії активного росту гриба і є типовими лише для печериць. **Методи досліджень** — біотехнологічні. Для ідентифікації виділених культур мікроорганізмів проводили посів для розщеплення джерел вуглецю на синтетичних середовищах із внесенням відповідних цукрів. За допомогою біохімічних методів визначали трофічні особливості патогенних бактерій з метою розробки біотехнологій щодо контролю їхнього поширення. **Результати.** Позитивну реакцію на оксидазу мають ізоляти 1.5 та 1.6. Слабку реакцію мали ізоляти 1.2 та 1.3. Джерелами вуглецевого живлення виявлено цукри груп моносахаридів (ксиліоза, декстроза, галактоза), полісахаридів та амінокислоти. Реакція на розщеплення вуглеводів показала, що всі ізоляти мали окисний тип метаболізму. Доведено, що хімічне забруднення сировини субстратів, покривельного ґрунту, монокультури тощо спричиняють мутаційні процеси бактерій, вірусів та мікроскопічних грибів. **Висновки.** Печериця двоспорова у закритих агробіоценозах (камерах вирощування грибів) уражується патогенами, утворюючи при цьому комплекс інфекцій, які зумовлюють значні патології грибів. Ці спалахи інфекції найвірогідніше зумовлені автохтонними та алохтонними патогенами різних таксономічних груп. Щодо вірусів це — Ля Франс, муміфікація, *ABV* (*Agaricus bisporus Virus*), *Mushroom Virus X (MVX)*. Для одержання якісного посівного матеріалу слід впровадити технології сучасних методів діагностики та ідентифікації бактерій, вірусів, а також інших патогенів різних таксономічних груп.

печериця, комплексні інфекції, патогени, окислювально-відновлювальний потенціал

Нинішня оцінка ситуації закритих агроценозів свідчить, що

Т.В. ІВАНОВА,

кандидат сільськогосподарських наук
 Національний університет біоресурсів
 та природокористування України,
 вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ,
 03041, Україна
 e-mail: tivanova1@ukr.net

вплив біотичних та абіотичних факторів викликає незворотні зміни у їхній структурі та функціонуванні. За таких умов патогени різних таксономічних груп набувають небезпечної мінливості та шкідливості. Унаслідок дії цих чинників грибний організм знижує свою продуктивність на фоні патологій, що виникають.

Проведення дослідів зі збудниками хвороб базидієвих грибів надзвичайно ускладнюється ще й тому, що вони потребують урахування динаміки прояву інфекційного процесу впродовж всього року. Крім того, останнім часом у базидієвих грибів починають діагностувати змішані інфекції. Це сприяє та прискорює появу складних патологій у рості міцелію і розвитку плодових тіл [1, 2].

Мета роботи дослідити оцінку допустимого комплексного ураження базидієвих грибів збудниками бактеріальної та вірусної природи, які за попередніми скринінговими аналізами можуть викликати складні епіфітотії закритих агробіоценозів.

Матеріали і методи. У роботі були використані традиційні та нові методики ідентифікації вірусних хвороб; методи скринінгу базидієвих грибів на ураження їх бактеріями, вірусами: візуальний метод, електронна мікроскопія, живильні середовища для бактерій, рослини-індикатори, світлова мікроскопія. Матеріалом для даного дослідження слугували плодові тіла печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*) (штами Silvan 130, Heirloom S). Для експерименту відбирали зразки із вираженими

ознаками ураження і розвитку патогенів та без них. У якості контролю — плодові тіла печериці, які відбирали згідно з результатами візуального огляду на симптоми пошкодження. Досліди виконували у триразовому повторенні упродовж 2018—2020 рр. на кафедрі екобіотехнології і біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Для екстракції та ідентифікації патогенів з плодових тіл печериць мікробіологічним методом відбирали зразки із явними ознаками (бурі плями круглої чи неправильної форми, які з часом темнішали, з деформацією плодових тіл, уражені поверхні покриті шаром коричневого слизу та сухими плямами).

Вивчення біохімічних властивостей патогенних бактерій у тому числі необхідне і для визначення їхньої родової й видової приналежності. Для виявлення і вивчення цих властивостей культуру бактерій висівають на живильні середовища, що містять у своєму складі різноманітні джерела вуглецю. [3—4]. Патогенні бактерії засівають однофазовою культурою бактерій, знятою петлею з агару або бактеріальною суспензією. Після інкубування у термостаті спостерігають результати ферментації вуглецю на 2-й, 4-, 7-, 10-й дні, фіксуючи початок кислото- і газоутворення. Утворення кислоти або лугу в пробірках відбувається зі зміною кольору живильного середовища. Деякі види патогенних бактерій спричиняють повільне кислотоутворення, тому пробірки витримують у термостаті до 14 діб задля переконання, що у бактерій є здатність розщеплювати вуглеводи [5—8].

Крім штаму печериці Silvan 130 обстежували і новий штам Heirloom S. Для виявлення збудників комплексної інфекції було опановано та модифіковано експрес-метод. Під час деяких дослідів проводили аналіз посівного матеріалу (міцелію) [8—11], різнобічний комерційний матеріал якого доступний у ринковій реалізації.

Результати. Для встановлення редокс-потенціалу виділених культур проводили реакції на розщеплення вуглецю на синтетичному середовищі Омелянського з внесенням відповідних джерел карбону. Спостерігали на 2-й, 4-, 7- і 10-й дні результати ферментації. Стандартний біологічний відновлювальний потенціал бактерій визначали за методом Ковача. Каталазу активність визначали, додаючи до каплі культури 10% розчин перекису водню. За позитивної реакції (наявності каталази) перекис водню розкладається з утворенням води та виділенням вуглекислого газу. Результати наведено в таблиці 1.

За даними таблиці 1 ізолят 1.6 має негативний результат на каталазу. Позитивну реакцію на оксидазу показали ізоляти 1.5 та 1.6. Слабку реакцію мали ізоляти № 1.2 та № 1.4. Реакція на розщеплення вуглеводів показала, що всі ізоляти мали окисний тип метаболізму.

Ідентифікація організмів є одним з найважливіших і трудомістких етапів біологічних досліджень. Нині поширеним методом розпізнавання бактерій є ферментативний метод — визначення біохімічних властивостей, пов'язаних зі здатністю бактеріальної культури розщеплювати цукри, білки та інші сполуки.

Результати досліджень свідчать, що базидієві гриби в закритих агробіоценозах уражуються бактеріями та вірусами, формуючи комплексну інфекцію, яка спричиняє значні патології у печериць. Ці спалахи інфекції найвірогідніше зумовлені автохтонними та алохтонними патогенами різних таксономічних груп. Щодо вірусів це — Ля Франс, муміфікація, ABV (*Agaricus bisporus* Virus), Mushroom Virus X (MVX). Слід зауважити, що MVX часто латентно вражає такі

1. Біохімічні властивості бактеріальних штамів, ізольованих із уражених тканин печериць двоспорової

Ізолят №	Оксидаза за Ковачем	Каталаза	Метаболізм глюкози
1	-	+	О
2	+/-	+	О
3	-	+	О
4	+/-	+	О
5	+	+	О
6	+	-	О

Примітки: «+» — наявність ознаки; «-» — відсутність ознаки; «П» — палички; «+/-» — слабка реакція; «О» — окисний

базидієві гриби, як печериці. Проте за певних умов у закритих агроценозах MVX індукують складні патології на різних штамх базидієвих грибів. Наприклад, мінімальне ураження цим вірусом в агроценозах становить близько 8%, а для деяких штамів цей показник сягає 64%. Рабдовіруси мають паличкоподібну форму близько 70 нм. Збудник часто уражує базидієві гриби разом з рабдовірусом завдяки консортивним зв'язкам.

За використання вказаних методик було встановлено, що печериці інфіковано бактерією роду *Pseudomonas* spp. З огляду на характерні ознаки, бактерію можна віднести до *P. tolaasii*. Цей вид бактерій може заражати майже всі види грибів. Хвороба виникає на плодкових тілах у вигляді дрібних блискучих жовтих чи темно-жовтих плям на поверхні капелюшка. Плями розташовані на поверхні, в середину тканин капелюшка не проникають більше ніж на 1—2 мм. Плодові тіла, уражені бактеріальною плямистістю, злегка в'язкі і липкі на дотик. Цей патоген зумовлює втрати врожаю 5—10% [5]. Нині не розроблено заходів захисту, щоб повністю уникнути даного захворювання.

Слід зазначити, що хвороба гіменофора, яка викликається *Pseudomonas cichorii*, часто є супутньою інфекцією впродовж усього життя у багатьох видів. Проявом захворювання, як свідчать дослід-

ження, є розвиток бактерій на пластинках гіменофору, які поступово стають драглистими та руйнуються [12—13]. Хворобу викликає *Pseudomonas agarici*. Симптом — кремово-сірі бактеріальні плями, які спостерігаються на гіменофорі. Плями оточені темно-коричневими або чорними плями, що збільшуються в розмірі до 2 мм або більше. Плями можуть об'єднуватись. У складних випадках тканини руйнуються і стають білого кольору. На ніжці гриба, як правило, розвиваються дрібні поздовжні розколи. Вони стають коричневими з часом. Характерно, що прояв хвороби стає серйознішим з кожною наступною хвилею плодоношення.

Слід зазначити, що на ранніх стадіях росту у плодкових тілах діагностуються вірусоподібні частки, які за морфологічними ознаками подібні до MVX вірусу.

Огляд попередніх власних досліджень щодо аналізу скринінгових результатів ідентифікації бактеріальних та вірусних хвороб вказує на необхідність комплексного підходу до вивчення збудників захворювань. Це включає різні таксономічні групи біорізноманіття закритих агроєкосистем: збудники рослин, векторні об'єкти (нематоди, попелиці, трипси, кліщі), мікотичні інфекції тощо. Слід також зауважити, що хворобам цих екосистем за певних умов характерні обмінні інфекційні процеси, які часто є непередбачуваними для

2. Бактеріальні та вірусні хвороби і їх збудники на базидієвих грибах у закритих агробіоценозах

Об'єкт, хвороба	Патоген	Додаток (примітка)
Вірусні хвороби печериці	MVX (Mushroom Virus X)	Різні деформації грибів і зміна консистенції тканин: «бочечкоподібна ніжка», відсутність диференціації на ніжку і капелюшок. Часто латентна форма
Вірусні хвороби печериці	ABV (<i>Agaricus bisporus</i> Virus)	Подовжені, часто зігнуті ніжки і дрібні капелюшки — «барабанні палички», потовщені ніжки і дрібні тверді капелюшки. Латентна контамінація резервуар вірусів
Вірусні хвороби печериці	La France	Недорозвиненість пластинок і покривала, карликовість, повільний розвиток і раннє відмирання грибів. Зміна консистенції — розм'якшення тканин грибів
Бактеріальні хвороби	Бура (іржава, бактеріальна) плямистість (<i>Pseudomonas tolaasii</i>)	Домінуючий патоген. На капелюшках печериць з'являються іржаво-бурі, коричневі плями, потім, зливаючись, вони поступово охоплюють весь капелюшок, проникаючи всередину тканини на глибину до 3 мм. При зберіганні грибів розвиток бактеріозу продовжується і за добу більше 50% грибів, що зберігаються, можуть набути симптомів бурої плямистості
Бактеріальні хвороби	Муміфікація	Гриби стають жорсткими, губчастими або сухими, муміфікованими, вони змінюють колір з сірувато-білого на коричневий. Коли їх збирають, чутний хрусткий звук, на них велика кількість покривного ґрунту
Бактеріальні хвороби	Мокра бактеріальна гниль (гниль пластинок)	Гниття пластинок наприкінці плодоношення. Спочатку по краях гіменіального шару з'являються коричневі або чорні плями округлої форми. На ніжках утворюються поздовжні тріщини, де знаходяться скупчення бактерій
Бактеріальні хвороби	Vern Astley	Латентна контамінація. Деформування плодкових тіл. Виділяються мікоплазми

живих організмів біоценозів. Унаслідок цього відбувається контамінація патогенами субстрату тощо.

У наведеному матеріалі (табл. 2) розглянуто основні бактеріальні та вірусні хвороби базидієвих грибів закритих агроєкосистем на базидієвих грибах, які мають домінантне поширення та є шкідливими.

ВИСНОВКИ

Провівши реакції з визначення біохімічних властивостей, можна зробити висновок, що ізолят 1.6 має негативний результат на каталазу. Позитивну реакцію на оксидазу показали ізоляти 1.5 та 1.6. Слабку реакцію мали ізоляти 1.2 та 13.2. Реакція на розщеплення вуглеводів показала, що всі ізоляти мали окисний тип метаболізму.

Досліджено основні бактеріальні та вірусні хвороби в закритих агробіоценозах на печериці.

Для одержання якісного посівного матеріалу слід впровадити технології сучасних методів діагностики та ідентифікації бактерій, вірусів, а також інших патогенів різних таксономічних груп.

У мережі Національної академії аграрних наук слід розширити дослідження з проблем оцінки якості грибної продукції, посівного матеріалу отриманого *in vitro*, міцелію, які на сьогодні взагалі відсутні. Крім того, необхідно розробити та впровадити тест-системи для виявлення домінантних патогенів, виділених у різних грибних господарствах України.

Також слід створити державний депозитарій фіто- і міковірусів базидієвих грибів закритих агроєкосистем для різнопланового використання у технологічних процесах. Впровадити систему профілактичних заходів із запобігання захворюваності на основі використання природних органічних сполук.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kalac P.A. Review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(2): С. 209—218. doi: 10.1002/jsfa.5960.
2. Іванова Т.В. Біотехнологія їстівних грибів. Комринт. 2018 (2). 165 с.
3. Sanguinetti M. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015; 2015: 376387. doi: 10.1155/2015/376387
4. Іванова Т.В., Бойко О.А., Мельничук М.Д. Распространение, диагностика и профилактика болезней шампиньона двухспорового. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2009. №2. С. 23—24.

5. Патица В.П., Пасічник Л.А., Данкевич Л.А. Диагностика фітопатогенних бактерій: Методичні рекомендації. Київ, 2014. 57 с.

6. Іванова Т.В., Ваніна О.Ю. Пукролітичні функції та молекулярно-біологічна діагностика патогенних бактерій печериці двоспорової. *Збірник наукових праць «Миронівський вісник»*. Т. 6, 2019. С. 25—30.

7. Радченко О.С. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення: Навчальний посібник. ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. 211 с.

8. Патица В.П., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І., Петриченко В.Ф., Корнійчук О.В., Калініченко А.В., Буценко Л.М., Житкевич Н.В. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. ТОВ Віндрук, 2017. 432 с.

9. Гадзало Ю.М., Патица М.В., Зарішняк А.С. Агробіологія ризосфери рослин. *Аграрна наука*, 2015. 368 с.

10. Патица Н.В., Колодяжний А.Ю., Ібатуллин І.І. Оцінка метагеному та виявлення функціонально значущих поліморфізмів прокариотів ґрунту методом піросекціонування. *Мікробіологічний журнал*. 2016, 78 (2): С. 43—51.

Патица Т.І., Патица М.В., Патица В.П. Філогенетичні взаємозв'язки між серологічними варіантами *Bacillus thuringiensis*. *Біополімери та клітини*. 2009. 25 (3): С. 240—244.

12. Орлова О.В., Воробйова Н.І., Свиридова О.В., Андронов Е.Є., Колодяжний А.Ю., Москалевська Ю.П., Патица М.В. Склад та функціонування мікробних угруповань при розкладанні соломи злаків у дерново-підзолистому ґрунті. *Сільськогосподарська біологія*. 2015, 50 (3). С. 305—314.

13. Патица М.В., Круглов Ю.В., Бердников А.М., Патица В.Ф. Роль *Linum usitatissimum* L. у формуванні мікробних угруповань підзолистих ґрунтів. *Мікробіологічний журнал*. 2008. 70 (1). С. 59—70.

Іванова Т.В.

Національний університет біоресурсів і природопользовання України, ул. Героїв Оборони, 15, г. Київ, 03041, Україна, e-mail: tivanova1@ukr.net

Предпосылки действия смешанных инфекций базидиальных грибов в закрытых агробиоценозах

Цель. Изучить функциональные особенности патогенов, выделенных из *Agaricus bisporus*, в зависимости от таксономических групп. **Методы.** Предмет исследования — изоляты патогенных бактерий и выделенная тотальная РНК с *Agaricus bisporus*, которые проявлялись как первичные инфекции на стадии активного роста гриба и являются типичными только для шампиньонов. Методы исследований — биотехнологические. Для идентификации выделенных культур микроорганизмов проводили посев для расщепления источников углерода на синтетических средах с внесением соответствующих сахаров. С помощью биохимических методов определяли трофические особенности патогенных бактерий с целью разработки биотехнологий по контролю их распространения. **Результаты.** Положительную реакцию на оксидазу имеют изоляты 1.5 и 1.6. Слабую реакцию имели изоляты 1.2 и 1.3. Источниками углеродного питания определены сахара групп моносахаридов (ксилоза, декстроза, галактоза), полисахаридов и аминокислоты. Реакция на расщепление углеводов показала, что все изоляты имели окислительный тип метаболизма.

Доказано, что химическое загрязнение сырьевых субстратов, покровной почвы, монокультуры вызывают мутационные процессы бактерий, вирусов и микроскопических грибов.

Выводы. Шампиньон двуспоровый в закрытых агробиоценозах (камерах выращивания грибов) поражается микроорганизмами, образуя при этом комплекс инфекций, обуславливающих значительные патологии грибов. Для получения качественного посевного материала следует внедрить технологии современных методов диагностики и идентификации бактерий, вирусов, а также других патогенов разных таксономических групп.

шампиньон, комплексные инфекции, патогены, окислительно-восстановительный потенциал

Ivanova T.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15, Heroiv Oborony Str. building 3, Kyiv, Ukraine, 03041, e-mail: tivanova1@ukr.net

Prerequisites for the action of mixed infections of basidiomycetes closed agrobiocenoses

Goal. The study of functional features of pathogens isolated from *Agaricus bisporus* depending on taxonomic groups. **Methods.** The subject of the study is isolates of pathogenic bacteria and isolated total RNA from *Agaricus bisporus*, which manifested themselves as primary infections at the stage of active growth of the fungus and are typical only for mushrooms. Research methods are biotechnological. Biotechnological research methods were used in the work. To identify the isolated cultures of microorganisms, sowing was performed to split carbon sources on synthetic media with the introduction of appropriate sugars. We used biochemical methods to determine the trophic characteristics of pathogenic bacteria in order to develop biotechnologies to control their spread. **Results.** Isolates 1.5 and 1.6 must have a positive reaction to oxidase. Isolates 1.2 and 13.2 had a weak reaction. Sources of monosaccharides (xylose, dextrose, galactose), polysaccharides and amino acids have been identified as sources of carbon nutrition. The reaction to the breakdown of carbohydrates showed that all isolates had an oxidative type of metabolism. We have proved that chemical contamination of raw materials, substrates, casing layer and monoculture causes mutational processes in bacteria, viruses and microscopic fungi. **Conclusions.** Champignon double-pore in closed agrobiocenoses (mushroom growing chambers) is affected by microorganisms, forming a complex of infections that cause significant pathologies of fungi. We found that the double-pore champignon inartificial agro biocenoses (tunnels) is affected by microorganisms, forming a complex of infections that cause significant pathologies of mushroom in the course of the experiment. To obtain high-quality mycelium is necessary to introduce technologies of modern methods of diagnostic and identification of bacteria, viruses, and other pathogens of different taxonomic groups.

mushroom, complex infections, pathogens, redox potential

Рецензент:

Патица М.В., доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН, НУБіП України

Надійшла 28.08.2020 р.