

16. Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Al-Ani L. K. T. et al. Outline of *Fungi* and fungi-like taxa // Mycosphere. 2020. 11(1). P. 1060–1456.
17. Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Lumbsch H. T., Liu J. K., Maharachchikumbura S. S. N., Ekanayaka A. H., Tian Q., Phookamsak R. Outline of Ascomycota – 2017 // Fungal Diversity. 2018. Vol. 88. P. 167–263.
18. Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Rajeshkumar K. C. et al. Notes for genera: Ascomycota // Fungal Diversity. 2017. Vol. 86. P. 1–594.
19. Wijayawardene N. N., Crous P. W., Kirk P. M., Hawksworth D. L. et al. Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names // Fungal Diversity. 2014. Vol. 69. P. 1–55.

УДК 57.083.131:582.282.163

DOI: 10.5281/zenodo.4481801

Ю. І. Литвиненко

ORCID ID 0000-0001-9095-0437

lytvynenko2014@gmail.com

Т. А. Круподьорова

ORCID ID 0000-0002-4665-9893

krupodorova@gmail.com

Д. А. Романова

ORCID ID 0000-0002-0936-5685

dariaromanova0007@gmail.com

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА *IODOPHANUS CARNEUS* (PERS.) KORF НА АГАРИЗОВАНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Литвиненко Ю. І.¹, Круподорова Т. А.², Романова Д. А.¹ Культурально-морфологічна характеристика *Iodophanus carneus* (Pers.) Korf на агаризованих живильних середовищах. – Природничі науки. – 2020. – 17: 34–41.

¹Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка

²ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

Вперше в Україні було одержані чисті культури копрофільного аскоміцета *Iodophanus carneus*, штам Icar 02 та досліджено його ріст та культуральні особливості. З'ясована можливість росту гриба на агаризованих живильних середовищах різного складу. Показники середньою швидкістю росту варіювали від 7,5 до 8,2 мм/добу в залежності від складу середовища. Встановлено, що найкращим для культивування *I. carneus* та підтримки його росту в культурі є агаризоване глюкозо-пептон-дріжджове середовище. Виявлено певний вплив досліджених середовищ на морфологічні особливості росту колоній гриба.

Ключові слова: копрофільні аскоміцети, Pezizales, агаризовані живильні середовища, морфологія, радіальний ріст.

Lytvynenko Yu. I.¹, Krupodorova T. A.², Romanova D. A.¹ Morphological characteristic of *Iodophanus carneus* (Pers.) Korf pure cultures on agar nutritional media. – Prirodniči nauki. – 2020. – 17: 34–41.

¹Sumy State Pedagogical University named after A. S. Makarenko

²Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine

For the first time in Ukraine, pure cultures of coprophilous ascomycete *Iodophanus carneus* (strain Icar 02) were obtained, its growth and cultural characteristics were studied. The possibility of

fungal growth on various agar media was investigated. The growth rate varied from 7.5 to 8.2 mm/day, depending on the composition of the nutrient medium. Agar glucose-peptone-yeast medium was the best for growing *I. carneus* and maintaining its growth in culture. An influence of the studied media on the morphological characteristics of the fungal colonies was revealed.

Key words: coprophilous ascomycetes, Pezizales, agar nutritional media, morphological features, growth rate.

Вступ. Копрофільні аскоміцети як об'єкти наукових досліджень мають сьогодні не лише теоретичний, а і прикладний аспект. Багато таких видів грибів використовуються у генетичних, біохімічних, цитологічних дослідженнях, вивчаються як біосинтетики різних ферментів, речовин з бактерицидною та антимікотичними активностями [10, 13, 15–17, 19, 22, 24]. Для успішного проведення фундаментальних та прикладних досліджень культур грибів одним з першочергових етапів є одержання високопродуктивних штамів, їх можливість росту та підтримка на агаризованих середовищах, встановлення їх культуральних і морфологічних характеристик, що мають таксономічне значення.

Iodophanus carneus (Pers.) Korf є одним із найпоширеніших в Україні копрофільних дискоміцетів. Це досить мінливий вид, на морфологічні ознаки якого (розмір і колір аском, орнаментацию епіспорію, розмір і форму аскоспор) значний вплив мають фактори навколишнього середовища [12]. Морфологічно *I. carneus* подібний до інших видів роду з дрібно орнаментованими аскоспорами: *I. testaceus* (Moug.) Korf. та *I. verrucosporus* (P. W. Graff) Kimbr., Luck-Allen & Cain. Ці види у ряді систематичних робіт розглядаються як самостійні таксони [7, 14, 23]. Щоправда, ідентифікаційні ознаки, які наводяться в ключах для визначення видів *Iodophanus* Korf, часто є нечіткими для розділення названих видів. Так, у *I. carneus* та *I. testaceus* розмірні параметри та морфологія мікроструктур можуть перекриватися, колір аском варіювати [9, 12]. Субстратна приуроченість (зокрема, до посліду тварин – у *I. carneus* та інших органічних субстратів – у *I. testaceus*) [14] також не є надійним таксономічним критерієм [12, 21]. Так, окрім екскрементів, *I. carneus* був описаний на рослинних рештках, вологому ґрунті, старих тканинах та кострищах [8, 12]. Деякі автори розглядають *I. testaceus* як синонім *I. carneus* [11, 21]. Широка концепція останнього виду детально обговорюється та описується Ф. Довері [12]. І. Е. Сінто зі співавторами [9] також вважають, що *I. testaceus* слід трактувати як синонім *I. carneus*. Результати досліджень цих авторів, засновані на морфологічних характеристиках та ферментному аналізі чистих культур видів *Iodophanus*, підтвердили подібність між *I. carneus* та *I. testaceus*.

Таким чином, дослідження по розробці додаткових критеріїв таксономічної оцінки видів грибів набувають сьогодні особливого значення. Серед них важливе місце посідають культурально-морфологічні ознаки

(особливості) міцеліальних колоній, все ширше використання яких у систематиці обумовлено тим, що вони легко спостерігаються та просто реєструються. Між тим, ідентифікація, проведена на основі культуральних характеристик, має ряд обмежень та складнощів [2, 6], у зв'язку з чим часто застосовується як додатковий таксономічний критерій.

Метою дослідження було виділити в культуру *Iodophanus carneus* та вивчити його ростові особливості та морфологію на агаризованих живильних середовищах різного складу.

Матеріали та методи досліджень. *Iodophanus carneus* (Pers.) Korf одержано зі свіжих аском, пророщених на копрі методом вологих камер [18]. Виділення чистих культур з природного матеріалу проводили згідно загально-прийнятих методик [4]. Дозрілі асками (рис. 1), очищені від залишків копрі та оброблені етиловим спиртом, переносили над полум'ям спиртової горілки на чашки Петрі з модифікованим картопляно-глюкозним агаром (рН 7.6).

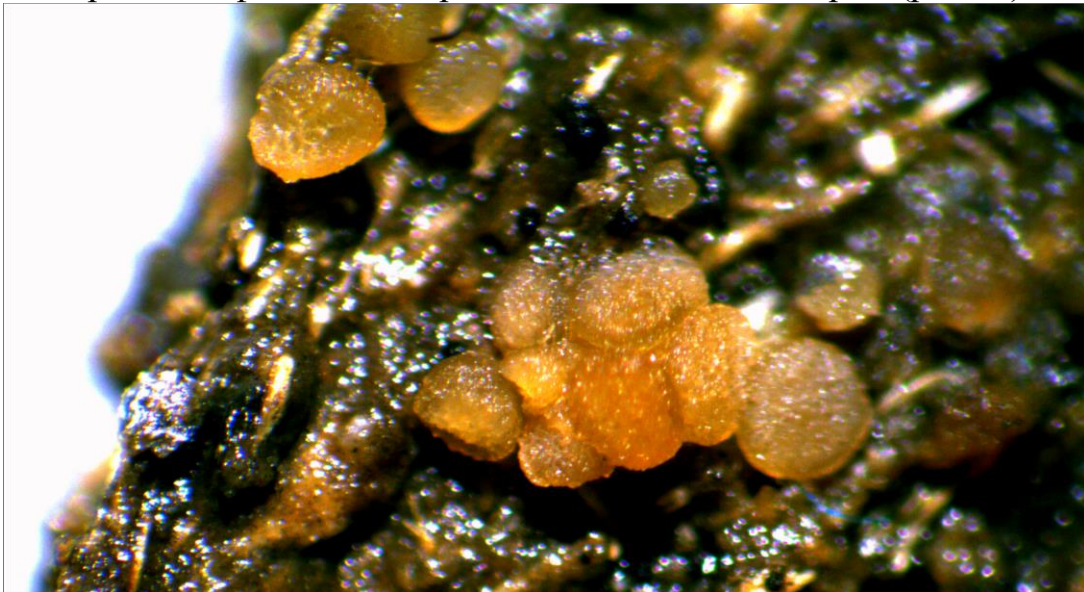


Рис. 1. Аски *Iodophanus carneus* на копрах корови

Дослідження росту, морфології та культуральних ознак виділеного штамму *Iodophanus carneus* проводили на чотирьох агаризованих середовищах наступного складу (г/л):

- модифікований картопляно-глюкозний агар (КГА) (рН 6,5-6,6): картопля – 200; глюкоза – 20; агар – 20; дріжджовий екстракт – 2;
- кукурудзяний агар (КА) (рН 7,2-7,3): кукурудзяна мука – 20; пептон – 20; глюкоза – 20; агар – 20;
- глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА) (рН 6,6): глюкоза – 25, пептон – 3, дріжджовий екстракт – 2, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,25.
- глюкозний агар Сабуро (рН 5,7-5,8): пептон – 10; глюкоза – 40; агар – 20.

Під час характеристики колоній зверталась увага на такі морфологічні ознаки: щільність і колір колонії, рельєф її поверхні і морфологія краю, відмічались поява та колір реверзumu та ексудату. Визначався тип колонії згідно класифікації Дж. А. Сталперса [20].

Повторність дослідів п'ятикратна, результати експериментів оброблено методами математичної статистики з використанням статистичних функцій Excel з використанням програмного забезпечення Microsoft Office XP, Програма 11.5 Version (SPSS, Inc., 2002). Значення представлені у вигляді середніх значень $\pm$ стандартна помилка середнього (SEM). Відмінності при $P \leq 0,05$ вважалися значущими.

Результати досліджень та обговорення.

Вперше в Україні було одержані чисті культури копрофільного аскоміцета *Iodophanus carneus*. У штаму Icar 02 досліджено морфологічні особливості на різних агаризованих середовищах та встановлена певна залежність морфології колоній від обраних живильних середовищ (рис. 2). Так, на середовищі із КА утворювались шерстисті міцеліальні колонії, по краю щільні, з пухким низьким повітряним міцелієм, у центрі навколо інокулюму – середньої щільності з короткими притиснутими гіфами. Колонії спочатку світло-помаранчеві, мають яскраво виражену тенденцію до зміни яскравості кольору: на 7 добу стають яскраво-помаранчевими, з віком – темно-помаранчевими. Край колонії рівний, притиснутий, заходить на край чашки. Поверхня колонії гладка, з часом – зморшкувата. Реверзум не змінений. Ексудат відсутній.

На середовищі із КГА спостерігали формування повстистих міцеліальних колоній, по краю щільні, з короткими сплутаними повітряними гіфами, у центрі навколо інокулюму – середньої щільності з короткими притиснутими гіфами. Колонії спочатку блідо-помаранчеві, мають яскраво виражену тенденцію до зміни яскравості кольору: на 7 добу стають яскраво-помаранчевими, з віком – темно-помаранчевими. Ростучі колонії мають хвилястий притиснутий край, який біля краю чашки вирівнюється, частково заходить на край чашки. Поверхня колонії гладка, на 6 добу – зморшкувата. Реверзум не змінений. Невелика кількість ексудату з'являється на 6 добу лише на повстистій частині колонії.

На середовищі із ГПДА міцеліальні колонії павутинисті, розріджені, прозорі, з низьким притиснутим повітряним міцелієм. Колонії спочатку світло-помаранчеві із вираженими темно-помаранчевими концентричними колами навколо інокулюму, з часом колір стає більш темнішим. Край колонії рівний, притиснутий, заходить на край чашки. Поверхня колонії гладка. Реверзум не змінений. Ексудат відсутній.

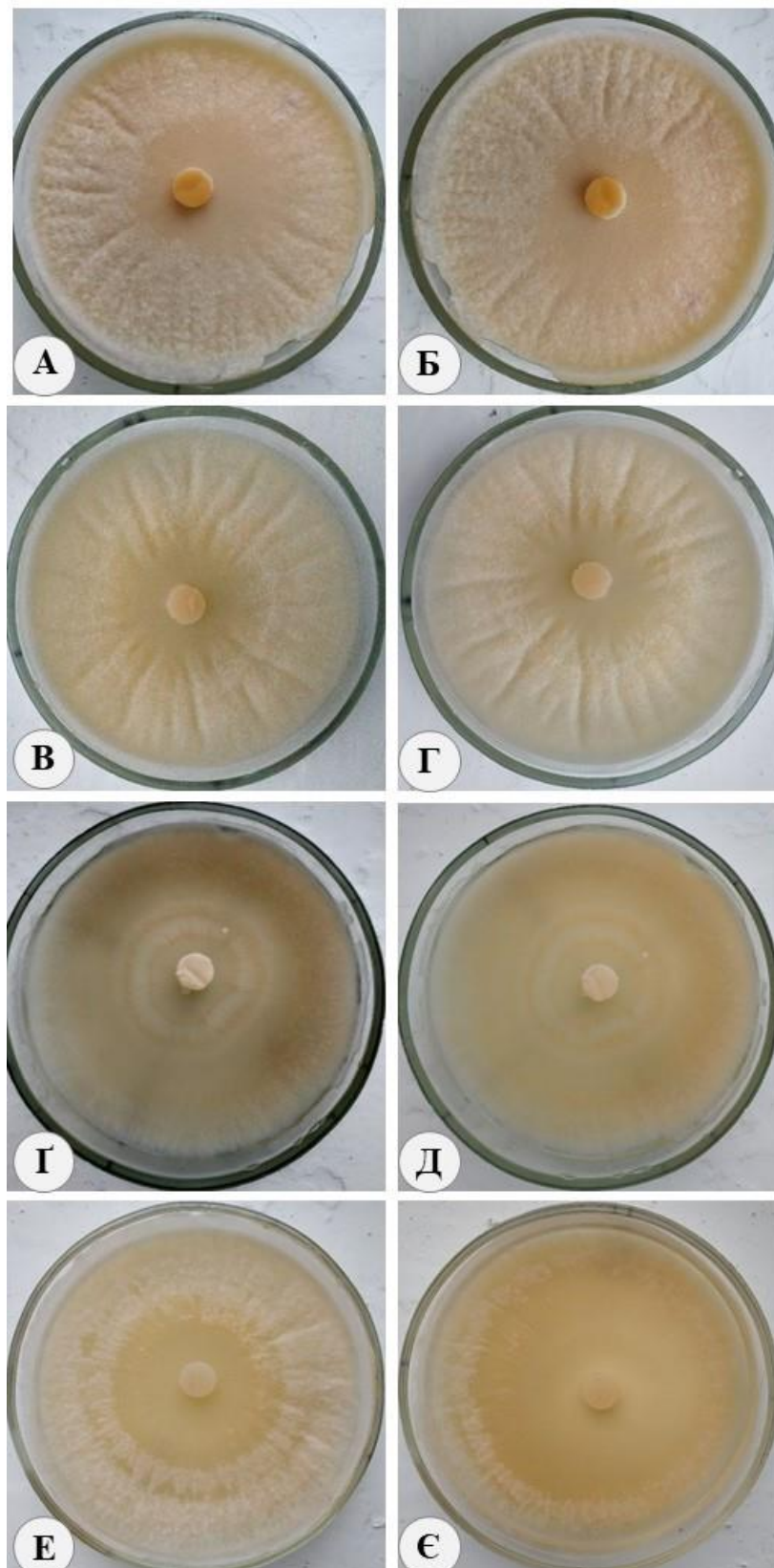


Рис. 2. Морфології колоній *Iodophanus carneus* на різних культуральних середовищах: А, Б – на кукурудзяному агарі; В, Г – на модифікованому картопляно-глюкозному агарі; Г, Д – на глюкозо-пептон-дріжджовому агарі; Е, Є – на глюкозному агарі Сабуро.

На середовищі Сабуро спостерігали варіабельність двох типів колоній: шкірясті з низьким зчепленим притиснутим міцелієм та тенденцією до появи повстистого пухкого повітряного міцелію лише по периферії колонії; шкірясто-повстисті, у центрі з низьким притиснутим міцелієм, по краю – з короткими сплутаними повітряними гіфами. Колонії спочатку блідо-помаранчеві, на 6 добу – помаранчеві зі світлішим краєм персикового кольору. Край колонії рівний, притиснутий, заходить на край чашки. Поверхня колонії гладка, з часом слабко-зморшкувата по краю або по всій поверхні. Реверзум не змінений. Ексудат відсутній або з'являється на 6 добу по краю колонії.

Таким чином, середовища КА та КГА сприяли утворенню найбільш щільних колоній з добре вираженим повітряним міцелієм. На середовищі із ГПДА формувались розріджені павутинисті колонії із слабкорозвиненим повітряним міцелієм. Найбільша варіабельність морфології поверхні колоній спостерігалась на середовищі Сабуро, де відмічені колонії двох типів: шкірясті, із слабко вираженим повітряним міцелієм, та шкірясто-повстисті із розвиненими повітряними гіфами. На всіх досліджених середовищах колонії Ісаг 01 мають притиснутий край, який заходить на край чашки. Край колоній рівний на більшості живильних середовищ. Лише на середовищі із КГА у ростучих колоній спостерігався нерівний хвилястий край, який біля краю чашки вирівнювався. На більшості живильних середовищах на всій поверхні колоній або лише по краю колонії спостерігалась поява зморшок. Лише на середовищі із ГПДА спостерігались колонії із гладкою поверхнею, які були відмічені для всіх повторностей. На всіх досліджених середовищах колонії Ісаг 02 не змінюють колір реверзума. Поява ексудату була відмічена на 6 добу в усіх повторностях на середовищі із КГА та в окремих повторностях на середовищі Сабуро.

В цілому, найбільш варіабельними ознаками морфології колоній дослідженого штаму Ісаг02, в залежності від середовища, є тип, щільність, поверхня колонії, наявність/відсутність ексудату, більш менш сталими – край і колір колонії, зміна кольору реверзума.

Однією з важливіших біотехнологічних характеристик будь-якої культури є швидкість її росту. З'ясована можливість росту гриба на всіх досліджених агаризованих живильних середовищах різного складу. В залежності від середовища середня швидкістю росту відрізнялась не істотно і варіювала від 7,5 до 8,2 мм/добу (рис. 3), що може бути обумовлено наявністю у складі всіх середовищ глюкози. Проте, найкращим для культивування *I. carneus* та його підтримки у культурі виявлено агаризоване глюкозо-пептон-дріжджове середовище. За результатами визначення радіальної швидкості росту міцелію гриба відповідно до життєвих стратегій міцеліальних грибів [3],

досліджуваний штам Icar 02 можна віднести до групи культур із середньою швидкістю росту. За показниками швидкості росту Icar02 наближається до деяких досліджених у культурі штамів *Morchella conica* Pers. та *M. esculenta* (L.) Pers., які також належать до порядку Pezizales [5].

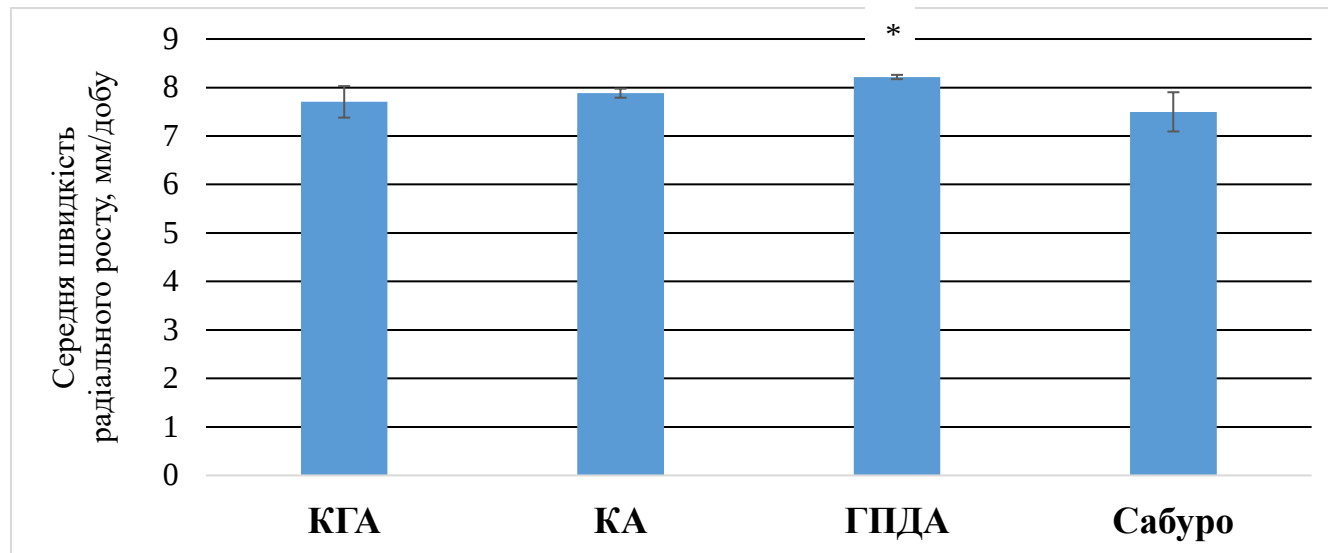


Рис. 3. Швидкість радіального росту колоній Icar02 на агаризованих живильних середовищах різного складу: модифікований картопляно-глюкозний агар (КГА), кукурудзяний агар (КА), глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), глюкозний агар Сабуро (Сабуро).

Висновки. За результатами проведених досліджень, вперше в Україні було одержані чисті культури копрофільного аскоміцета *Iodophanus carneus*, штам Icar 02. З'ясована можливість росту гриба на агаризованих живильних середовищах різного складу із середньою швидкістю росту у межах 7,5–8,2 мм/добу. Встановлено, що найкращим для культивування *I. carneus* та його підтримки у культурі є агаризоване глюкозо-пептон-дріжджове середовище. Виявлено певний вплив досліджених середовищ на культурально-морфологічні особливості росту гриба. Найбільш варіабельними ознаками морфології колоній Icar02, в залежності від середовища, є тип, щільність, поверхня колонії, наявність чи відсутність ексудату, більш менш сталими – край і колір колонії, зміна кольору реверзума. В цілому, встановлено домінування шкірясто-повстистого типу міцеліальних колоній блідо-помаранчевого кольору з рівним притиснутим краєм, відсутністю ексудату та зміни кольору реверзума.

Список використаних джерел

1. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. К.: Наук. думка, 1973. 243 с.
2. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сб. научн. трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред С. П. Вассера. К.: Альтерпрес, 2011. 212 с.
3. Великанов Л. Л. Сидорова И. И. Некоторые биохимические аспекты в экологии грибов // Усп. микробиол. 1983. № 18. С. 112–132.
4. Дудка И. А. Вассер С. П., Элланская И. А. Методы экспериментальной микологии. К.: Наук. думка, 1982. 550 с.
5. Михайлова О. Б., Бухало А. С. Культурально-морфологічні особливості представників *Morchellaceae* (Ascomycetes) на агаризованих живильних середовищах // Укр. ботан. журн. 2005. Т. 62, №4. С. 500–508.
6. Михайлова Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. Минск: Белорус. наука, 2007. 407 с.
7. Прохоров В. П. Определитель грибов России. Дискомицеты. Вып. 1. Сем. *Ascobolaceae*, *Iodophanaceae*, *Ascodesmidaceae*, *Pezizaceae*, *Pyronemateceae*, *Thelebolaceae*. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 225 с.
8. Beug M. W., Bessette A. E., Bessette A. R. Ascomycete fungi of North America. A Mushroom Reference Guide. University of Texas Press, 2014. 502 p.
9. Cinto I. E., Dokmetzian D. A., Ranalli M. E. *Iodophanus carneus* and *I. testaceus* (Ascomycota-Pezizales): Independent taxonomic identity or synonymy? A study of their morphology and isozymes // Bol. Soc. Argent. Bot. 2007. Vol. 42 (3-4). P. 181–187.
10. Denison D. A., Koehn R. D. Cellulase Activity of *Poronia Oedipus* // Mycologia. 1977. Vol. 69(3). P. 592–603.
11. Dennis R. W. G. British Ascomycetes. Addenda and Corrigenda. Vaduz: J. Cramer, 1981. 650 p.
12. Doveri F. Fungi fimicoli Italici: a guide to the recognition of basidiomycetes and ascomycetes living on faecal material. Trento: Micologica Bresadola, 2004. 1104 p.
13. Jayanetti D. R., Yue Q., Bills G. F., Gloer J. B. Hypocoprins A-C: New sesquiterpenoids from the coprophilous fungus *Hypocopra rostrata* // J. Nat. Prod. 2015. Vol. 78(3). P. 396–401.
14. Kimbrough J. W., Luck-Allen E. R., Cain R. F. *Iodophanus*, the *Pezizaceae* segregate of *Ascophanus* (Pezizales) // Amer. J. Bot. 1969. Vol. 56(10). P. 1187–1202.
15. Magnelli P., Ramos A.M., Forchiassin F. Factors influencing cellulase production *Saccobolus saccoboloides* // Mycologia. 1996. Vol. 88, № 2. P. 249–255.
16. Mudur S. V., Gloer J. B., Wicklow D. T. Sporminarins A and B: antifungal metabolites from a fungicolous isolate of *Sporormiella minimoides* // J. Antibiot. 2006. Vol. 59(8). P. 500–506.
17. Paoletti M., Saupe S. J. The genome sequence of *Podospora anserina*, a classic model fungus // Genome Biol. 2008. T. 9(5). P. 223.
18. Richardson M. J. Diversity and occurrence of coprophilous fungi // Mycol. Res. 2001. Vol. 105, №4. P. 387–402.
19. Scheckhuber C. Q., Osiewacz H. D. *Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing // Mol. Genet. Genomics. 2008. 280(5). P. 365–374.
20. Stalpers J. A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture // Studies in Mycology. 1978. № 16. 248 p.
21. Thind K. S., Waraich K. S. 1971. The *Pezizales* of India. XII // Res. Bull. Panjah Univ. (N. S.). 1971. Vol. 22. P. 109–123.
22. Wang H.-J., Gloer J. B., Scott J. A., Malloch D. Coniochaetones A and B: New antifungal benzopyranones from the coprophilous fungus *Coniochaeta saccardoi* // Tetrahedron Letters. – 1995. 36(33). P. 5847–5850.
23. Watling R., Richardson M. J. Coprophilous fungi of the Falkland Islands // Edinburgh J. Bot. 2010. Vol. 67(3). P. 399–423.
24. Zickler D., Espagne E. *Sordaria* a model system to uncover links between meiotic pairing and recombination // Semin Cell Dev Biol. 2016. Vol. 54. P. 149–157.