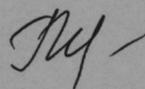


0-789902

На правах рукописи



Ильина Галина Викторовна

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.01.06 – биотехнология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Саратов – 2011

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном
учреждении высшего профессионального образования
«Пензенская государственная сельскохозяйственная академия»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Гарибова Лидия Васильевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Краснопольская Лариса Михайловна

доктор биологических наук, профессор
Коннова Светлана Анатольевна

доктор биологических наук, профессор
Никитина Валентина Евгеньевна

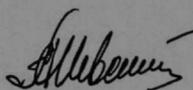
Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Пермский государственный педагогический
университет»

Защита состоится 11 ноября 2011 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.13 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, E-mail: biosovet@sgu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан «7» октября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000687626

С.А. Невский

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Ксилотрофные базидиальные макромицеты – уникальная группа организмов, способная к полной деструкции лигноцеллюлоз, обеспечивающая мобилизацию депонированного в древесине углерода (Мухин, 1993). В качестве специфического компонента экосистем, составляющего основу механизма регуляции процессов накопления и разложения растительных остатков, ксилотрофные базидиомицеты представляются весьма актуальными объектами исследования. Ряд крупных монографических работ второй половины XX века (Бондарцев, 1953; Бондарцева, Пармасто, 1986; Бондарцева, 1998; Erikson et al, 1973-1988; Jülich, Stalpers, 1980) предопределил интенсивное развитие экологического направления исследований этой группы грибов. За рубежом преобладающим стал природоохранный аспект (Knudsen, Vesterholt, 1990; Kotiranta, Niemelä, 1996), а в отечественных исследованиях реализовывались традиции классической экологии (Бондарцева, 2000; Мухин, 2003; Стороженко, 2002; Змитрович и др., 2003; Сафонов, 2003; Арефьев, 2006 и др.). На сегодняшний день довольно ограничены сведения, касающиеся аспектов биологии видов, различающихся экологическими особенностями, в условиях культуры, о потенциале различных географических и экологических изолятов *in vitro*, возможностях сохранения генофонда редких и охраняемых видов в качестве мицелиальных культур. Однако, только в условиях чистой культуры возможно детальное исследование экологических особенностей вида и установление параметров, оптимальных для реализации природного потенциала гриба. В последние десятилетия ксилотрофные базидиомицеты заняли одно из ведущих мест в качестве объектов биотехнологии.

Вышесказанное свидетельствует об актуальности исследований экологии ксилотрофных базидиомицетов, целесообразности создания коллекций их чистых культур, располагающих достаточным объемом экспериментального материала и работы с природными изолятами, потенциально перспективными в биотехнологии.

Цель и задачи исследований. Цель работы – выявление экологических особенностей ксилотрофных базидиомицетов в лесных экосистемах лесостепи Правобережного Поволжья и оценка физиологического и биотехнологического потенциала изолятов видов с различными экологическими особенностями в условиях чистой культуры. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- изучить таксономическую и трофическую структуру биоты ксилотрофных базидиомицетов с учетом особенностей их взаимодействия с древесными субстратами в районе исследований;
- исследовать функциональные роли группировок видов ксилотрофных базидиомицетов в сукцессионном ряду разложения древесины;
- создать коллекцию изолятов ксилотрофных базидиомицетов, вызывающих разные типы гнилей древесины, выделенных с различных древесных пород и субстратов различной степени деструкции;
- разработать оптимальные приемы культивирования видов с учетом их экологических особенностей и степени функциональной зависимости физиологического потенциала от условий культивирования;
- разработать приемы, обеспечивающие максимальную сохранность морфолого-физиологических параметров мицелиальных культур и генофонда редких и занесенных в Красные Книги РФ и Пензенской области видов;
- исследовать влияние ряда лимитирующих экологических факторов на мицелиальные культуры ксилотрофных базидиомицетов в лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки связи устойчивости к различным воздействиям с эколого-биологическими особенностями видов;
- изучить роль метоксильных групп лигнина, как трофического и корригирующего процессы морфогенеза фактора;
- выявить взаимосвязь между эколого-физиологическими особенностями культур и их биотехнологической перспективностью.

Научная новизна и теоретическая значимость. Изучены экологические особенности ксилотрофной микобиоты лесостепи Правобережного Поволжья, установлены закономерности формирования трофических связей видов и древесных пород – их природных субстратов. Выявлена связь между шириной субстратной приуроченности видов грибов в природе и степенью внутривидового полиморфизма в культуре. Комплексно изучена роль важнейшей составляющей природного субстрата – лигнина как трофического и корригирующего фактора в развитии ксилотрофных базидиомицетов. Изучены механизмы адаптации ксилотрофных базидиомицетов к фунгициду полиеновой природы. Установлено стимулирующее влияние метоксильных групп лигнина на процесс синтеза эргостерина и плодоношение в культуре у грибов белой гнили.

Практическая значимость. Создана коллекция мицелиальных культур базидиомицетов – представителей ксилотрофной микобиоты лесостепи Правобережного Поволжья. Коллекция включает 44 вида и 215 штаммов грибов, прилежащих



к разным систематическим и экологическим группам, в том числе в ней представлены редкие и занесенные в Красные Книги РФ и Пензенской области виды. Показаны возможности культивирования видов, независимо от их субстратной специфичности в природе, на субстратах, содержащих экстрагированные метокселированные лигноцеллюлозные компоненты. С помощью разработанного метода скрининга отобраны штаммы ксилотрофных базидиомицетов, перспективные в качестве продуцентов стерингов. Получены положительные решения по заявкам на патентование оригинальной рецептуры субстратов и способа получения плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов, перспективных в биотехнологии. Разработана биологически активная добавка к рациону сельскохозяйственных птиц на основе мицелия *Ganoderma lucidum*, которая апробирована в условиях крупнейшего птицеводческого комплекса Пензенской области (ООО ПТФ «Васильевская»). Подана заявка на патентование. Запатентован способ хранения мицелиальных культур, обеспечивающий сохранение продуктивных свойств штаммов и генофонда редких видов, в том числе, занесенных в Красные Книги РФ и Пензенской области. Полученные данные относительно особенностей экологии ксилотрофных базидиомицетов используются в процессе преподавания курсов «Экология» и «Основы экологии» в ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА».

Положения, выносимые на защиту:

1. Лесные экосистемы лесостепи Правобережного Поволжья представляют собой богатый резерват видов и штаммов ксилотрофных базидиомицетов, составляющих различные эколого-трофические группировки.

2. Комплексная оценка экологического статуса вида в природе позволяет оптимизировать процесс искусственного культивирования, а статус чистой культуры расширяет возможности исследования важнейших сторон экологии ксилотрофных базидиомицетов в природе.

3. По эколого-физиологическим характеристикам культуры можно судить о потенциальной метаболической активности и, как следствие, биотехнологической ценности штамма.

4. Широта субстратной специфичности в отношении древесных пород и стадии разложения древесины является одним из факторов, определяющих степень штаммового полиморфизма вида в культуре.

5. Метоксильные группы лигнина служат индуктором синтеза эргостерина у грибов белой гнили и стимулятором плодоношения ксилотрофных базидиомицетов.

Работа выполнена в лаборатории биохимии при кафедре биологии животных и ветеринарии Пензенской государственной сельскохозяйственной академии (свидетельство о состоянии измерений №264-224-2008), в соответствии с плановой тематикой “Исследование эколого-биохимического и биотехнологического потенциала ксилотрофных базидиомицетов” (№ гос. регистрации 0120.0850925), а также «Повышение продуктивных качеств животных и разработка рациональных технологий производства продукции животноводства в условиях Среднего Поволжья» (№ гос. регистрации 0120.1064496). В ходе исследований использовалась материальная и приборная база Центральной экоаналитической лаборатории Регионального Центра государственного экологического контроля и мониторинга по Пензенской области (аттестат аккредитации в системе СААЛ РОСС PU. 0001.515921).

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на конференциях, форумах и симпозиумах: Международной конференции, посвященной 80-летию кафедры микологии и альгологии МГУ и 90-летию М.В. Горленко «Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии» (Москва, 1998); II Съезде ботаников «Проблемы ботаники на рубеже XX -XXI веков» (Санкт - Петербург, 1998); Международном симпозиуме «Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы» (Пенза, 2001); Международной конференции «Физиология и биохимия культивируемых грибов» (Саратов, 2002); I-ом Международном Съезде микологов России (Москва, 2002); Всероссийской научно – практической конференции «Вопросы прикладной экологии» (Пенза, 2002); Всероссийской научной конференции, посвященной 130-летию со дня рождения И.И. Спрыгина «Охрана растительного и животного мира Поволжья и сопредельных территорий» (Пенза, 2003); Международной научной конференции «Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах» (Минск, 2004); Международной научно – практической конференции «Проблемы охраны природных ландшафтов и биоразнообразия России и сопредельных стран» (Пенза, 2004); Научно – практической конференции, посвященной памяти профессора А.Ф. Блинохватова «Образование, наука, медицина: эколого-экономический аспект» (Пенза, 2006); Всероссийской научно – практической конференции «Проблемы охраны и экологического мониторинга природных ландшафтов и биоразнообразия» (Пенза, 2007); Всероссийской научно – практической конференции «Мониторинг природных экосистем в зонах защитных мероприятий объектов по уничтожению химического оружия» (Пенза, 2007); Юбилейной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М.В. Горленко «Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества» (Москва, 2008); II

Международном Съезде микологов России (Москва, 2008); Международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина «Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения» (Пенза, 2008); V Международной конференции «Изучение грибов в биоценозах» (Пермь, 2009); I и II Междисциплинарных Микологических форумах (г. Москва, 2009, 2010); Всероссийской научно – практической конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Пенза, 2010); XX Международном Салоне Инноваций и инвестиций (Москва, 2010); Областном форуме «Инновационные технологии в медицине и фармакологии» (Пенза, 2011); Второй международной выставке «Инновации и технологии», (Москва, 2011), IV Российском форуме «Российским инновациям – Российский капитал» (Оренбург, 2011).

Публикации. Автором опубликовано 95 работ, включая 13 статей в изданиях, входящих в “Перечень периодических научных изданий, рекомендуемых ВАК ...”, 66 работ (статьи и тезисы) в сборниках научных трудов, 2 монографии, 9 учебно-методических изданий по экологической тематике, получены 5 патентов РФ и 2 положительных решения о выдаче.

Личный вклад соискателя. Автору принадлежит идея исследования, разработка путей экспериментального выполнения и теоретическое обоснование всех основополагающих задач, поставленных в диссертационной работе, ключевая роль на всех этапах исследования и интерпретации полученных результатов. В совместных публикациях доля автора составляла от 20 до 60%.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 9 глав, заключения, выводов, списка использованных литературных источников и приложений. Работа изложена на 370 страницах машинописного текста, основная часть содержит 32 таблицы, 34 рисунка, 47 фотоиллюстраций. Список литературы включает 455 источников отечественных и зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает глубочайшую признательность научному консультанту, профессору Лидии Васильевне Гарибовой. Слова искренней благодарности за важные советы и поддержку автор выражает заведующему кафедрой микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова профессору Ю.Т. Дьякову, а также ведущему научному сотруднику А.Н. Лихачеву и всем сотрудникам кафедры. За понимание и всестороннее содействие, неоценимую помощь автор благодарит своего учителя – профессора А.И. Иванова, за помощь в реализации приборных измерений – своих коллег: Д.Ю. Ильина, А.А. Костычева, А.В. Скобанева и всех сотрудников РЦГЭКиМ по Пензенской области.

Глава 1. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В ЭКОСИСТЕМЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ
(Обзор литературы)

В главе приводится информация относительно функциональной роли ксилотрофных базидиомицетов в экосистеме. Описаны особенности экологии представителей разных трофических и сукцессионных группировок ксилотрофных макромицетов в контексте их взаимодействия в процессе разложения древесины (Дроздова, Белова, 1982; Денисова, 1991; Змитрофич и др., 2007; Арефьев, 2010; Natakka et al, 1993; Evans, 1995; Shiryaev et al., 2010). Указана уникальная способность ксилотрофных грибов к трансформации органических соединений растительного происхождения, которая сохраняется и в условиях чистой культуры (Горленко, 1967; Каламеес, 1975; Бурова, 1986; Решетникова, 1997; Becker, 1956). Проведен анализ концепций выделения узких трофических группировок среди ксилотрофных базидиомицетов, в частности по спектру субстратной специализации (Мурашкинский, 1939; Частухин, 1945; Мухин, 1993; Брындина, 2000; Сафонов, 2006; Vasiliauskas et. al., 2007). Уделено внимание ферментным системам грибов белой и бурой гнили, а также истории вопроса относительно механизмов деструкции древесного субстрата грибами (Schacht, 1863; Hartig, 1878; Kirk, 1971; Ander, Eriksson, 1978; Eriksson, Vallander, 1980; Kirk, 1983; Otien and Blanchette, 1984; Фенгел, 1988; Morgan, Lewis, Watkinson, 1990; Paszczynski, Crawford, 2008).

Подробно анализируется эволюция взглядов относительно статуса чистой культуры в эколого-микологических исследованиях (Высшие съедобные базидиомицеты..., 1983; Бухало, 1988; Semerdgieva, 1965; Stalpers, 1978).

В главе указываются направления использования ксилотрофных базидиомицетов в сфере производства пищевого белка, в целях биодеструкции поллютантов различной природы, в качестве продуцентов БАВ (Горбатова и др., 2000; Болбова и др., 2002; Костина, 2008; Паршин и др., 2008; Ying et al, 1987; Pointing, 2001; Bending, et al., 2002; Mori, Kondo, 2002; Smith et al, 2002; Mougine et al., 2002). Резюмируется, что разработка приемов регуляции ростовых и синтетических процессов у базидиомицетов в культуре с учетом их экологического статуса в природе является перспективным направлением исследований.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Регион Правобережного Поволжья обладает рядом специфических природных особенностей, что отражается как на видовом составе растительных субстратов ксилотрофных базидиомицетов, так и на распространении и экологии последних. Оценка экологической структуры микобиоты исследуемого региона проводилась с использованием маршрутных полевых исследований в лесных экосистемах изученного региона. Определение грибов проводили с использованием определителей (Бондарцев, 1953; Бондарцева, Пармасто, 1986; Бондарцева, 1998; Julich, 1984). Порядки и семейства в работе приводятся по системе, приведенной на сайте Index Fungorum (CABI Databases, 2010). В качестве основной системы для определения трофической специализации видов использована система В.Г. Стороженко (2002) с некоторыми модификациями, позволившими несколько конкретизировать понятия, применительно к региону исследований. Для лабораторных экспериментов отобраны 215 штаммов 44 видов ксилотрофных базидиомицетов, различающихся субстратной приуроченностью, степенью трофической валентности, типами вызываемых гнилей.

Выделение, оценка ростовых показателей и хранение чистых культур проводилось по общепринятым методикам (Бухало, 1988). Для оценки штаммового разнообразия разных видов в культуре использовали методику, основанную на принципе парных сравнений для построения аддитивных функций полезности (Елтаренко, 1995).

Определение содержания метоксильных групп ($-OCH_3$) в субстратах и древесине разной степени разложения осуществлялось методом Цейзеля в модификации с применением газо-жидкостной хроматографии (Закис, 1987). В работе использован газовый хроматограф Varian CP 3800 с пламенно-ионизационным детектором, оснащённый капиллярной колонкой CP-Wax 52 CB (полиэтиленгликоль). С целью получения модельного соединения методом сернокислотного гидролиза в модификации Комарова был выделен лигнин Классона (Фенгел, 1988; Оболенская, 1991; Боголицин, 1994), а с целью перевода его в водный раствор была осуществлена его перколяция (Грушников, 1973). Показатели оксидазной и пероксидазной активности мицелия определялись спектрофотометрически (Александрова, 1999; Барыкина, 2000; Стрельцов, 2009; Gramss, 1997). Оценка целлюлазной активности проводилась косвенно с использованием глюкозооксидазного метода (Синицын, 1995). Определение содержания эргостерина в мицелии грибов осуществлялось методом газо-жидкостной хроматографии (Гёрёг, 1985) на хроматографе «Кристалл-

2000 М) с пламенно-ионизационным детектором, оснащённым набивной колонкой с насадкой – 5% SE-30 на носителе «Инертон». Для построения градуировочных графиков использовались стандарты фирмы «Мегск». Оценка уровня окислительного стресса культур проводилась при помощи определения маркерного соединения – малонового диальдегида (МДА) по методу Michara et al. (1980). Активность фермента глутатионпероксидазы (ГПО) определяли в сопряженной системе с глутатионредуктазой по методу Mills (1959). Определение содержания общего белка, альбумина, триглицеридов, фракций холестерина в сыворотке крови экспериментальных животных, получавших кормовые добавки на основе мицелия грибов, проводили по общепринятым методикам (Методы клинических исследований, 1987).

Статистическая обработка проводилась с помощью программы «Statistica 6.0», дисперсионного и корреляционного анализов полученных массивов (ANOVA). Для оценки значимости полученных корреляционных коэффициентов использовался t-критерий Стьюдента при уровне значимости 0,95 (Халафян, 2007).

Глава 3. ЗНАЧЕНИЕ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ЛЕСОСТЕПИ ПРАВОБЕРЕЖНОГО ПОВОЛЖЬЯ

В районе исследований описано 249 видов ксилотрофных базидиомицетов, относящихся к 99 родам, 40 семействам, 10 порядкам и 3 классам: Agaricomycetes, Dacrymycetes, Tremellomycetes.* Распространение в лесных экотопах лесостепи Правобережного Поволжья получили представители следующих порядков: Hymenochaetales, Polyporales, Russulales, Thelephorales, Agaricales, Boletales, Corticiales, Dacrymycetales, Auriculariales, Tremellales. Ядро ксилотрофной микобиоты составляют представители первых двух порядков. Ведущими по количеству видов семействами являются Polyporaceae, Strophariaceae, Pluteaceae, Мусценасеae, Inocybaceae, Hymenochaetaceae и Physalacgiaceae. На них приходится более 60% выявленных видов ксилотрофных базидиомицетов. Коэффициент родовой насыщенности семейств, в среднем, составляет 2,62. Наиболее крупными родами, насчитывающими свыше 5 видов, являются *Phellinus*, *Polyporus*, *Мусцена*, *Pleurotus*, *Pluteus* и *Pholiota* (табл. 1). Определенную долю составляют роды, представленные одним видом (в составе семейств *Bolbitiaceae*, *Coniophoraceae*, *Corticaceae*, *Супхелласеae*, *Entolomataceae*, *Gloeophyllaceae*, *Gomphidiaceae*, *Fistulinaceae*, *Hygrophoropsidaceae*, *Meripilaceae*, *Schizophyllaceae*, *Sparassidaceae*, *Bondarzewiaceae*, *Stereaceae*, *Thelephoraceae*, *Tremellaceae*)

*В настоящей работе использована система Index Fungorum (CABI Databases, 2010) www.indexfungorum.org/Names/Names.asp

Таблица 1

Структура биоты ксилотрофных базидиомицетов лесных экосистем
лесостепи Правобережного Поволжья
(семейства, представленные более чем одним видом)

Семейство	Число родов/видов (доля в составе биоты, %)	Семейство	Число родов/видов (доля в составе биоты, %)
Polyporaceae	16/36 (14,5)	Tricholomataceae	4/5 (2,0)
Strophariaceae	6/31 (12,4)	Auriculariaceae	2/4 (1,6)
Pluteaceae	2/28 (11,2)	Schizoporaceae	2/4 (1,6)
Mycenaceae	7/24 (10,0)	Hericiaceae	2/3 (1,2)
Hymenochaetaceae	3/14 (5,6)	Marasmiaceae	2/3 (1,2)
Inocybaceae	5/14 (5,6)	Peniophoraceae	1/3 (1,2)
Physalacriaceae	5/11(4,4)	Phanerochaetaceae	3/3 (1,2)
Psathyrellaceae	1/11(4,4)	Lyophyllaceae	2/2 (0,8)
Agaricaceae	4/10 (4,0)	Dacrymycetaceae	1/2 (0,8)
Fomitopsidaceae	6/7 (2,8)	Ganodermataceae	1/2 (0,8)
Pleurotaceae	2/7 (2,8)	Paxillaceae	1/2 (0,8)
Meruliaceae	4/5 (2,0)	Tapinaceae	1/2 (0,8)

Биологическое разложение древесины сопровождается сменой видового состава грибов. В зависимости от положения в сукцессионном ряду разложения древесины и в контексте трофической специализации видов в данной работе будут использованы определения «облигатный паразит», «факультативный паразит», «факультативный сапротроф», «сапротроф». Преобладающей в районе исследований является группировка факультативных паразитов (рис. 1). Она складывается, в основном, представителями семейств Hymenochaetaceae, Polyporaceae, Fomitopsidaceae. Долю облигатных паразитов формируют отдельные агрессивные виды, такие как *Heterobasidion annosum*, *Phellinus tremula*, которые осуществляют заражение живых деревьев, разложение их древесины, тем самым, разрушая древесостой. На уровне лесного сообщества указанные группы видов осуществляют стратегическую задачу создания другого, более устойчивого и соответствующего эко-топу по породным и структурным характеристикам фитоценоза.

Факультативная составляющая сапротрофного комплекса представлена видами, изредка заселяющими ослабленные деревья, однако чаще встречающимися на валеже и субстратах, подвергшихся частичному разложению. Эта группировка обеспечивает разрушение отмерших древесных растений, пней и сухостоя и фор-

мируется представителями семейств Meruliaceae, Stereaceae, отдельными представителями Polypogaceae (в частности, родов *Trametes*, *Pycnoporus*, осуществляющими деструкцию тонкомерного валежника).

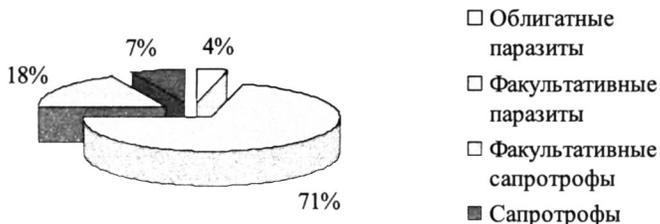


Рис. 1. Доли группировок с различными трофическими стратегиями в составе биоты ксилотрофных базидиомицетов в районе исследований

Группировка сапротрофов представлена видами, завершающими процесс деструкции древесных остатков и развивающимися на погруженном в почву, практически разложившемся отпаде или остатках пней, реже в гниющих дуплах деревьев, таким образом, не оказывающими существенного влияния на структуру древостоя. К этой группировке в районе исследований следует отнести представителей родов *Coprinus*, *Tubaria*, *Mycena*, *Pluteus*, *Volvariella*, *Huophiloma*, *Stropharia*.

Биодеструкция клетчатки и лигнина древесины осуществляется базидиальными грибами, соответственно определяющими развитие бурой или белой гнили древесины. Основную долю (73%) в составе ксилотрофной микобиоты района исследований составляют грибы белой гнили, грибы бурой гнили – порядка 18%, остальное (9%) – грибы смешанной гнили (рис. 2). Блок грибов белой гнили связан с консорциями основных лесообразующих (дуб, сосна) и мелколиственных, формирующих вторичные леса (береза, осина) пород. Это широко распространенные представители родов *Trametes*, *Inonotus*, *Phellinus*, *Ganoderma*. Меньший по объему блок грибов бурой гнили, связан, в основном, с лесообразующими породами: дубом (*Laetiporus sulphureus*, *Daedalea quercina*, *Fistulina hepatica*) и сосной (*Fomitopsis pinicola*, *Sparassis crispa*). Грибы смешанной гнили также связаны с указанными породами и представлены, в частности, видами: *Inonotus dryadeus*, *Phellinus pini*, *Heterobasidion annosum*.

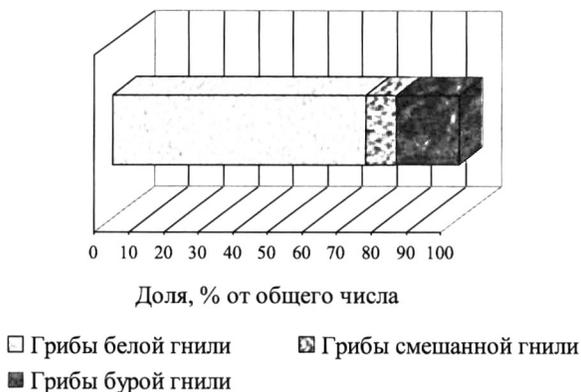


Рис. 2. Доли ксилотрофных базидиомицетов, вызывающих разные типы гнилей древесины в лесных сообществах района исследований

Специфику видового состава Приволжской лесостепи, по сравнению с западносибирской, создает присутствие видов, узкоспециализированных по отношению к древесине дуба. Они составляют 12% от видового состава изученной микобиоты, и, в основном создают ее неморальный элемент (Скобанев, 2010). По широте субстратной специфичности среди ксилотрофных базидиомицетов выделяют: эвритрофы первого порядка, развивающиеся на древесине всех основных лесобразующих пород; эвритрофы второго порядка, развивающиеся на древесине лиственных или хвойных пород; стенотрофы, развивающиеся на древесине какой-либо одной породы (Брындина, 2000). Однако существуют виды, развивающиеся на близких видах древесных растений, или на очень небольшом количестве субстратов. При этом их нельзя отнести к эвритрофам второго порядка, поскольку это понятие охватывает только такую характеристику субстрата, как принадлежность к лиственным или хвойным породам. В связи с этим, представляется целесообразным подразделение группы стенотрофных видов на подгруппы: поливалентные (осваивающие набор близких субстратов) и моновалентные (встречающиеся лишь на одном характерном субстрате) стенотрофы. Таким образом, выделяется четыре группы. Такой классификации мы придерживаемся в настоящей работе.

Анализ трофических особенностей ксилотрофной микобиоты района исследований позволил выявить преобладание доли поливалентных стенотрофных видов (35,8%). Затем следуют моновалентные стенотрофы – 30,9%, эвритрофы вто-

рого порядка – 26,1% и, наконец, наименьшую долю составляют эвритрофы первого порядка – 7,2% (рис. 3).

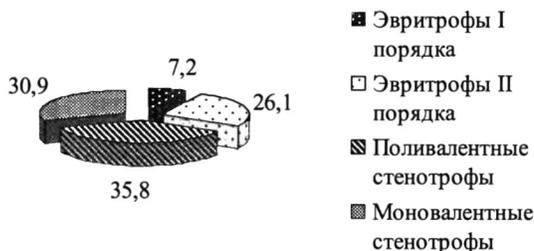


Рис. 3. Соотношение долей группировок ксилотрофных базидиомицетов с различными особенностями трофической специализации в лесных экосистемах Правобережного Поволжья, %

Стенотрофный блок в основном представлен видами, связанными с древесной дуба и сосны, причем названные субстраты зачастую характеризуются ярко выраженной спецификой видового состава колонизирующих их ксилотрофов. Большинство прочих (лиственных) пород характеризуются довольно сходными микокомплексами.

В созданной нами коллекции мицелиальных культур поддерживаются 215 штаммов 44 видов ксилотрофных базидиомицетов. Среди них представлены виды, относящиеся к разным семействам порядков: Hymenochaetales: *Coltricia perennis* (L.) Murrill, J. Mycol., *Inonotus dryadeus* (Pers.) Murrill, *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát, *Phellinus igniarius* (L.) Quél., *Ph. pini* (Brot.) Bondartsev & Singer, *Ph. robustus* (P. Karst.) Bourdot & Galzin, *Ph. tremulae* (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov; Polyporales: *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr., *Daedalea quercina* (L.) Pers., *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst., *B. fumosa* (Pers.) P. Karst., *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt., *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx, *Lenzites betulina* (L.) Fr., *L. warnieri* Durieu & Mont., *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr., *P. varius* (Pers.) Fr., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst., *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr., *T. hirsuta* (Wulfen) Pilát, *T. pubescens* (Schum.: Fr.) Pilát, *T. suaveolens* (Fr.)Fr., *T. versicolor* (L.) Lloyd; Russulales: *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.; Agaricales: *Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar,

Fistulina hepatica (Schaeff.) Sibth, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Pleurotus cornucopiae* (Paulent) Rolland, *P. dryinus* (Pers.) P. Kumm., *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quél., *Schizophyllum commune* Fr., *Pholiota aurivella* (Batsch) P. Kumm., *P. decussata* (Fr.) M.M. Moser, *Phyllotopsis nidulans* (Pers.) Singer; Thelephorales: *Thelephora terrestris* Ehrh., Auriculariales: *Auricularia mesenterica* (Dicks.) Pers.

Среди изученных видов представлены эвритрофы первого и второго порядков, поли- и моновалентные стенотрофы в отношении древесных субстратов, виды, осуществляющие различные стадии разложения древесины в природе: облигатные и факультативные паразиты, факультативные сапротрофы.

Обнаружено высокое разнообразие культурально-морфологических характеристик у штаммов изученных видов. Отмечаются существенные различия в скоростях роста, микро- и макроморфологии мицелия, формировании анаморф (бластоконидий, артроконидий, хламидоспор) в культуре, значениях ростовых коэффициентов. Для оценки штаммового разнообразия разных видов в культуре нами предложено использовать методику расчета коэффициента вариабельности (QW) в пределах вида, основанную на принципе парных сравнений, используемом для построения аддитивных функций полезности (Елтаренко, 1995). Данная методика позволяет учесть значение не только наличия или отсутствия тех или иных признаков, но и возможные варианты их проявления, а также разные степени значимости и объективности. Сравнимые признаки представляли собой пять основных параметров, лежащих в основе культурально-морфологической характеристики штаммов (средняя скорость роста, тип колонии, характер анаморфы, наличие телеоморфы на стерильных средах и ростовой коэффициент). Были проведены расчеты QW для всех изученных видов, однако приводятся только для тех из них, представительство которых в коллекции превышало пять штаммов (рис. 4). При сопоставлении полученных результатов с эколого-трофическими характеристиками видов в природе, обнаружена связь штаммового разнообразия в культуре с шириной трофического диапазона вида в природе, что подтверждает наши предположения. Максимальной вариабельностью ($QW > 0,40$) обладают виды, относящиеся к эвритрофам первого и второго порядков с позиций разнообразия древесных субстратов произрастания и их степени разложения. Виды, характеризующиеся выраженной спецификой местообитания и трофической специализации, не проявляют в культуре значительной вариабельности в характеристиках штаммов ($QW < 0,30$).

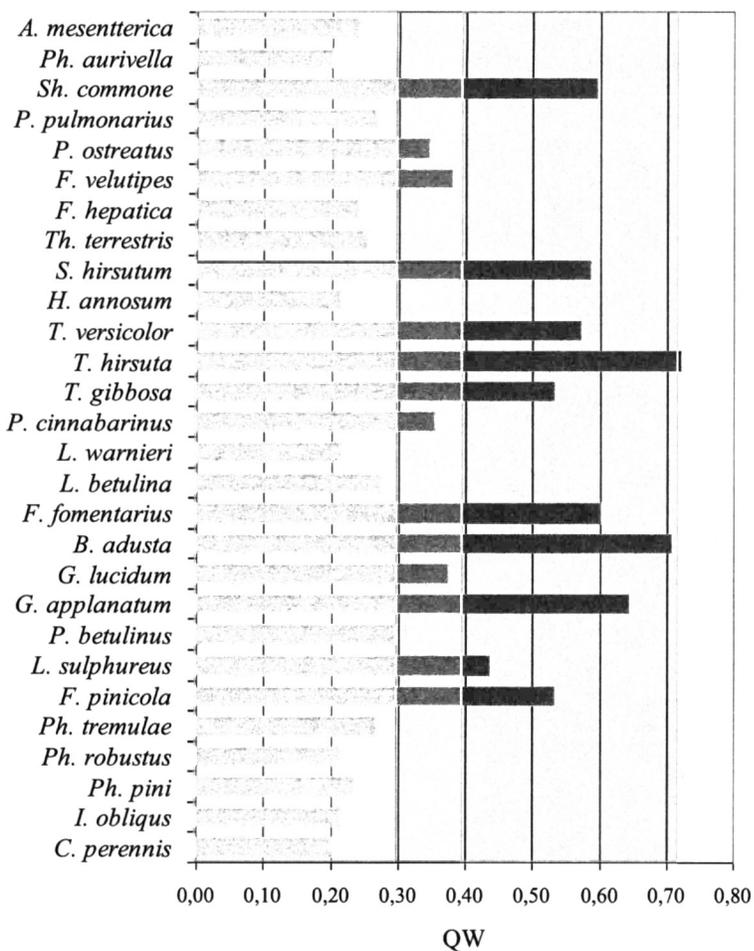


Рис. 4. Различные степени штаммовой вариабельности видов ксилотрофных базидиомицетов в условиях чистой культуры

Определенную долю составляет группа видов, для которых характерна средняя степень вариабельности культуральных признаков, незначительная разница в скоростях роста, слабо выраженные отличия в макро- и микроморфологии ($0,30 < QW < 0,40$). Их субстраты представлены небольшим набором видов, но отмечается варьирование положения в сукцессионных рядах разложения древесины.

Полученные данные свидетельствуют о существовании связи между шириной субстратной специализации вида в отношении природного древесного субстрата и степенью его внутривидового полиморфизма в культуре.

Глава 4. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ШТАММОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ

При погруженном культивировании выявлены несколько морфотипов глубинного мицелия: мицелиальные филаменты – роды *Vjerkandera*, виды *C. perennis*, *I. dryadeus*, *I. obliquus*, *S. hirsutum*, *F. hepatica*, *S. commune*; рыхлые, опущенные пеллеты – роды *Phellinus*, *Polyporus*, а также виды *P. betulinus*, *L. sulphureus*, *H. annosum*, *F. pinicola*; плотные пеллеты с гладкой поверхностью – представители рода *Ganoderma*, а также видов *F. fomentarius*, *P. cinnabarius*. Причем среди пеллет последнего типа обнаруживаются гигантские, с тенденцией к дифференцировке мицелия внутри такой структуры, что отмечено для культур видов – представителей родов *Trametes*, *Lenzites*. Размеры структур варьировали в довольно широких пределах (от 10,0 мкм до 12,5 мм). Образование плотных пеллет у афиллофороидных грибов характерно для видов с димитической и тримитической гифальными системами, тогда как преимущественно филаментный рост – для видов с мономитической. Наблюдается своеобразная параллель: моно- – ди- – тримитическая гифальная система и филаменты – рыхлые пеллеты – плотные пеллеты с внутренней дифференциацией (рис. 5). Проведенный анализ соответствий на основе выборки, составленной представителями афиллофороидных грибов, позволил установить наличие трех групп, различающихся по типу морфологических структур при глубинном развитии. Обособленность существующих группировок отмечается с большим значением инерции ($\Sigma=99,27\%$), что свидетельствует в пользу предполагаемой закономерности.

У различных видов и штаммов обнаружена разная способность к накоплению биомассы, а также установлено, что эти параметры определенным образом ($r=0,45$) коррелируют со скоростями роста мицелия в поверхностной культуре (рис. 6).

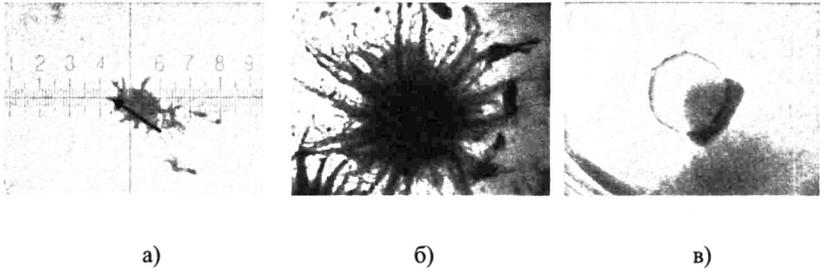


Рис. 5. Основные морфотипы глубинного мицелия штаммов различных видов: а) филаменты *C. perennis* (штамм СРе-3) ($\times 200$); б) рыхлые опушенные пеллеты *F. pinicola* (штамм Fpi-2) ($\times 200$); в) плотная гигантская пеллета *T. versicolor* (штамм Тгw-2) (в натуральную величину), на поперечном срезе заметна тенденция к дифференциации мицелия (показана стрелкой)

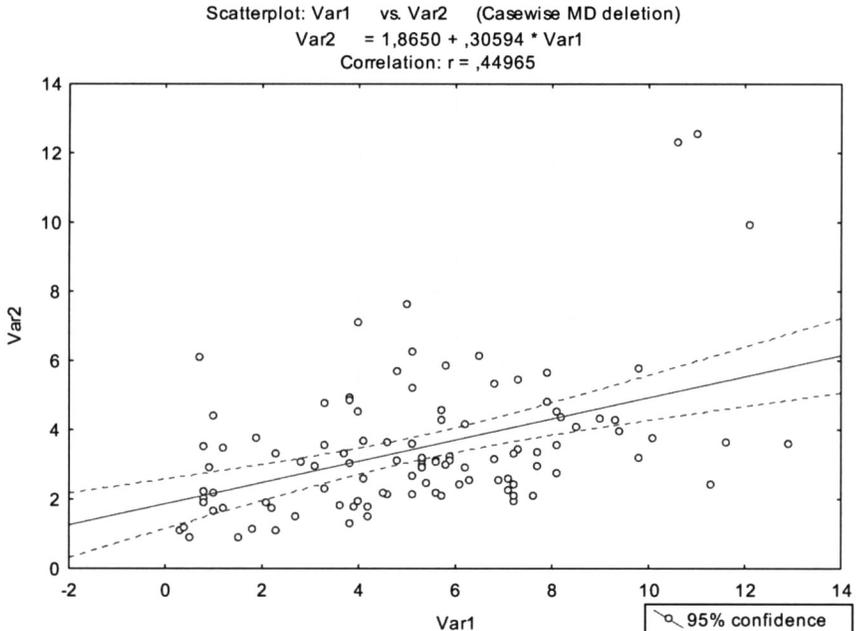


Рис. 6. Корреляционная зависимость и уравнение регрессии между показателями скоростей роста и накопления биомассы глубинного мицелия у штаммов различных видов ксилотрофных базидиомицетов (вариант 1 – средняя скорость роста, мм/сут; вариант 2 – биомасса, г/л)

Таким образом, исходя из известных показателей скорости роста мицелия штамма на агаризованных средах, с высокой вероятностью можно предполагать продуктивные свойства культуры, что упрощает процесс скрининга штаммов, перспективных в биотехнологии.

У штаммов изученных видов ксилотрофных базидиомицетов выявлены существенные различия в отношении к содержанию кислорода в культуральной жидкости. Кластерный анализ на основе метода «ближайшего соседа» позволил обнаружить, что установленные отличия прослеживаются у культур на видовом уровне. Сравнительно большая потребность в кислороде объединяет культуры видов, образующих *in situ* однолетние плодовые тела: *C. perennis*, *I. obliquus*, *L. sulphureus*, *P. betulinus*, *B. adusta*, *P. cinnabarinus*, *F. hepatica*, *S. commune*.

Обнаружена тенденция связи между потребностью в кислороде и характером гнили древесины, отмечаемым для того или иного вида в природе. Повышенные концентрации предпочитают виды, для которых показана заболонная гниль, а низкое содержание растворенного кислорода удовлетворяет виды, вызывающие сердцевинную гниль. Однако для более четких выводов в данном контексте выборка недостаточна, поэтому следует говорить лишь о тенденциях такой связи.

Глава 5. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ВИДОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ТРОФИЧЕСКИМИ СТРАТЕГИЯМИ В УСЛОВИЯХ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

Для исследований были отобраны представители облигатных паразитов: *Ph. tremulae*, *S. crispa*, *H. annosum*; факультативных паразитов: *I. obliquus*, *L. sulphureus*, *F. fomentarius*, *F. hepatica* и факультативных сапротрофов: *F. pinicola*, *G. applanatum*, *G. lucidum* и *P. cinnabarinus*.

Выявлены отличия в предпочтении разных питательных сред представителями различных трофических группировок (использован непараметрический тест Дункана). Для группировки облигатных паразитов на всех изученных средах установлены минимальные скорости роста. У факультативных паразитов и факультативных сапротрофов на всех изученных средах отмечены относительно высокие средние скорости роста, причем последние наилучшим образом развивались на крахмалистых средах. Более полной реализации физиологического потенциала облигатных и факультативных паразитов, прежде всего редких и ценных в биотехнологии видов, можно достичь использованием некоторых ростовых факторов, а также адаптогенов различной природы.

Изучено воздействие парааминобензойной кислоты (ПАБК) на рост и развитие культур. Установлено, что ПАБК в концентрации 0,005 г/л оказывает позитивное влияние на развития мицелия большинства штаммов изученных видов, различающихся трофическими стратегиями и представляющих интерес с позиций практической экологии и биотехнологии (рис. 7).

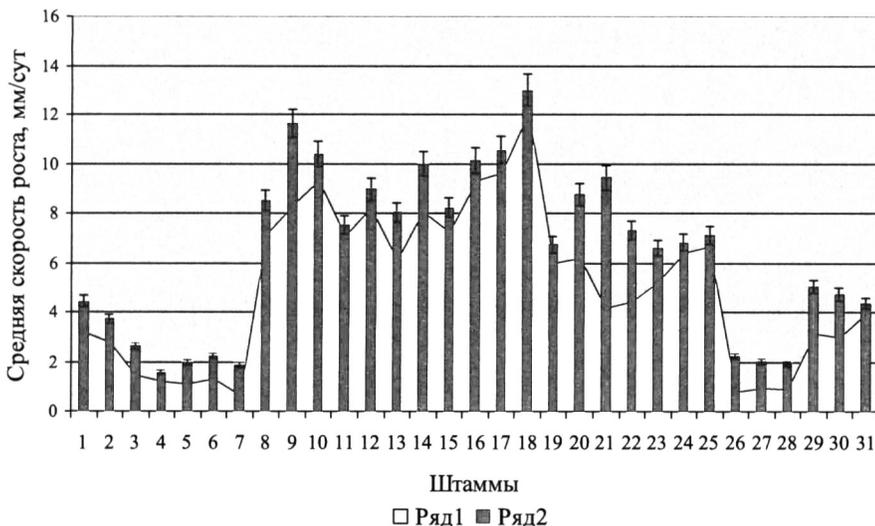


Рис. 7. Влияние ПАБК на скорость роста штаммов ксилотрофных базидиомицетов: ряд 1 – контроль (КГА); ряд 2 – опыт (КГА+ПАБК). Штаммы: *I. obliquus*: 1-Ю-1, 2-Ю-2, 3-Ю-3; *Ph. tremulae*: 4-Pht-1, 5-Pht-2; 6-Pht-3; *S. crispa*: 7-AI-10; *F. pinicola*: 8-Fpi-1, 9-Fpi-2, 10-Fpi-3; *L. sulphureus*: 11-PD-99, 12-PD-01, 13-Ah-02; *G. applanatum*: 14-G-1, 15-G-2, 16-G-3; *G. lucidum*: 17-Gl-1, 18-Gl-3, 19-Gl-6; *F. fomentarius*: 20-AH-96, 21-Nic-02, 22-Lp-05; *P. cinnabarinus*: 23-PyC-1, 24-PyC-2, 25-PyC-4; *H. annosum*: 26-Han-1, 27-Han-2, 28-Han-3; *F. hepatica*: 29-Fh-1, 30-Fh-1a, 31-Fh-5 (планки погрешностей – ошибка средней, $p < 0,05$)

Не изменяя существенно темпов развития в целом, ПАБК сокращает продолжительность фазы адаптации культур видов, обладающих паразитной трофикой (*Ph. tremulae*, *S. crispa*, *H. annosum*) к субстрату. Характерной чертой влияния ПАБК на штаммы факультативных паразитов и факультативных сапротрофов оказалось позитивное воздействие на стадиях логарифмического и стационарного роста, когда доступные ресурсы субстрата в большей степени исчерпаны.

Полученные результаты косвенно свидетельствуют о стимуляции обменных процессов у факультативных сапротрофов, связанных с вовлечением в метаболизм труднодоступных источников углерода.

В качестве адаптогенных добавок также испытаны селенат натрия (Na_2SeO_4) и 9-фенил-симметричный-октагидроселеноксантен (селенопирин, СП-1). Соединения вносили в среду в концентрациях 10^{-6} г/л в пересчете на селен. Оценка результатов с использованием теста Дункана показала, что виды, склонные к паразитной трофике в природных условиях, обнаруживают факты стимуляции органической формой селена, а обладающие сапротрофной трофикой – неорганической. Общей тенденцией является более ранний переход к фазе стационарного роста, при этом отмечается существенное сокращение фазы адаптации, и незначительное сокращение фазы логарифмического роста. Эффект синхронизации развития культуры отмечался нами ранее на примере микромицетов – продуцентов антибиотиков (Ильина и др., 2000). Позитивное воздействие селенопирана на развитие штаммов облигатных паразитов, вероятно, определяется частичным снятием окислительного стресса, неминуемо развивающихся у паразитов *ex situ*.

Обнаруженные факты позволяют рекомендовать ряд соединений (парааминобензойная кислота, селенат натрия, 9-фенил-симметричный-октагидроселеноксантен) в качестве компонентов питательных сред для культивирования изолятов ксилотрофных базидиомицетов.

Глава 6. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ СЕЛЕНА ПРИ ХРАНЕНИИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КУЛЬТУР КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

При длительном хранении и частых пересевах культуры нередко изменяют физиологические и продуктивные параметры. Отчасти это обусловлено спонтанной диссоциацией штаммов, инициируемой окислительными стрессами.

Изучены возможности использования соединений селена (селенат натрия, 9-фенил-симметричный-октагидроселеноксантен) при хранении культур *S. crispa* и *G. lucidum*. Состояние культур оценивалось по маркерным показателям: скорости роста, степени базофилии протоплазмы, оксидазной активности культуры. Установлено, что указанные соединения способствуют сохранению физиологических параметров хранящихся культур в течение 18–24 месяцев.

Предположение о том, что соединения селена нивелируют негативное влияние свободных радикалов, нашло подтверждение при определении содержания

в мицелии хранящихся культур биохимического маркера окислительного стресса – малонового диальдегида (МДА). Предварительно проведенный анализ жирнокислотного состава мицелия выявил преобладание ненасыщенных жирных кислот (моноеновых, диеновых), что свидетельствует о существовании ресурса для образования МДА при активизации окислительных процессов.

Уровень МДА в мицелии определяли на этапе адаптации к субстрату, в периоды логарифмического и стационарного роста, на разных сроках хранения. В фазу адаптации уровень МДА находится на довольно высоком уровне, что свидетельствует о наличии окислительного стресса (табл. 2). С переходом культур к логарифмическому и стационарному росту содержание МДА в мицелии несколько снижается и стабилизируется.

Таблица 2

Содержание малонового диальдегида в мицелии штаммов *G. lucidum* и *S. crispa* на стадии активного роста и после продолжительного хранения при температуре 4°C (нмоль/г)

Время развития мицелия с момента инокуляции	Виды, штаммы			
	<i>G. lucidum</i>			<i>S. crispa</i>
	Gl-1	Gl-3	Gl-6	Al-10
трое суток (фаза адаптации)	88,6±2,14	102,1±1,22	94,5±2,05	123,4±3,24
пять суток (фаза логарифмического роста)	64,6±1,96	80,5±2,04	85,1±4,43	112,7±5,96
семь суток (фаза стационарного роста)	59,9±2,55	75,9±4,37	82,1±3,29	88,4±1,90
девять суток (фаза стационарного роста)	60,1±2,81	87,8±3,47	90,2±4,75	84,2±3,77
После хранения в течение:				
3 месяцев	40,8±1,80	51,2±6,38	141,9±4,75	77,8±6,12
6 месяцев	93,8±7,24	84,9±8,23	210,5±5,79	126,9±4,38
9 месяцев	115,9±3,53	171,5±4,59	262,3±1,75	162,5±5,30
12 месяцев	148,1±4,57	214,0±6,57	105,2±2,72	147,9±5,84
18 месяцев	107,8±4,08	177,6±5,47	104,2±1,78	-
24 месяцев	91,2±2,54	168,1±3,21	100,6±3,33	-

Содержание МДА в образцах мицелия, хранящегося на средах с добавлением соединений селена, сравнивали с показателями, отмеченными в контроле на стадии логарифмического роста (рис. 8).

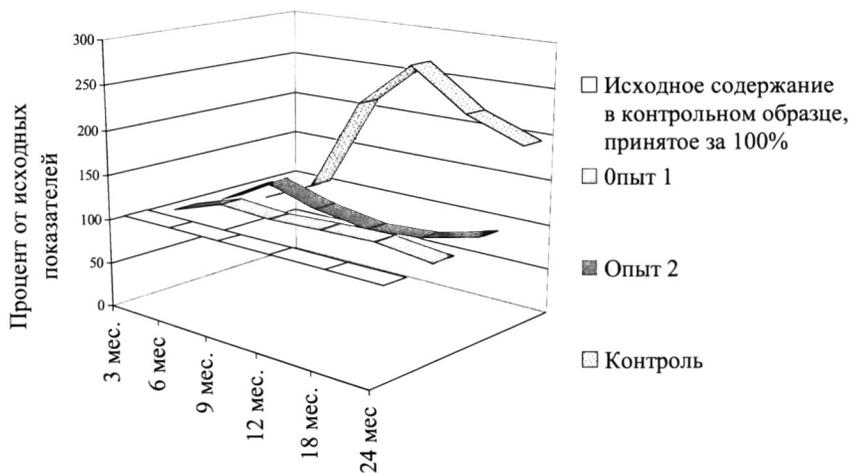


Рис. 8. Динамика содержания малонового диальдегида (МДА) в образцах мицелия *G. lucidum* (на примере штамма G1-3) при продолжительном хранении на различных средах: контроль – КГА; опыт 1 – КГА, обогащенный Na_2SeO_4 ; опыт 2 – КГА, обогащенный 9-фенил-симметричным-октагидроселеноксантеном (вещества добавлены в концентрации 10^{-4} г/л среды в пересчете на селен)

Полученные результаты свидетельствуют о значительном нивелировании для мицелия фактора окислительного стресса и целесообразности использования соединений селена в практике хранения культур ксилотрофных базидиомицетов.

Глава 7. АДАПТАЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ПОЛИЕНОвого МАКРОЛИДА НИСТАТИНА

Эргостерин, входящий в состав мембран грибов, является своеобразной биохимической мишенью для повреждающего действия полиеновых макролидов, в том числе нистатина. В литературе сообщается о различных механизмах, обеспечивающих устойчивость к нистатину у дрожжей и мицелиальных грибов, которые в той или иной степени связаны с изменением синтеза эргостерина, однако, по

данному вопросу нет единого мнения. Вероятно одновременное существование различных систем адаптации.

В качестве объектов исследования изучены тканевые (Gl-1, Gl-3, Gl-6) и споры (GD-I-1, GD-I-2, GD-I-4) изоляты *G. lucidum*. Определена концентрация нистатина, лимитирующая развитие изученных штаммов (120 ЕД/мл), условно эти штаммы названы полиенчувствительными. Путем высева базидиоспор на питательные среды, содержащие нистатин в указанной концентрации, получены пять полиентолерантных дикариотических штаммов *G. lucidum*: GD-II-ун1, GD-II-ун2, GD-II-ун3, GD-II-ун4, GD-II-ун5.

Обнаружены различия в содержании эргостерина даже между обычными (полиенчувствительными) штаммами *G. lucidum* в 1,3–2,1 раза. Значительное его содержание обнаружено в мицелии штамма Gl-1, характеризующегося повышенной склонностью к образованию базидиом в чистой культуре. Показатели содержания эргостерина в мицелии изученных полиентолерантных штаммов превышают среднее значение, установленное для полиенчувствительных в 2,0–2,4 раза (рис. 9).



Рис. 9. Содержание эргостерина в образцах мицелия разных штаммов *G. lucidum* ($p < 0,05$, планки погрешностей – ошибка средней)

Полиентолерантные штаммы быстро формируют примордии. Дифференцированные зачатки плодовых тел, имеющие типичную для вида структуру, образуются в короткие сроки (9–12 суток от момента посева). Отмечена своеобразная цепь событий: после освоения вегетативным «первичным» мицелием площади питательной среды, поверх образуется бархатистая корочка, богатая артрспорами. Из

артроспор прорастает «вторичный» мицелий, образующий плотные островки, на которых формируются зачатки плодовых тел (рис. 10).

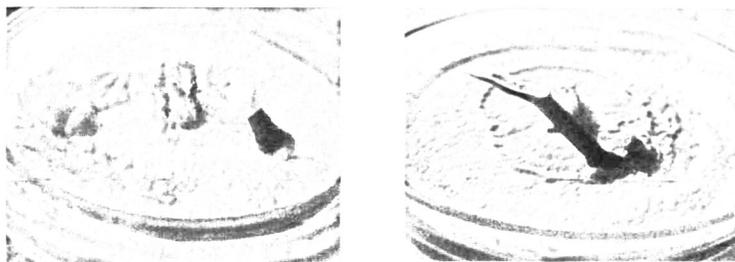
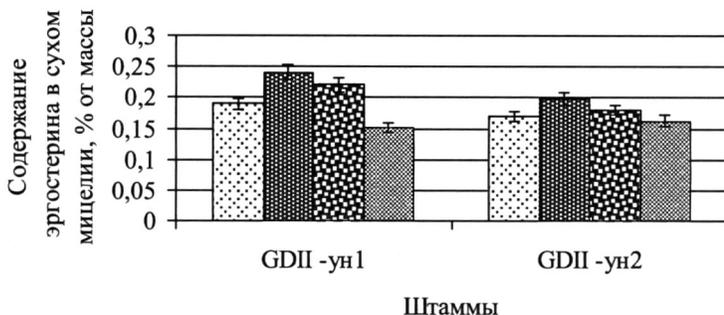


Рис. 10. Формирование примордиев *G. lucidum*: слева штамм GD II-ун1, справа штамм GD II-ун2

Результаты определения содержания эргостерина в частях мицелия и базидиомах свидетельствуют о сопряженности морфогенетических процессов и интенсивности биосинтеза эргостерина у изученного вида (рис. 11).



□ Вегетативный мицелий ▨ Коричневая корочка
 ▤ Примордии ▩ Базидиомы

Рис. 11. Содержание эргостерина в разных частях мицелия колоний *G. lucidum* ($p < 0,05$, планки погрешностей – ошибка средней)

Изучены также полиенчувствительные штаммы *P. ostreatus*: ПН-10, ПЮ(К)-05 (тканевые изоляты); ПЮ-1-09 ПЮ-1-10 (споровые изоляты), а также полиентолерантные споровые изоляты (П1-ун1, П1-ун2, П1-ун3, П1-ун4, П1-ун5). Некоторые из полиентолерантных штаммов характеризовались исключительно медленным ро-

стом, а другие, напротив, интенсивным. Среди таких штаммов обнаружены как характеризующиеся относительно высокими, так и пониженными, по сравнению с контрольными штаммами, показателями содержания эргостерина (рис. 12).

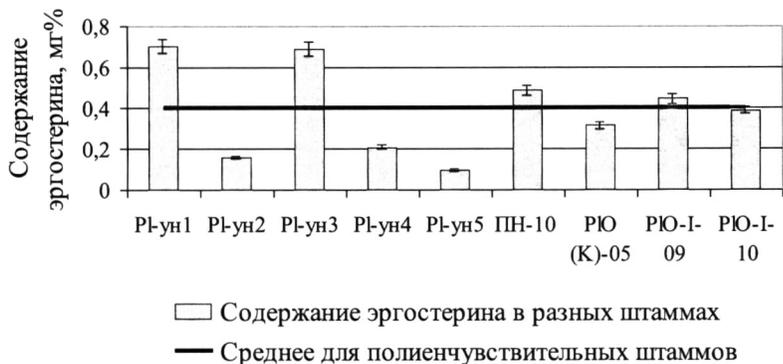


Рис. 12. Содержание эргостерина в образцах мицелия разных штаммов *P. ostreatus*

Штаммы с повышенным содержанием эргостерина обладали более выраженной склонностью к образованию примордиев, а у штаммов с пониженным его содержанием их образование происходило менее интенсивно (рис. 13).

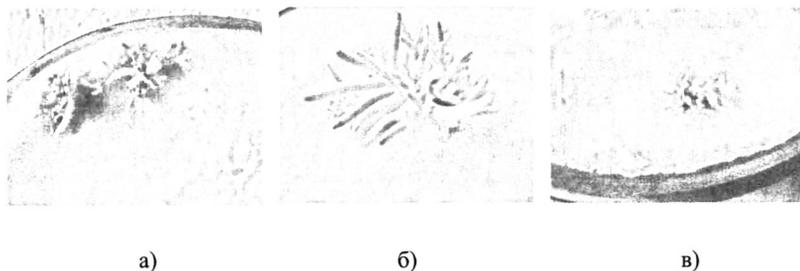


Рис. 13. Примордии на мицелии штаммов *P. ostreatus*: а) полиэтиленчувствительный штамм ПН-10 (тканевый изолят); б) полиэтиленчувствительный штамм Pl-ун1; в) полиэтиленчувствительный штамм Pl-ун2

Таким образом, изученные виды ксилотрофных базидиомицетов, являющиеся в свою очередь исключительно важными объектами биотехнологии, характеризуются разными стратегиями формирования устойчивости к экзогенному воздействию полиенов. Установленные закономерности могут быть использованы при

скрининге штаммов – перспективных продуцентов эргостерина, а также склонных к плодоношению в условиях культуры.

Глава 8 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИСТОЧНИКОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЛИГНИНА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Лигнин, как компонент природного субстрата ксилотрофов, влияет на морфогенез гриба в естественных условиях (Фенгел, 1988). В качестве трофических факторов изучены формы лигнина с разной степенью конденсации молекулы – экстрагированные системой полярных и неполярных растворителей нативные и метанолизные опилки древесины дуба. Экстрагирование материала обеспечивает возможность развития на нем видов, которые не встречаются в природе на древесине дуба и прочих лиственных пород. Метанолиз – модификация лигнинсодержащего материала, позволяющая существенно увеличить в нем число доступных метоксильных групп и олигомерных фрагментов лигнина (Закис, 1987). Содержание метоксильных групп в нативных опилках составляло 18,9 мг/г материала или 0,61 мМ/г; а в опилках, подвергшихся метанолизу – 41,6 мг/г (1,32 мМ/г), что в целом соответствует определенным нами показателям соответственно, в здоровой и фаутной древесине дуба (Ильина и др., 2006). Содержание холоцеллюлозы в образцах опилок отличалось недостоверно и составляло от 78,7 до 81,6%.

Установлено, что факультативные сапротрофы активнее осваивают метанолизный субстрат. Альтернативные группировки, напротив, лучше развиваются на нативных опилках. Сапротрофные виды эволюционно адаптированы к эффективному использованию обилия метоксильных групп в значительной степени разрушенной древесины, что следует учитывать при работе с их культурами.

Изучение активности ферментов ксилотрофных базидиомицетов проводилось при твердофазном культивировании на экстрагированных нативных и метанолизных дубовых опилках, пропитанных соевым раствором Чапека. Полученные данные представлены на примерах штаммов, для которых отмечены максимальные показатели, однако выявленные и описываемые ниже закономерности прослеживаются на видовом уровне (табл. 3).

На метанолизных опилках, по сравнению с нативными, достоверно снижается общая оксидазная активность у паразитных видов, что, вероятно, определяется воздействием фенольных компонентов субстрата. Это, возможно, и является одной из причин приуроченности этой группы грибов к живым деревьям, древесина

которых на начальных этапах колонизации имеет небольшое, по сравнению с фантой, содержание мономерных и олигомерных фенольных структур (Фенгел, 1978).

Таблица 3

Общая оксидазная, пероксидазная и целлюлазная активность мицелия штаммов изученных видов на нативных (Н) и метанолизных (М) опилках

Штамм	Ферментативная активность					
	общая оксидазная, ед.оп.пл.×100/г×сек		общая пероксидазная, ед.оп.пл.×100/г×сек		общая целлюлазная (по убыли холоцеллюлозы), %	
	Н	М	Н	М	Н	М
<i>I. obliquus</i> , IO-3	0,65±0,13	0,61±0,12	0,53±0,11	5,80±1,16	8,30±1,66	18,30±3,66
<i>Ph. tremulae</i> , Pht-3	0,24±0,05	0,11±0,02	2,64±0,53	1,12±0,22	1,70±0,34	3,60±0,72
<i>F. pinicola</i> , Fpi-3	0,09±0,02	0,33±0,07	0,26±0,05	0,11±0,01	14,10±2,82	20,32±4,06
<i>L. sulphureus</i> , Ah-02	0,11±0,02	-	0,13±0,03	-	13,73±2,74	17,67±3,52
<i>G. applanatum</i> , G-3	0,09±0,02	0,19±0,04	1,75±0,35	4,00±0,80	7,80±1,56	18,22±3,64
<i>G. lucidum</i> , Gl-3	0,38±0,08	0,58±0,12	2,06±0,41	5,90±1,18	8,12±1,62	19,68±3,92
<i>F. fomentarius</i> , Lp-05	0,15±0,03	0,27±0,05	1,83±0,36	2,90±0,58	5,97±1,18	9,62±1,92
<i>P. cinnabarinus</i> , PyC-4	0,62±0,12	0,51±0,10	0,53±0,11	-	6,91±1,38	14,62±2,92
<i>H. annosum</i> , Han-3	0,31±0,06	0,13±0,03	0,45±0,09	-	10,30±2,06	17,56±3,5
<i>F. hepatica</i> , Fh-5	0,32±0,06	0,19±0,04	0,47±0,09	-	15,90±3,18	16,55±3,3

Установленное увеличение оксидазной активности на субстрате с доступными фенольными компонентами лигнина у сапротрофных видов, может свидетельствовать о наличии у них индуцибельных форм оксидазных ферментов. Метанолизный субстрат может содержать разнообразные фенольные компоненты, такие

как сиригалазин, гваякол, пирокатехин и другие, являющиеся индукторами биосинтеза ферментов, в частности лакказ (Горбатова, 2007).

При развитии на нативном субстрате все виды грибов обладают в разной степени выраженной пероксидазной активностью, а выявленные отличия в основном связаны не с шириной трофической специализации, а с типом вызываемой гнили. Высокая активность характерна, за редким исключением, для возбудителей белой (*Ph. tremulae*, *G. applanatum*) и смешанной гнили (*F. fomentarius*). Возбудители бурой гнили при культивировании на метанолизных опилках показали снижение активности пероксидаз.

При развитии на нативных опилках представители бурой гнили активнее, чем представители белой, разрушали целлюлозу, при этом достоверных отличий в утилизации целлюлозы на разных субстратах у грибов бурой гнили не обнаружено. Рост на метанолизном субстрате сопровождался более интенсивным потреблением целлюлозы у представителей белой гнили. Фенольные компоненты лигнина, и, в частности, содержащие метоксильные группы, индуцируют выработку целлюлазных ферментов у грибов этой группы (Muller, 1988). Это подтверждается полученными результатами и свидетельствует о целесообразности дериватизации лигноцеллюлозных субстратов для биоконверсии.

В ходе исследований общей оксидазной и общей пероксидазной активностей обнаружены достоверные различия показателей у штаммов грибов белой гнили, чего не отмечено для представителей бурой. Для выяснения возможных зависимостей в эксперимент были включены 15 видов грибов (по пять штаммов каждого, итого 75 штаммов), вызывающих белую коррозионную гниль древесины: *C. perennis*, *I. obliquus*, *Ph. tremulae*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *B. adusta*, *F. fomentarius*, *L. betulina*, *L. warnieri*, *P. cinnabarinus*, *T. gibbosa*, *T. hirsuta*, *T. versicolor*, *H. annosum*, *T. terrestris*. Данные, полученные при исследовании скоростей роста на лигноцеллюлозном субстрате, результаты определения общей оксидазной и общей пероксидазной активностей штаммов были сопоставлены с их «исходными» ростовыми характеристиками, зафиксированными на сусло-агаре. Обнаружена корреляция ростовых показателей на агаризованных и твердофазных субстратах ($r = 0,76$, $p < 0,05$). Это позволяет оперировать терминами «относительно быстрорастущие» и «относительно медленно растущие» без дополнительных уточнений, не принимая во внимание характер субстрата. Установлено существование зависимостей между скоростью роста мицелия и сторонами ферментативной активности у культур изученных видов (рис. 14).

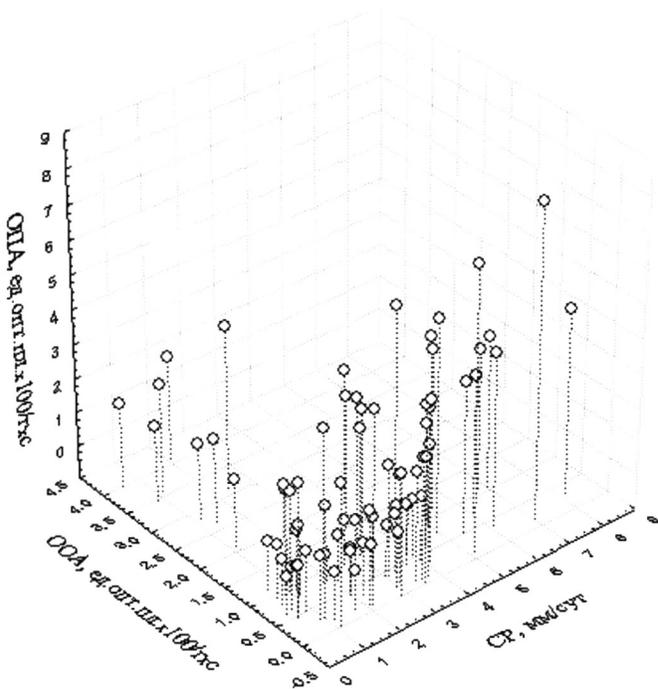


Рис. 14. Трехмерная проекция зависимости уровней общей оксидазной (OOA) и общей пероксидазной (OPA) активностей штаммов от средних скоростей роста мицелия

Таким образом, быстрорастущие штаммы грибов белой гнили, в среднем характеризуются более высокой общей пероксидазной, а медленно растущие – общей оксидазной активностью. Данную закономерность, с определенной долей вероятности ($r=0,86$ по оксидазной активности и $r=0,30$ – по пероксидазной), можно использовать в ходе скрининга перспективных штаммов.

Изучено влияние лигноцеллюлозных компонентов на процесс накопления биомассы и синтез эргостерина культурами в глубинных условиях. Экспериментальные среды были приготовлены на основе экстрактов – перколятов лигнинов Классона (Оболенская, 1991), в которые было добавлено 30,0 г/л глюкозы и 3,0 г/л целлобиозы. При анализе сухого вещества перколятов нативного и метанолизного лигнинов была установлена существенная разница в содержании метоксильных групп – показатели составили $2,50 \pm 0,06$ мМ/г и $7,45 \pm 0,03$ мМ/г соответственно.

Контрольной служила среда Чапека, модифицированная комплексом сахаров аналогично экспериментальным средам.

Внесение перколятов позитивно повлияло на ход накопления биомассы мицелия изученных видов, причем большинство штаммов (за исключением облигатных паразитов) наилучшим образом реагировали на внесение метанолизного лигнина (табл. 4).

Таблица 4

Влияние перколятов лигнина на процесс накопления биомассы и синтеза эргостерина мицелием некоторых видов ксилотрофных базидиомицетов

Вид, штамм	Варианты питательных сред (на основе среды Чапека)					
	контроль		экстракт нативного лигнина		экстракт метанолизного лигнина	
	масса навески (мг)	% эргостерина	масса навески (мг)	% эргостерина	масса навески (мг)	% эргостерина
<i>I. obliquus</i> , IO-2	2983,7 ±182,1 ^a	0,74 ±0,04 ^{a*}	3113,3 ±133,1 ^a	0,79 ±0,02 ^{a*}	3023,0 ±104,3 ^a	1,31 ±0,02 ^{b*}
<i>Ph. tremulae</i> , Pht-1	1611,2 ±131,0 ^a	0,41 ±0,01 ^{a*}	2052,3 ±152,7 ^b	0,46 ±0,02 ^{a*}	1439,7 ±71,3	0,69 ±0,02 ^{b*}
<i>F. pinicola</i> , Fpi-1	5694,0 ±82,4	0,38 ±0,03 ^{a*}	7529,5 ±151,5 ^a	0,35 ±0,04 ^{a*}	8506,1 ±153,8 ^b	0,39 ±0,01 ^{a*}
<i>L. sulphureus</i> , PD-99	5782,1 ±80,7	0,32 ±0,07 ^{a*}	6108,1 ±78,9 ^a	0,41 ±0,02 ^{a*}	6832,3 ±132,1 ^b	0,47 ±0,06 ^{b*}
<i>G. apllanatum</i> , G-2	3179,3 ±102,2	0,70 ±0,09	4321,8 ±122,5 ^a	1,08 ±0,03 ^{a*}	4751,1 ±144,4 ^b	1,03 ±0,09 ^{a*}
<i>G. lucidum</i> , Gl-3	3638,2 ±74,2 ^a	0,87 ±0,01 ^{a*}	3104,4 ±121,1	0,91 ±0,02 ^{a*}	5303,2 ±139,1 ^b	1,49 ±0,02 ^{b*}
<i>F. fomentarius</i> , Nic-02	3081,7 ±83,7	1,06 ±0,04	5831,3 ±160,3 ^b	1,20 ±0,06 ^{a*}	4107,2 ±182,6 ^a	1,42 ±0,05 ^{b*}
<i>P. cinnabarinus</i> , PyC-1	3292,2 ±90,3	1,11 ±0,13 ^{a*}	5062,8 ±144,8 ^b	1,19 ±0,02 ^{a*}	3619,5 ±172,9 ^a	1,50 ±0,03 ^{b*}
<i>H. annosum</i> , Han-2	2894,3 ±100,2 ^b	0,65 ±0,01 ^{a*}	2774,3 ±102,9 ^b	0,68 ±0,03 ^{a*}	1652,3 ±23,9 ^a	0,76 ±0,04 ^{b*}
<i>F. hepatica</i> , Fh-5	2093,3 ±89,6	1,60 ±0,04 ^{a*}	3575,7 ±113,1 ^a	1,72 ±0,04 ^{b*}	4643,4 ±84,8 ^b	1,56 ±0,06 ^{a*}

Примечание: результаты теста Дункана –a,b – маркировка групп по достоверным различиям в показателях биомассы; a*,b* – по содержанию эргостерина

Данный показатель следует рассматривать как один из факторов, определяющих положение вида в сукцессионных рядах деструкции древесины в природе.

Содержание эргостерина выше в образцах мицелия, выращенного на средах с добавлением перколятов метанолизного лигнина, что достоверно отмечено для представителей белой гнили, и, как исключение для представителя бурой гнили *L. sulphureus* (см. табл. 4). Стимуляция процессов образования эргостерина не обнаруживает достоверной корреляции с процессами стимуляции накопления биомассы мицелия. Вероятно, помимо затрат этого вещества на пластический обмен, культуры накапливают материал для синтеза на его основе веществ и образования структур на последующих стадиях развития, формируя резерв для синтеза вторичных метаболитов, связанных с протеканием репродуктивных процессов. Установленные закономерности предполагают исследование влияния лигноцеллюлозных компонентов субстратов на процессы образования репродуктивных структур в условиях поверхностного культивирования на плотных средах.

При внесении в картофельно-глюкозный агар (КГА) опилок в количестве 2% от массы среды, обнаружен факт стимуляции роста большинства штаммов. У ряда культур, в присутствии лигноцеллюлозных источников, на 12–15 сутки развития было отмечено формирование мицелиальных узелков, а на 20–25 сутки сформировались типичные примордии (табл. 5).

Таблица 5

Формирование зачатков плодовых тел на мицелии штаммов изученных видов ксилотрофных базидиомицетов на разных средах в стерильных условиях

Вид, штамм	Сроки появления зачатков плодовых тел (сутки после холо-дильника) и их дифференцирование на разных средах*											
	КГА (контроль)				КГА + нативные опилки				КГА + метанолиз-ные опилки			
	12	15	20	25	12	15	20	25	12	15	20	25
<i>I. obliquus</i> , IO-1	-	-	-	-	+	+	+	+д	+	+	+д	+д
<i>Ph. tremulae</i> , Pht-1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>S. crispa</i> , AI-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. pinicola</i> , Fpi-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sulphureus</i> , PD-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. applanatum</i> G-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+д
<i>G. lucidum</i> , Gl-1	-	-	+	+д	+	+	+д	+д	+	+д	+д	+д
<i>F. fomentarius</i> , Nic-02	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+д	+д	+д
<i>P. cinnabarinus</i> , PyC-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+д	+д

Вид, штамм	Сроки появления зачатков плодовых тел (сутки после холо- дильника) и их дифференцирование на разных средах*											
	КГА (контроль)				КГА + нативные опилки				КГА + метанолиз- ные опилки			
<i>H. annosum</i> , Han-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. hepatica</i> , Fh-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. velutipes</i> , FV-9	-	-	+	+д	-	+	+д	+д	-	+д	+д	+д
<i>P. ostreatus</i> , PIO(23)-08	-	-	+д	+д	-	+	+д	+д	-	+	+д	+д
<i>S. commune</i> , SZ-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+д	+д
<i>P. aurivella</i> , PhoA-5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+д	+д

*Обозначения: «-» – примордиев не отмечено; «+» отмечены зачаточные структуры примордиев (узелки); «д» – дифференцированные примордии, заметен гименофор

На средах, содержащих метанолизные источники лигнина, отмечено раннее формирование базидиом *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *F. fomentarius*, *S. commune*, *P. aurivella*, *P. cinnabarinus*. Примордии на таких средах характеризовались, по сравнению с контрольными вариантами, более выраженными, типичными для видов габитусами, с хорошо выраженной дифференциацией (рис. 15).



Рис. 15. Базидиомы, сформированные на КГА с добавлением метанолизных опилок, 20 сутки: слева – *P. cinnabarinus* (штамм PyC-1), справа – *P. aurivella* (штамм PhoA-5)

Образование зачатков плодовых тел и базидиом наблюдалось только у представителей грибов белой гнили. Модельные опыты показали, что грибы этой группы активно деметилируют метоксильные группы (Фенгел, 1988). Опыты с меченым (^{14}C) лигнином свидетельствуют, что при разложении лигнина грибами белой гнили конечный продукт метаболизма CO_2 образуется главным образом из метоксильных групп и в небольшой степени из углерода пропановых цепей и ароматических колец. Таким образом, нет сомнения в том, что метоксильные группы не-

безразличны для культур грибов белой гнили. Метоксильные группы лигнина (концентрация которых заметно выше в древесине, уже подвергшейся процессам деструкции в природе), могут служить факторами плодоношения не только в искусственных, но и в естественных условиях, где могут выступать также и своеобразным фактором отбора.

Глава 9. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАЗИДИОМ И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИЯ *Ganoderma lucidum*

Разработки, связанные с исследованиями возможностей получения стадии телеоморфы у грибов, перспективных в качестве продуцентов биологически активных веществ, актуальны по многим причинам (возможность верификации вида, ведение селекционной работы). Основным компонентом разработанных нами субстратов для получения плодовых тел *G.lucidum* по интенсивной технологии служила гидролизованная ржаная солома. Субстрат подвергался кислотному гидролизу, об эффективности которого судили по убыли массы и совокупной концентрации сахаров в перколяте. Затем гидролизированный субстрат запаривался и помещался в термоустойчивые пластиковые пакеты, которые укупоривались ватно-марлевыми пробками и подвергались стерилизации. Изучены следующие композиции:

- гидролизованная солома – традиционный субстрат, контроль;
- гидролизованная солома в комплексе с экстрагированными нативными опилками (80% : 20%) – первый вариант;
- гидролизованная солома с экстрагированными метанолизными опилками (80% : 20%) – второй вариант.

Процессы морфогенеза протекали более интенсивно в вариантах с использованием метанолизных опилок: примордии, появившиеся, в среднем, на 12 суток ранее, чем в альтернативном варианте и контроле, характеризовались ярко выраженной пигментацией. Показательно сравнение состояния базидиом, полученных при реализации первого и второго вариантов опытов на 55 сутки развития, когда базидиома, полученная на субстрате с метанолизными опилками, уже приступила к спороношению, а у выросшей на субстрате, содержащем нативные опилки, только началось формирование гименофора (рис. 16). Таким образом, отмечена достоверная стимуляция морфогенетических процессов метанолизными лигноцеллюлозными компонентами субстрата. Метоксильные группы лигнина могут служить

фактором, стимулирующим переход культуры к вторичному метаболизму, поскольку одной из иллюстраций этой фазы развития служит телеоморфа.



Рис. 16. Базидиомы *G. lucidum*, полученные в лабораторных условиях на субстратах разного состава (55 сутки развития с момента инокуляции субстратов): на переднем плане – субстрат содержит метанолизные опилки; на заднем плане – субстрат содержит нативные опилки

Исследована возможность использования субстратного мицелия, представляющего собой, фактически, отход грибного производства, после высушивания до постоянной массы и измельчения до фракции 10,0–50,0 мкм, в качестве кормовой добавки к рациону сельскохозяйственной птицы. В условиях крупнейшего в Пензенской области птицеводческого комплекса (ООО ПТФ «Васильевская») проведена серия испытаний кормовой добавки к рациону кур-несушек породы «Бройлер» на биохимические показатели сыворотки крови и материала яиц, получено соответствующее комиссионное заключение о результатах исследований. Установлено достоверное позитивное влияние добавки на белковый и липидный обмен птиц родительского стада, причем особого внимания заслуживает факт увеличения пропорциональной доли в составе холестерина липопротеидов высокой плотности. Зафиксирована стабилизация антиоксидантного статуса птиц: показан рост активности глутатионпероксидазы на фоне снижения концентрации малонового диальдегида в сыворотке (рис. 17). Этот факт представляет значительный интерес, поскольку речь идет о фундаментальной проблеме возможности стимуляции адаптационных процессов животных, и, безусловно, требует пристального внимания.

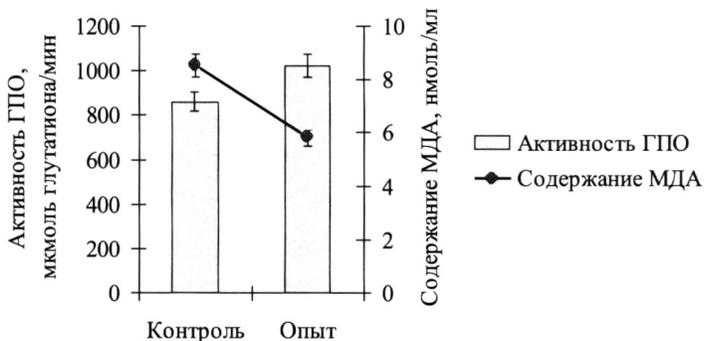


Рис. 17. Влияние кормовой добавки на основе мицелия *G. lucidum* к рациону птиц на показатели окислительного статуса сыворотки: активность глутатионпероксидазы (ГПО) и содержание малонового диальдегида (МДА) (планки погрешностей – ошибка средней, $p < 0,05$)

Изучены показатели активности глутатионпероксидазы и содержания МДА и в массе желтка (рис. 18).

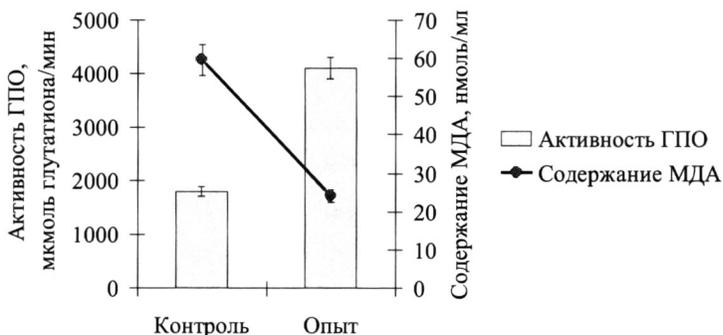


Рис. 18. Влияние кормовой добавки на основе мицелия *G. lucidum* к рациону птиц родительского стада на показатели окислительного статуса желтка: активность глутатионпероксидазы (ГПО) и содержание малонового диальдегида (МДА) (планки погрешностей – ошибка средней, $p < 0,05$)

Использование добавки на основе мицелия позволило повысить показатели яйценоскости родительского стада на 12%, способствовало повышению рентабельности производства яиц на стадии их получения и инкубации. Существенное

снижение доли выбракованных яиц обеспечило увеличение объема инкубации на 10 %. Использование добавки на основе сухого измельченного мицелия *G. lucidum* к рациону кур родительского стада способствует росту показателей вывода на 5 %. На наш взгляд, это тесно связано с процессом стимуляции антиоксидантной системы птиц, о чем свидетельствуют факты, приведенные выше. Использование предложенной добавки рекомендовано к внедрению в практику птицеводства в сфере производства яиц и получения молодняка.

ВЫВОДЫ

1. Таксономическая и экологическая структура ксилотрофных базидиомицетов лесных экосистем лесостепи Правобережного Поволжья характеризуется высоким разнообразием. Описанные в районе исследований 249 видов различаются широтой трофической специализации, трофическими стратегиями использования субстрата и типами вызываемых гнилей древесины; 215 штаммов 44 видов, составляющие репрезентативную выборку, вошли в созданную коллекцию мицелиальных культур.

2. В составе ксилотрофной микобиоты района исследований превалирует группировка с факультативно-паразитической трофической специализацией. Широкое распространение получили виды, вызывающие развитие белой коррозийной гнили древесины. В соответствии с особенностями структуры лесных экосистем (участие коренных пород – дуба и сосны в составе древостоев) в структуре ксилотрофной микобиоты преобладает группировка поливалентных стенотрофов.

3. Установлена зависимость между широтой субстратной специализации вида в отношении природного древесного субстрата и степенью его внутривидового полиморфизма в культуре. Эвритрофные виды характеризуются более высокой степенью штаммового разнообразия, что проявляется в достоверных отличиях макро – и микроморфологических характеристик мицелия, в формировании различного типа анаморф, на фоне относительного однообразия этих показателей у штаммов стенотрофных видов.

4. Изученные виды различаются зонами оптимума и пределами толерантности по отношению к содержанию растворенного кислорода при развитии в глубинных условиях: повышенную потребность в кислороде имеют виды, формирующие *in situ* однолетние плодовые тела.

5. Особенности морфогенеза структур мицелия при погруженном культивировании у представителей *Hymenochaetales* и *Polyporales* связаны с типом

гифальной системы: для видов с мономитической гифальной системой в целом выявлена тенденция к филламентному, а для характеризующихся ди- и тримитической – к пеллетному росту. Дифференцировка мицелия внутри пеллеты отмечена у видов с тримитической гифальной системой, тогда как для видов с димитической характерно формирование рыхлых однородных структур, в связи с чем, последнюю группу можно рассматривать как переходную в отношении особенностей глубинного роста.

6. Использование в качестве адаптогенных добавок к питательным средам парааминобензойной кислоты в концентрации 0,005 г/л и 9-фенил-симметричного-октагидроселеноксанта в концентрации 10^{-6} г/л (в пересчете на селен) оптимизирует развитие, что имеет особое значение при культивировании редких и охраняемых видов. Органические (9-фенил-симметричный-октагидроселеноксантен) и неорганические соединения селена (селенат натрия) при добавлении к питательной среде в концентрациях 10^{-4} г/л (в пересчете на селен) позволяют увеличить сроки хранения мицелиальных культур при температуре 4°C до 18–24 месяцев. Жизнеспособность, ростовые, биохимические характеристики (скорость и характер роста, базофилия протоплазмы, ферментативная активность, способность к образованию базидиомы) сохраняются на достаточном уровне.

7. Определены диапазоны и механизмы толерантности видов *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus ostreatus* к воздействию полиенового макролида нистатина. У толерантных к нистатину штаммов *G. lucidum* установлена интенсификация синтеза эргостерина; толерантность *P. ostreatus* определяется как интенсификацией, так и альтернативным путем – пассивацией синтеза эргостерина у разных штаммов. У всех нистатинтолерантных штаммов, характеризующихся интенсификацией продукции эргостерина, установлены выраженные способности к плодоношению на стерильных средах.

8. Быстрорастущие на агаризованных питательных средах штаммы грибов белой гнили, в среднем характеризуются более высокой общей пероксидазной, а медленно растущие – более выраженной общей оксидазной активностью.

9. Лигноцеллюлозный субстрат, обогащенный метоксильными группами, ингибирует оксидазную активность видов с паразитной специализацией в природе и стимулирует таковую у большинства сапротрофных видов; он повышает пероксидазную и целлюлазную активность у видов, вызывающих белую гниль. Метоксильные группы лигнина стимулируют процесс биосинтеза эргостерина культурами грибов белой гнили и плодообразования у грибов этой группы в

условиях чистой культуры. Есть все основания рекомендовать включение метанолизных лигноцеллюлозных материалов в субстрат для получения плодовых тел *G. lucidum* по интенсивной технологии.

10. Кормовая добавка, созданная на основе мицелия *G. lucidum*, вносимая в количестве 0,1% от массы сухого рациона, интенсифицирует пластический обмен сельскохозяйственных птиц родительского стада: в сыворотке крови обнаружено увеличение содержания альбумина на 15%, триглицеридов – на 9%. Отмечен рост уровня холестерина на 12%, за счет фракции липопротеидов высокой плотности. Установлена стимуляция антиоксидантной системы птиц: в сыворотке крови на 19%, а в желтке – в 2,3 раза возрастает активность фермента глутатионпероксидазы; снижается содержание малонового диальдегида соответственно на 32% и в 2,5 раза. Применение добавки к рационам на основе мицелия *G. lucidum* обеспечивает увеличение показателей яйценоскости на 12%, объема инкубации на 10% и показателей вывода на 5%.

ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендуемых перечнем ВАК РФ

Блинохватов А.Ф., Денисова (Ильина) Г.В., Иванов А.И., Ильин Д.Ю. Влияние соединений селена на рост и развитие грибов I. Микромицеты // Микология и фитопатология. 2000. Т. 34, Вып. 5. С.42–45.

Блинохватов А.Ф., Денисова (Ильина) Г.В., Иванов А.И., Ильин Д.Ю. Влияние соединений селена на рост и развитие грибов II. Макромицеты // Микология и фитопатология. 2000. Т. 34, Вып. 5. С.46–50.

Сашенкова С.А., Ильина Г.В., Козырева Н.С., Иванов А.И. Рост и морфологические особенности мицелия чистых культур трутовика серно - желтого *Laetiporus sulphureus* в зависимости от условий культивирования // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, Вып. 1. С.35–40.

Иванов А.И., Блинохватов А.Ф., Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Костычев А.А., Озерова Н.С. Биоабсорбция микроэлементов и их влияние на ростовые и метаболические свойства грибов // Нива Поволжья. 2007. №3 (4). С. 7–10.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Лыков Ю.С. Роль специфика лигнинсодержащих субстратов при культивировании ксилотрофных грибов *in vitro* // Микология и фитопатология. 2009. Т. 42, Вып. 2. С.35–40.

Гарибова Л.В., Ильина Г.В. Региональные коллекции мицелиальных культур как возможность сохранения природного разнообразия базидиомицетов, а также

их физиолого-биохимических особенностей // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. №1. С.38–39.

Ильина Г.В., Лыков Ю.С., Костычев А.А. Изучение антимикробной активности местных штаммов *Laetiporus sulphureus* Bond. et Sing. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. №2. С. 178–179.

Ильина Г.В., Гарибова Л.В. Использование нистатина при скрининге штаммов базидиомицетов, способных к синтезу стероидов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. №1. С. 251.

Ильина Г.В., Лыков Ю.С. Особенности развития мицелиальных культур паразитных видов базидиальных макромицетов *ex situ* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. №1. С. 115.

Иванов А.И., Ильина Г.В., Скобанев А.В., Скобанев Ар.В. Эколого-биологическая характеристика видов рода *Trametes* в условиях Пензенской области // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44, Вып. 3. С. 197–204.

Ильина Г.В., Лыков Ю.С. Особенности распространенных в лесостепи Правобережного Поволжья видов ксилотрофных базидиомицетов в природе и чистой культуре // Поволжский экологический журнал. 2010. № 4. С. 263-273.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Гарибова Л.В. Влияние нистатина на биосинтез эргостерина базидиомицетами // Микология и фитопатология. Т. 48 (1). 2011. С. 112–118.

Монографии

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Блинохватов А.Ф. Селен в грибах и микроорганизмах // Селен в биосфере. Пенза, 2001. - С. 56–95.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Скобанев А.В. Коллекция культур базидиальных макромицетов (*Basidiomycota*) Пензенской ГСХА. Каталог видов и штаммов. Пенза: РИО ПГСХА. 2009. 70 с.

Авторские свидетельства, патенты

Денисова (Ильина) Г.В., Блинохватов А.Ф., Иванов А.И. Способ стимулирования роста посевного мицелия шампиньона // Патент на изобретение № 213641. М., 1999. 4 с.

Ильин Д.Ю., Блинохватов А.Ф., Денисова (Ильина) Г.В., Иванов А.И., Тыщенко А.Ф., Сергеева Н.В., Михалева Т.В., Полунина Е.Е. Способ интенсификации биосинтеза гелиомицина // Патент на изобретение №2157848. М., 2000. 12 с.

Ильин Д.Ю., Блинохватов А.Ф., Ильина Г.В., Иванов А.И. Способ хранения культур микроорганизмов // Патент на изобретение №2185435. М., 2002. 14 с.

Статьи, тезисы в сборниках трудов научных конференций,
симпозиумов, форумов

Денисова (Ильина) Г.В., Иванов А.И., Блинохватов А.Ф. Влияние неорганического соединения селена на рост и плодоношение грибов // Труды научной конференции профессорско–преподавательского состава и специалистов сельского хозяйства: сб. науч. тр. Пенза, 1997. С. 84–85.

Денисова (Ильина) Г.В., Блинохватов А.Ф., Иванов А.И., Сашенкова С.А. Влияние соединений селена на скорость роста мицелия базидиальных грибов различных таксономических групп // Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных соединений и пищевых продуктов: сб. науч. тр. Донецк, 1997. С. 102–103.

Денисова (Ильина) Г.В., Сашенкова С.А. Влияние витамина В₁ (тиамина) и ультрамикрорезиента селена на рост мицелия гастеромицетов в культуре // Проблемы охраны и рационального использования природных экосистем и биологических ресурсов: сб. науч. тр. Пенза, 1998. С. 251–252.

Иванов А.И., Денисова (Ильина) Г.В., Иванова В.А., Сашенкова С.А., Москалец П.В. Влияние различных концентраций солей и микроэлементов на напочвенные макромицеты // Проблемы ботаники на рубеже XX–XXI веков: сб. науч. тр. С-Пб., 1998. С. 23–24.

Денисова (Ильина) Г.В. Влияние соединения селена на сроки образования плодовых тел у базидиальных макромицетов различных таксономических групп // Современные проблемы науки в АПК: сб. науч. тр. Пенза, 1999. С. 15–17.

Денисова (Ильина) Г.В. Влияние соединений селена на степень накопления биомассы мицелия грибов // Материалы конференции, посвященной 60-летию ПГПУ: сб. науч. тр. Пенза, 1999. С. 30–33.

Денисова (Ильина) Г.В., Блинохватов А.Ф., Ильин Д.Ю. Универсальная роль элемента селена в объектах биосферы // Эколого-экономические проблемы лесостепных регионов: сб. науч. тр. Пенза, 2000. С. 8–13.

Блинохватов А.Ф., Денисова (Ильина) Г.В., Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Вихрева В.А., Хрянин В.Н. Значение элемента селена для объектов биосферы // Эколого-экономическое развитие России (анализ и перспективы): сб. науч. тр. М., 2000. С. 145–152.

Blinochwatow A., Iwanow A., Chrjanin W., Ilyina G., Wicrjewa W. Die Bedeutung des Selen Für die Biosphäre // Forschungs – Fforum. №14. Jahre Fachhochschule, Neubrandenburg, Dezember 2001. S. 8–9.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Блинохватов А.Ф. Использование элемента селена как фактора замедления процессов старения мицелиальных культур // Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы: сб. науч. тр. Пенза, 2001. С. 112–114.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Опыт использования соединений селена при производственном культивировании некоторых съедобных грибов // Физиология и биохимия культивируемых грибов: сб. науч. тр. Саратов, 2002. С. 20–21.

Сашенкова С.А., Ильина Г.В. Некоторые особенности физиологии питания гастероидных базидиомицетов в культуре // Физиология и биохимия культивируемых грибов: сб. науч. тр. Саратов, 2002. С. 16–17.

Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Иванов А.И., Блинохватов А.Ф. Особенности онтогенеза ряда микромицетов – продуцентов антибиотиков на глубинных средах, содержащих соединения селена // Современная микология в России: сб. науч. тр. М., 2002. С. 297.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Блинохватов А.Ф. О роли базидиальных макромицетов в трансформации селена в экосистемах // Современная микология в России: сб. науч. тр. М., 2002. С. 297–298.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А., Иванов А.И., Блинохватов А.Ф. Биоабсорбция микроэлементов гастероидными базидиомицетами в природных экосистемах и в эксперименте // Современная микология в России: сб. науч. тр. М., 2002. С. 79.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Стимуляция развития мицелия и плодоношения при экстенсивном методе культивирования грибов рода вешенка (*Pleurotus*) селенатом натрия // Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства: сб. науч. тр. Пенза, 2002. С. 155–156.

Ильин Д.Ю., Ильина Г.В. Использование элемента селена при длительном хранении культур микроорганизмов // Охрана растительного и животного мира Поволжья и сопредельных территорий: сб. науч. тр. Пенза, 2003. С. 114–115.

Иванов А.И., Ильина Г.В., Сашенкова С.А., Озерова Н.А. Эколого – биологические особенности трутовика серно – желтого (*Laetiporus sulphureus* (Bull. Fr.) Murrill) на основе изучения его мицелиальных культур // Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах: сб. науч. тр. Минск, 2004. С. 220–222.

Ильина Г.В. Возможность использования соединения селена как адаптогена в практике работы с культурами базидиальных макромицетов // Материалы VIII Молодежной конференции ботаников в Санкт – Петербурге: сб. науч. тр. С.-Пб., 2004. С. 66.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Биоабсорбция микроэлементов базидиальными макромицетами в условиях нарушенных антропогенных ландшафтов // Экологические проблемы наследия холодной войны и пути их преодоления: сб. науч. тр. Пенза, 2004. С. 72.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Возможность использования культивируемых макромицетов для оптимизации иммунного статуса организма // Экологические проблемы наследия холодной войны и пути их преодоления: сб. науч. тр. Пенза, 2004. С. 73–74.

Ильина Г.В. Изучение и практический смысл использования накопительного потенциала макромицетов как биоаккумуляторов селена // Экология человека: концепция факторов риска, экологической безопасности и управления рисками: сб. науч. тр. Пенза, 2004. С. 141–144.

Ильина Г.В. Некоторые аспекты культивирования агарикоидных макромицетов в целях утилизации отходов сельскохозяйственного производства // Материалы Юбилейной конференции кафедры селекции и семеноводства ПГСХА: сб. науч. тр. Пенза, 2004. С. 88–92.

Ильина Г.В. Особенности культивирования мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst на естественных субстратах // Роль науки в развитии АПК: сб. науч. тр. Пенза, 2005. С. 56–58.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Лещенко П.П., Ариповский А.В. Исследование жирнокислотного состава базидиомы *Fistulina hepatica* Pers. // Роль науки в развитии АПК: сб. науч. тр. Пенза, 2005. С. 95–97.

Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Лещенко П.П., Ариповский А.В. Исследование жирнокислотного состава базидиом *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst и *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. // Роль науки в развитии АПК: сб. науч. тр. Пенза, 2005. С. 97–98.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Использование базидиальных макромицетов для рециклизации отходов сельскохозяйственного производства // Животноводни науки, Volum XLII №5. София, 2005. С. 264–268.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Влияние различных микроэлементов на степень накопления биомассы мицелия ксилотрофных базидиомицетов, перспективных в биотехнологии // Образование, наука, медицина: эколого-экономический аспект: сб. науч. тр. Пенза, 2006. С. 29.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Культурально – морфологические свойства штамма трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* // Роль науки в развитии АПК сб. науч. тр. Пенза, 2005. С. 118–120.

Ильина Г.В. Возможности стимуляции образования зачатков плодовых тел макромицетов на стерильных субстратах // Роль почв в сохранении устойчивости ландшафтов и ресурсосберегающее земледелие: сб. науч. тр. Пенза, 2005. С. 304–305.

Ильина Г.В., Сашенкова С.А. Влияние различных микроэлементов на степень накопления биомассы мицелия ксилотрофным базидиомицетом *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst, перспективным в биотехнологии // Наука и образование – сельскому хозяйству : сб. науч. тр. Пенза, 2006. С. 51.

Ильина Г.В. Динамика и показатели роста мицелия штаммов трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst) в глубинной культуре // Мониторинг природных экосистем в зонах защитных мероприятий объектов по уничтожению химического оружия: сб. науч. тр. Пенза, 2007. С. 71–73.

Ильина Г.В. Интенсивность накопления мицелиальной биомассы ксилотрофных базидиомицетов в глубинной культуре в зависимости от параметров культивирования // Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества: сб. науч. тр. М., 2008. С.188–189.

Ильина Г.В., Лыков Ю.С. Особенности роста штаммов ксилотрофных базидиомицетов на плотных питательных средах различного состава // Современная микология в России: сб. науч. тр. М., 2008. С. 129.

Скобанев А.В., Ильина Г.В. Эколого-трофические особенности распространенных в Пензенской области видов лигнинразрушающих базидиомицетов в природе и искусственной культуре // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: сб. науч. тр. Пенза, 2008. С. 399–400.

Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Лыков Ю.С., Костычев А.А. Значение состава и способа подготовки субстрата для развития мицелиальных культур грибов – ксилотрофов при твердофазном культивировании // Образование, наука, практика: инновационный аспект: сб. науч. тр. Пенза, 2008. С. 59.

Иванов А.И., Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Скобанев А.В., Костычев А.А. Изучение биоаккумуляции химических элементов грибами как актуальное направление микологических исследований // Образование, наука, практика: инновационный аспект: сб. науч. тр. Пенза, 2008. С. 33–38.

Ильина Г.В. Изучение и практический смысл использования накопительного потенциала макромицетов как биоаккумуляторов селена // Образование, наука, практика: инновационный аспект: сб. науч. тр. Пенза, 2008. С. 33–34.

Ильина Г.В. Значение парааминобензойной кислоты как ростового фактора при культивировании грибов на лигноцеллюлозных субстратах // Роль почвы в сохранении устойчивости агроландшафтов: сб. науч. тр. Пенза, 2008. С. 245–247.

Ильина Г.В., Гарибова Л.В., Ильин Д.Ю. Роль изучения штаммового полиморфизма в раскрытии природного потенциала ксилотрофных базидиомицетов // Материалы V Международной конференции «Изучение грибов в биоценозах»: сб. науч. тр. Пермь, 2009. С. 97–101.

Ильина Г.В. Биотехнологический потенциал ксилотрофных базидиомицетов: возможности и перспективы // Достижения и перспективы развития биотехнологии: сб. науч. тр. Пенза, 2010. С. 43–47.

Ильина Г.В. Роль коллекции мицелиальных культур в изучении естественных ресурсов ксилотрофных базидиомицетов // Достижения и перспективы развития биотехнологии: сб. науч. тр. Пенза, 2010. С. 47–51.

Ильина Галина Викторовна

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Подписано в печать 29.06.2011.
Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать офсетная. Печ. л. 3.0. Тираж 150 экз. Заказ 136 Т

Типография Саратовского университета.
410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112.
Тел.: (8452) 27-33-85

102