

## МОРФОЛОГІЯ ТА СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ПАТОГЕНІВ *BASIDIOMYCETES*

Подаються матеріали вивчення морфології та структурних особливостей вірусів, мікроскопічних грибів і бактерій, які уражують *Basidiomycetes* за умов біотехнологічних процесів та природних біоценозів. Проведено аналіз розвитку інфекції у печериці двоспорової (*Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach) та гриби звичайної (*Pleurotus ostreatus* Kunt.), які слугували модельними об'єктами в дослідях різного рівня складності. При цьому досліджували й інші види їстівних і лікарських грибів, які були джерелом біохімічних фракцій для формування біопрепаратів.

*Ключові слова:* віруси, бактерії, гриби, базидіоміцети, експрес діагностика.

На період інтенсивного розвитку грибівництва [1–4] в різних країнах значної проблеми вирощування шапинкових грибів завдають хвороби, які викликають бактерії, віруси та мікроскопічні гриби. Наші багаторічні дослідження показують, що джерелом інфекції можуть бути складові компосту, поливної води, ґрунт, повітря та занесення патогенів за непередабачених умов [3].

Виявлено, що в природних біоценозах різні види базидіоміцетів можуть мати «постійну» інфекцію, яка найчастіше викликається мікроскопічними грибами [3, 12, 13]. Необхідно зазначити, що часто виробничники, які отримують сировину для харчових та фармацевтичних цілей, навіть не підозрюють, що міцелій та плоді тіла контаміновані патогенами. За певних умов ці збудники хвороб на різних стадіях онтогенезу грибів уражують плоді тіла в біотехнологічному процесі і в природних біоценозах латентно.

Нами та іншими дослідниками було відмічено, що печериця надзвичайно чутлива до інфекції, яку індукують *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosa*, *Trichoderma viride*, *T. konidii*. Порівняно з бактеріальною та вірусною інфекціями ця ситуація ураження більш вивчена, адже мікроскопічні гриби різних таксономічних груп у більшості випадків викликають специфічні симптоми ураження на плодівих тілах, які спостерігаються візуально.

Враховуючи, що базидіоміцети здатні уражатись бактеріями та вірусами з різними морфологічними ознаками, в наші дослідження входили завдання – розробки та освоєння нових методів для вивчення морфолого-структурних та деяких загально-біологічних властивостей цих та інших патогенів, які знижують продуктивність і якість грибів.

При цьому основна увага була зосереджена на дослідженнях, які давали змогу відібрати здорову (не контаміновану патогенами) грибну сировину для розробки і формування біологічно активних препаратів для різного спрямування – АПК, фармацевтичної та харчової галузі [7–9].

**Матеріали і методи.** В дослідженнях використовували методи відбору зразків грибів з урахуванням їх супровідної рослинності біоценозів та матеріалу спеціалізованих державних і приватних господарств, науково-виробничих лабораторій України, а також сировину зарубіжних і вітчизняних комерційних фірм. Для дослідження вірусів використовували відомі методи: ІФА, метод Оухтерлоні, запатентований експрес метод (рис. 1) виявлення патогенів за нетрадиційних підходів виготовлення препаратів для електронно-мікроскопічних досліджень [6, 9], відомі способи доочистки вірусів у градієнтах сахарози та аналіз капсидних білків шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі [5].

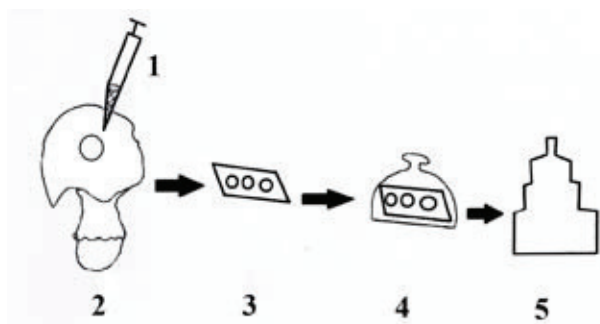


Рис. 1. Один із варіантів підготовки препаратів для електронної мікроскопії:

- 1 – піпетка з контрастуючою рідиною;
- 2 – плодове тіло;
- 3 – сітки-підкладки з досліджуваним об'єктом;
- 4 – підсушування препарату;
- 5 – електронна мікроскопія.

Бактерії та мікроскопічні гриби вирощували на поживних середовищах на основі відомих традиційних компонентів, які розроблені вітчизняними та зарубіжними дослідниками [1, 11]. При цьому для визначення морфологічних ознак мікроскопічних грибів застосовували люмінесцентну мікроскопію, а для бактерій як і вірусів використовували електронно-мікроскопічні дослідження [5]. Визначення патогенів проводили за відомими методами [1, 5, 6, 10, 12, 13].

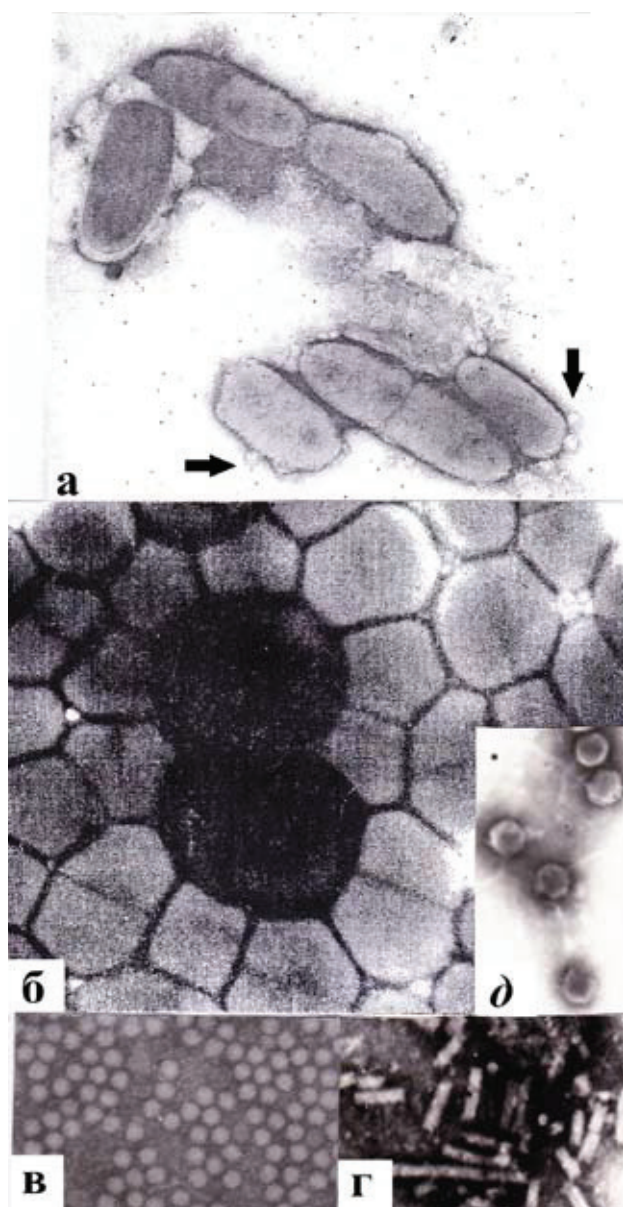
В дослідженні вірусів і бактерій проводили їх вивчення в електронних мікроскопах за умов інструментальних збільшень (10 000-50 000) (мікроскопи EM – 125, JEM-1400 в лабораторіях інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, НАНУ, КНУ імені Тараса Шевченка, Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, за що автори виносять подяку співробітникам цих підрозділів).

**Результати та їх обговорення.** Вперше було доведено, що шапінкові гриби базидіоміцети, які є джерелом для харчової, фармацевтичної та інших галузей промисловості, часто мають комплексну інфекцію, яка індукується за умов біотехнологічних процесів та в екологічних природних нішах. Необхідно підкреслити, що різні види грибів природних біоценозів найчастіше (10–73 %) уражуються пеніцилами, аспергилами та бактеріями (рис. 2, 3) роду псевдомонас. До цих грибів необхідно віднести: різні види печериці, гливу звичайну, гнойовика білого, гнойовика іскристого, трутовика сірчано-жовтого, коріола різнокольорового, решітку (козяка). Відмічено також види грибів, які не уражуються цими патогенами або інфекції у них була в межах 0,5–2,5 % обстежених плодових тіл (із 10 повторностей). До цих грибів відносяться: несправжній опеньок сірчано-жовтий, трутовик лакований (гриб Рейши), березовий гриб (Чага), сирійка красива, дощовик гігантський, дощовик шипуватий.

За умов природного довкілля печериця двоспорова та глива звичайна є носіями бактерій, мікроскопічних грибів та «сферичного» вірусу. У печериці двоспорової часто буває змішана інфекція – сферичний паличкоподібний та бацилоподібний віруси. Для печериці двоспорової в умовах виробництва відмічено ураження плодових тіл мікроскопічними грибами *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosus*, *Trichoderma viride*, *T. konidii*, *Cladobotryum dendroides* (рис. 3). Ці гриби часто уражують печерицю двоспорову в комплексі зі «сферичним» вірусом.

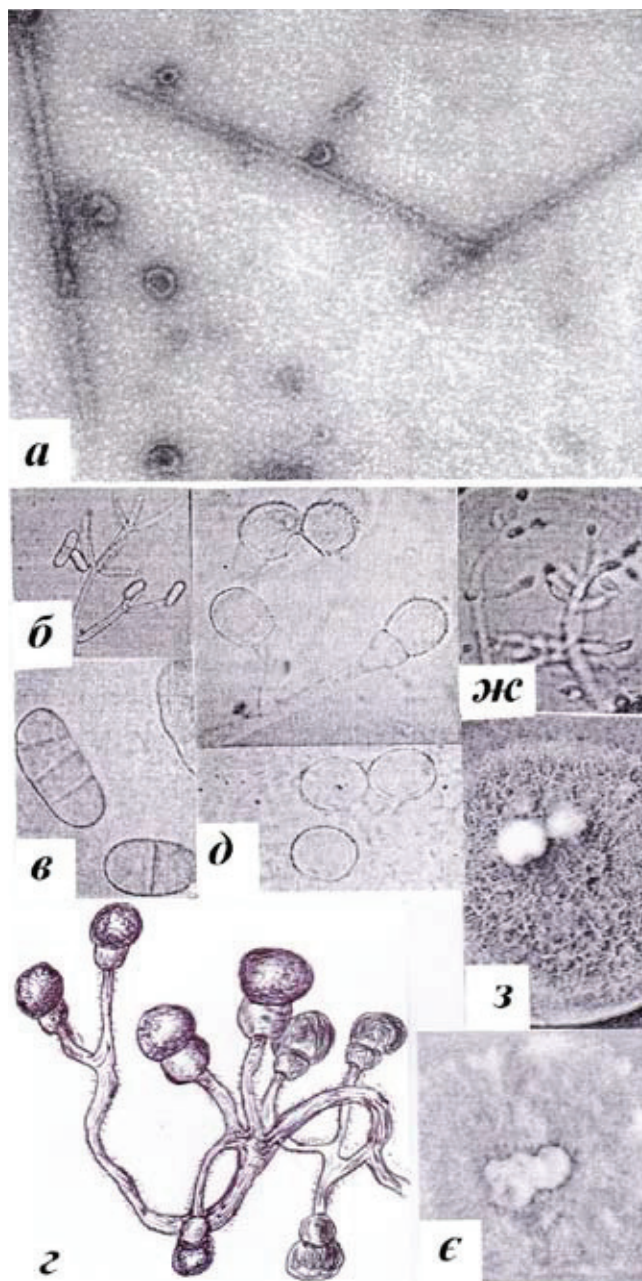
Досліджено, що сферичний вірус за розмірами 19-50 нм. При цьому часто між собою віріони (in vitro) агрегують відповідно до розмірів: 19, 25, 29 нм; 34, 40, 42; 50 нм. Отримано електрофореграму структурних білків очищеного вірусу, який може уражувати плодові тіла грибів з іншими патогенами вірусної природи (Рис. 4).

Вивчаючи методом електронної мікроскопії *P. fluorescens* (biotype G,-syn. *tolaasii*), було відмічено контамінацію бактерій бактеріофагами (рис. 2). Ця бактерія, як указують зарубіжні дослідники, має своєрідний пігмент піовердин, який надає їй, розвиваючись на печериці двоспоровій, своєрідних властивостей.



**Рис. 2. Електронографії бактерій *P. fluorescens* (біотип G –*tolaasii*) та вірусів:**  
 а – бактерія (стрілками відмічено бактеріофаги (x19 000);  
 б – колонізація бактерії (x 20 000);  
 в – сферичний вірус (x 34 000);  
 г – паличкоподібний вірус (x 51 000);  
 д – бактеріофаг (x 30 000).

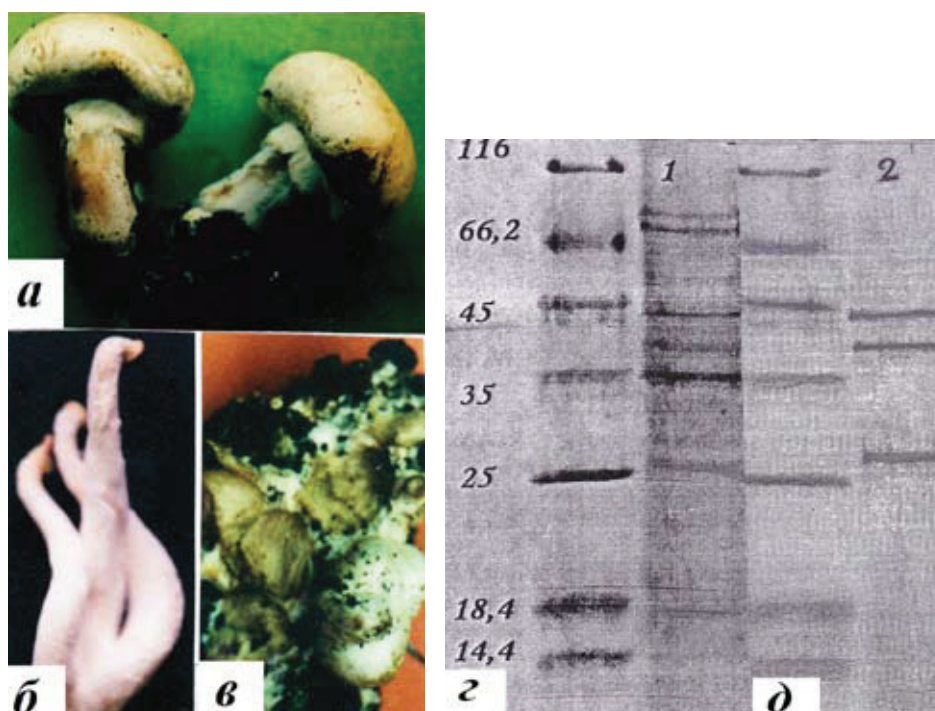
Як показують наші дослідження, для вирощування грибів, наприклад, печериці двоспорової, одним із джерел інфекції в технологічному процесі є поливна вода, яка спонукає патогени різної природи циркулювати у виробничих приміщеннях. При цьому вода як векторна система заносить до компосту плодових тіл та інших компонентів аллохтонні та автохтонні мікроорганізми і віруси. Наприклад, при аналізі забірної води із резервуарів для поливу виявлено: бактерії – *E.coli*, *B.cereus*, *P.aeruginosa*, мікроскопічні гриби – *A.flavus*, *P.funiculosum*; віруси та вірусоподібні частки – 25-30нм (не ідентифікуються щодо фітовірусів, ВТМ (*Tobamovirus*), Y-вірус (*Potyvirus*)).



**Рис. 3. Морфологічні ознаки патогенів, що уражують печерицю:**

- а – паличкоподібний та сферичний вірус (експрес підготовка препарату) ( x 63 000);
- б – *Cladobotryum dendroides* (конідієносці);
- в – конідії; г, д – *Mycogone perniciosa* (конідії, хламідоспори);
- є – ростучі колонії;
- ж – *Trichoderma viridae*;
- з – ростучі колонії.

Результати аналізу плодкових тіл грибів після поливу в процесі їх онтогенезу виявлено: *P. fluorescens (tolaasii)\**, *E.coli*, *P. aeruginosa*, мікроскопічні гриби *V. fungicola*, *M. perniciosa\**, *T. viride\**, *T. konidii\** (та гриби термофіли різних видів); віруси – ізометричний, бацилоподібний, паличкоподібний. Аналіз стічної води (приймального резервуару після поливу): бактерії *P. fluorescens (tolaasii)\**, *E.coli*, мікроскопічні гриби *M. perniciosa\**, *T. viride*, *P. byssina*, *C. fulva*, *Cladobotryum dendroides\**, віруси – ВТМ, «сферичний» (19-50 нм)\*, *Potyvirus* (\* - особливо патогенні для печериці).



**Рис. 4.** Симптоми на плодових тілах та електрофореграма структурних білків вірусів:  
 а – при ураженні бактерією печериці; б- сферичним вірусом гливи;  
 в – ураження мікогномом печериці; г,д – маркерні білки;  
 1 – структурні білки 3х вірусів, виділених при змішаній інфекції;  
 2 – структурні білки сферичного вірусу.

Використовуючи експрес підготовку препаратів для електронної мікроскопії [9] (безпосереднє контрастування гомогенату в комірці шапинки гриба) (рис. 1), методу занурення фрагменту досліджуваного об'єкту в краплю контрастєру (ФВК, ураніацетату та ін.) на сітці підкладці, контрастування суспензії (міцелію грибів) в комірці чашки Петрі, показали, що ці методичні підходи дають змогу досліджувальні патогени (віруси, бактерії та фрагменти мікроскопічних грибів) спостерігати в нативному стані (рис. 3 а).

Виявлено, що за цих умов (рис. 1) виготовлення препаратів, липке поверхнєве покривало у деяких видів грибів (перечиці, гливи, решітки, маслока) мають дрібні «сферичні» частки (~ 15-20 нм) та неупорядковані продовгуваті структури, які майже не контрастуються солями важких металів. Найчастіше ці структури виявляли в грибів природних біоценозів.

Таким чином, дослідження морфологічних та структурних елементів патогенів, що уражують базидіоміцети, дають змогу розширити наші уявлення про властивості вірусів, мікроскопічних грибів та бактерій.

**О.А. Бойко<sup>1</sup>, Т.П. Шевченко<sup>2</sup>, А.А. Бойко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Национальний университет биоресурсов и природопользования Украины  
 ул. Героев Оборонь, 15, Киев, 03041, Украина

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
 ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина

## **МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНОВ BASIDIOMYCETES**

### **Резюме**

Подаются материалы изучения морфологии и структурных особенностей вирусов, микроскопических грибов и бактерий, которые поражают *Basidiomycetes* в условиях биотехнологических процессов и природных биоценозов. Проведено анализ развития инфекций у шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach) и вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus* Kumm.), которые были модельны-

ми объектами в опытах различного уровня сложности. При этом исследовали и другие виды съедобных и лекарственных грибов, которые служили источником биохимических фракций для формирования био-препаратов.

Ключевые слова: вирусы, бактерии, грибы, базидиомицеты, экспресс диагностика.

**O.A. Boyko<sup>1</sup>, T.P. Shevchenko<sup>2</sup>, A.A. Boyko<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>National University of Life and Environment Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University

## **MORPHOLOGY OF STRUCTURAL PECULIARITIES OF PATHOGENS BASIDIOMYCETES**

### **S u m m a r y**

The materials of studies of morphology and structural peculiarities of viruses, fungi and bacteria, which affect *Basidiomycetes* under biotechnology process and nature biocenosis conditions are given. The analysis of infection development in button mushroom (*Agaricus bisporus*) (J.Lge) Imbach and in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Kumm.), which served as model objects in the experiments of various levels of complexity has been carried out. Other kinds of edible and medicinal mushrooms, which were a source of biochemical fractions to form biologicals were investigated.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** viruses, bacteria, mushrooms, *Basidiomycetes*, express diagnosis.

**The author's address:** Boyko O.A., National University of Life and Environment Sciences of Ukraine, 15 Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine.

1. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко І.Ф., Шевченко С.В. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. – Киев: Наук. думка, 1983. – 312с.
2. Бойко О.А. Особливості пристосування деяких видів їстівних та лікарських грибів до існування в біоценозах України // Агроєкологічний журнал. – 2009. – № 3. – С. 83–87.
3. Бойко О.А., Мельничук М.Д., Иванова Т.В. Распространение, диагностика и профилактика болезней шампиньона двухспорового // Доклады РАСН. – 2009. – С. 23–24.
4. Бойко О.А., Григорюк І.П., Мельничук М.Д. Гриби (*Basidiomycetes*): властивості в екологічних нішах, продуценти біологічно активних речовин // Агроєкологічний журнал. – 2011. – №3. – С. 69–75.
5. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія». – Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
6. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др., Микроорганизмы – возбудители растений: Справочник / под. ред. Член-корр. АН УССР В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1988. – 552 с.
7. Пат. 53983 Україна, АОІС 21/00 СО5F 11/00. Композиція біохімічних речовин для стимуляції продуктивності та захисту від хвороб сільськогосподарських рослин / О.А. Бойко, М.Д. Мельничук, А.Л. Бойко, І.П. Григорюк, В.О. Дубровін. – Опубл. 25.10.2010, Бюл. №20.
8. Пат. 53984 Україна, АОІС 21/00 СО5F 11/00. Спосіб стимуляції продуктивності сільськогосподарських рослин та їх захисту від хвороб / О.А. Бойко, М.Д. Мельничук, А.Л. Бойко, І.П. Григорюк, В.О. Дубровін. – Опубл. 25.10.2010, Бюл. №20.
9. Пат. № 72957 Україна, Спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*) / М.Д. Мельничук, О.А. Бойко, В.О. Дубровін та ін.). – Опубл. 10.09.2012, Бюл. №17.
10. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Second Edition. Vol. 2. The Pro bacteria, 2005. - 2816p. Garrity, George M. (Ed.) Michigan State University.
11. Fernander D.U., Fuch R., Toraz K., Badzikiewicz Munsch P., Meyer J.-M. The structure of a pyoverdine produced by a *Pseudomonas tolaasii*-like isolate / Bio Metals. – 2001. – 14. – P. 81–84.
12. Hervey C.L., Wuest P.S., Schisler L.C. Diseases, Weed Molds Indicator Molds and Abnormalities of Commercial Mushroom: Pen State Handbook for Commercial Mushroom Growers. – Pennsylvania State University, 1982. – P.19–33
13. Stammers Paul. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. – Printed in China, 2000. – 579 p.

Отримано 15.10.2012