

ISSN 0026-3648

Том 57, Номер 3

Май - Июнь 2023



МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 3, 2023

ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

Методы длительного хранения чистых культур макромицетов

Н. С. Комиссаров, М. Ю. Дьяков, Л. В. Гарибова

155

БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА, ЭКОЛОГИЯ

Новые сведения об агарикоидных и гастероидных агарикомицетах (*Agaricomycetes*) Пензенской области (Россия)

А. И. Иванов, А. А. Ермолаева, А. А. Миронова

172

Разнообразие микроскопических грибов на древесине прибрежной зоны острова Хейса (архипелаг Земля Франца-Иосифа)

*И. Г. Панькова, И. Ю. Кирицели, В. А. Ильющин, М. С. Зеленская,
Д. Ю. Власов, М. В. Гаврило, Е. П. Баранцевич*

184

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

Идентификация микромицетов рода *Aspergillus* – контаминантов зеленого кофе на основе полифазной таксономии

Л. П. Минаева, Ю. М. Маркова, А. Д. Евсюкова, И. Б. Седова, З. А. Чалый

198

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

Сравнительный анализ метаболитов CAD-им генотипов яровой мягкой пшеницы в условиях заражения возбудителем бурой ржавчины

*А. А. Коновалов, Е. А. Орлова, Е. В. Карпова, И. К. Шундрин,
А. А. Нефедов, Н. П. Гончаров*

210

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Большаков С.Ю., Волобуев С.В., Ежов О.Н., Паломожных Е.А., Потапов К.О.
Афиллофороидные грибы европейской части России: аннотированный список видов /
Отв. ред. С.Ю. Большаков, С.В. Волобуев. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ “ЛЭТИ”, 2022. 578 с.
ISBN 978-5-7629-3121-2

И. В. Змитрович

221

ХРОНИКА

Памяти Светланы Михайловны Озерской (1953–2022)

223

Правила для авторов

225

Contents

Vol. 57, No. 3, 2023

REVIEWS AND DISCUSSIONS

Methods for long-term storage of pure cultures of macrofungi

N. S. Komissarov, M. Yu. Dyakov, L. V. Garibova 155

BIODIVERSITY, TAXONOMY, ECOLOGY

New data on agaricoid and gasteroid *Agaricomycetes* in Penza Region (Russia)

A. I. Ivanov, A. A. Ermolaeva, A. A. Mironova 172

Diversity of microfungi on wood of the coastal zone of Heiss Island
(Franz Joseph Land Archipelago)

*I. G. Pankova, I. Yu. Kirtsideli, V. A. Iliushin, M. S. Zelenskaya, D. Yu. Vlasov,
M. V. Gavrilov, E. P. Barancevich* 184

PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY, BIOTECHNOLOGY

Identification of green coffee contaminated microfungi of the genus *Aspergillus*
on the basis of polyphasic approach

L. P. Minaeva, Yu. M. Markova, A. D. Evsyukova, I. B. Sedova, Z. A. Chalyy 198

PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Comparative analysis of metabolites of CAD-im genotypes of spring bread
wheat under brown rust infection

A. A. Konovalov, E. A. Orlova, E. V. Karpova, I. K. Shundrina, A. A. Nefedov, N. P. Goncharov 210

CRITIQUE AND BIBLIOGRAPHY

Bolshakov S.Yu., Volobuev S.V., Ezhov O.N., Palomozhnykh E.A., Potapov K.O.
Aphylophoroid fungi of the European part of Russia: a checklist / Eds. S.Yu. Bolshakov,
S.V. Volobuev. Saint Petersburg: ETU Publishing house, 2022. 578 p.
ISBN 978-5-7629-3121-2

I. V. Zmitrovich 221

CHRONICLE

Ad memoriam. Svetlana Mikhailovna Ozerskaya (1953–2022) 223

Author's guide 225

УДК 582.284: 57.083.1

МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МАКРОМИЦЕТОВ

© 2023 г. Н. С. Комиссаров^{1,*}, М. Ю. Дьяков^{1,**}, Л. В. Гарибова^{1,***}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

*e-mail: macoloams@gmail.com

**e-mail: max_fungi@mail.ru

***e-mail: gariblv@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.10.2022 г.

После доработки 05.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Базидиальные макромицеты обладают значительным биотехнологическим потенциалом и являются перспективными объектами для использования в различных промышленных отраслях, таких как пищевое производство, фармацевтика, производство активных соединений и полисахаридов. Промышленное применение макромицетов подразумевает наличие крупных коллекций культур, использующих протоколы хранения, обеспечивающие сохранение жизнеспособности, репродуктивности, генетическую стабильность и способность продуцировать активные соединения. С расширением списка используемых видов целесообразным является разработка новых протоколов хранения штаммов и оптимизация имеющихся под новые, перспективные виды макромицетов. Необходимым представляется подробное изучение влияния длительных периодов хранения на морфолого-культуральные характеристики, генетическую стабильность, ферментативную активность и способность формировать половые структуры.

Ключевые слова: базидиомицеты, криопротектор, криохранение, лиофилизация, макромицеты

DOI: 10.31857/S0026364823030054, **EDN:** VCLMPC

ВВЕДЕНИЕ

Макромицеты – представители группы грибов, формирующих плодовые тела, которые можно различить невооруженным глазом, а также дать их первичное описание и приблизительную таксономическую принадлежность, не используя оптические инструменты. Это сборная группа, включающая в себя представителей отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* (Wessels, 1993; Lodge et al., 2004; Mueller et al., 2007). Изучение аспектов физиологии, биохимии и морфологии макромицетов подразумевает наличие рабочих, поддерживаемых в жизнеспособном состоянии коллекций штаммов различных видов, которые должны не только оставаться жизнеспособными после длительных периодов хранения, но и сохранять репродуктивную способность, морфолого-культуральные и биохимические свойства (скорость роста, морфология, продукция метаболитов и т.д.). Это относится не только к учебным и научным коллекциям, коллекциям на пищевых и биотехнологических производствах, но и к проектам по сохранению штаммов видов, находящихся под угрозой исчезновения. Использование макромицетов в хозяйственной деятельности представляет собой уникальный по своей структуре и сложности произ-

водственный комплекс, основой которого является поддерживаемая и регулярно обновляемая коллекция штаммов. В связи с этим необходимым представляются оценка эффективности применяемых методов хранения в сохранении жизнеспособности, физиологических и биохимических свойств штаммов, разработка новых протоколов хранения и адаптация имеющихся под новые группы видов (Smith, 1998; Nakasone et al., 2004; Singh et al., 2004a; Bisko et al., 2018; Linde et al., 2018).

СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ МАКРОМИЦЕТОВ

Плодовые тела макромицетов являются богатым источником микро- и макроэлементов, протеинов и углеводов при низком содержании жиров, с чем связано их широкое применение в пищевой промышленности (Ahlawat et al., 2016; Vetter, 2019). Плодовые тела культивируемых макромицетов богаты минеральными соединениями, в частности, калием, фосфором, железом, цинком, медью и селеном. Особенно высоко содержание витамина B₁, рибофлавина (витамин B₂), ниацина (витамин PP) и производных фолиевой кислоты, находящееся на уровне свежих овощей, яиц

и сыра (Mattila et al., 2001; Furlani, Godoy, 2008). Содержание микроэлементов в спорокарпах промышленно выращиваемых макромицетов сильно отличается, в зависимости от видовой принадлежности. Концентрация селена в плодовых телах *Pleurotus ostreatus* и *Lentinula edodes* ниже в 20 и 80 раз, соответственно, чем у *Agaricus bisporus*, при более высоком содержании Zn (Furlani, Godoy, 2008).

К наиболее распространенным видам культивируемых макромицетов, составляющим 82% от общего объема выращенных плодовых тел, относятся штаммы следующих видов: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae*, *Cyclocybe cylindracea*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* (Chang, 1999; Rai, 2004; Vetter, 2019). По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН на август 2019 г., объем мирового производства плодовых тел макромицетов составил 20.85 млн метрических тонн. Лидером в культивировании макромицетов является Китай (Rai, 2004; Atila, 2017), в 2019 г. производивший 86% от общего объема выращенных плодовых тел в мире (FAO, 2019).

Макромицеты обладают значительным потенциалом для использования в фармацевтической промышленности, производстве активных соединений, применяемых в лечебной практике. Например, плодовые тела штаммов вида *Agaricus bisporus* являются источником незаменимых, условно незаменимых и заменимых аминокислот, в частности, аргинина, используемого в ряде пищевых добавок, применяемых в рационе больных онкологическими заболеваниями (Kalač, 2012; Muszyńska et al., 2017; Jahani et al., 2018). Аминокислотный состав белков *A. bisporus* сравним с животными белками, что, предположительно, позволит снизить потребление мясных продуктов в рационе (Atila et al., 2017). Помимо высокого содержания аминокислот, плодовые тела *A. bisporus* аккумулируют галактоманнан, α -глюкан и β -глюкан, которые обладают иммуностимулирующим и противоопухолевым действием. Отмечается высокое содержание фенольных соединений, в частности, токоферольной группы (в совокупности — витамин Е), для которых показан антиоксидантный эффект. Помимо токоферолов, спорокарпы шампиньона двуспорового формируют такие соединения как галловая кислота, протокатеховая кислота, мирицетин, обладающие сильным антиоксидантным действием (Liu et al., 2013; Semwal et al., 2016; Gąsecka et al., 2018; Jiang et al., 2019). Иммуномодулирующий эффект экстрактов из плодовых тел *Ganoderma lucidum* обуславливается стимулированием Т-клеток, НК-клеток и макрофагов (Pillai et al., 2008; Sanodiya et al., 2009; Smina et al., 2016). Продуцируемые активные соединения обладают иммуномодулирующим, противоопухо-

левым, радиопротекторным, антидиабетическим и гепатопротекторным действием (Zhao et al., 2010; Ma et al., 2015; González et al., 2020; Hu et al., 2020). Полисахариды *G. lucidum* обладают противораковым действием, сдерживая развитие саркомы 180 (Wasser, Weis, 1999; Liu et al., 2002). Спектр аккумулируемых тритерпеноидных соединений показал цитотоксичность по отношению к раковым клеткам, сдерживая их пролиферацию и вызывая апоптоз (Li et al., 2005; Tang et al., 2006; Xia et al., 2020). Герицерон, еринакол и еринацин — соединения, продуцируемые *Hericium erinaceus*, — обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, противовоспалительным и гипогликемическим действием, оказывая тонизирующее влияние на центральную нервную систему и снижая общую утомляемость организма (Wang et al., 2004; Wang et al., 2005; Nagano et al., 2010; Liu et al., 2015; Li et al., 2018). Для видов *H. americanum* и *H. coraloides* также показано образование фенольных соединений, обладающих антиоксидантным действием (Kim et al., 2018; Atila, 2019). Виды рода *Pleurotus* известны как продуценты соединений, обладающих антибиотической, иммуномодулирующей, противоопухолевой, антиоксидантной, противовоспалительной и антивирусной активностью (Gregori et al., 2007; Yang et al., 2013; Ma et al., 2014). Экстракты плодовых тел *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* обладают высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам PC-3 рака простаты, клеткам MCF-7 рака молочной железы, HT-29 рака кишечника, подавляя их пролиферацию путем нарушения клеточного цикла на стадии G0/G1, что приводит к раннему апоптозу (Khan, Tania, 2012; Patel et al., 2012; Deepalakshmi, Sankaran, 2014).

Помимо применения в различных отраслях биотехнологического производства, базидиальные макромицеты представляются перспективными для использования в мероприятиях по биоремедиации экосистем, для которых характерно сильное антропогенное воздействие (Deshmukh et al., 2016). С наращиванием темпов химического производства и обработки нефтепродуктов целесообразным является изучение биоремедиационного потенциала базидиальных макромицетов в отношении широкого спектра ксенобиотиков, к которым относят различные алифатические и полициклические углеводороды, нефть и продукты ее переработки. Ксилотрофные базидиомицеты показали способность к деградации ряда полициклических соединений, синтетических красителей и пестицидов (Eggen, Majcherczyk, 1998; Purnomo et al., 2011; Balaes et al., 2013; Lladó et al., 2013; Rodríguez-Rodríguez et al., 2013; Rosales et al., 2013; Balaes et al., 2014). Помимо этого, отмечена способность разлагать различные алифатические углеводороды и полифенольные соединения (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2009; Ntou-

gias et al., 2015; Young et al., 2015; Kulikova et al., 2016). Важную роль в деградации содержащихся в почве ксенобиотических соединений играет ассоциация ксилотрофных макромицетов с бактериальной микрофлорой (Baldrian, 2008; Pozdnyakova et al., 2008; Zanaroli et al., 2010; Liu et al., 2017; Turkovskaya, Pozdnyakova, 2018).

Ввиду высокого биотехнологического и биоремедиационного потенциала макромицетов, селекции новых линий штаммов, создания новых производственных комплексов, необходимым является изучение влияния длительных периодов хранения на способность культур макромицетов сохранять свою жизнеспособность, формировать плодовые тела, продуцировать активные соединения в объемах, соответствующих значениям до помещения на хранение (Field et al., 1993; Reid, Paice, 1994; Sánchez, 2009; Albu et al., 2020).

МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ

В поддержании коллекций штаммов макромицетов применяется широкий спектр методов хранения, включающий в себя группу протоколов хранения на агаризованных средах в лиофилизированном и замороженном состоянии. Применение тех или иных методов обуславливается характеристиками изучаемого биоматериала и его способностью сохранять свои свойства и жизнеспособность после длительных периодов хранения согласно выбранным протоколам.

Хранение на агаризованных средах

В поддержании коллекций штаммов макромицетов широко применяется группа методов субкультивирования — хранения штаммов на агаризованных средах различного состава с регулярным пересевом на новые стерильные носители. Рекомендуемая частота пересевов варьирует в зависимости от скорости роста исследуемых штаммов, температуры хранения и используемых носителей. Серийные пересевы рекомендуется проводить раз в 3 месяца в случае хранения при комнатной температуре и раз в 6–8 месяцев при хранении в холодильных установках (Onions, 1971). Помимо очевидных преимуществ (сравнительная простота, низкая стоимость расходных материалов), данные методики обладают рядом недостатков — повышение риска контаминации культуры, необходимость в наличии больших объемов свободного места, лабораторной посуды и реактивов, что делает поддержание крупных коллекций штаммов затруднительным.

В ряде работ было изучено влияние длительных периодов хранения методами субкультивирования на морфолого-культуральные признаки изучаемых штаммов. Известны морфологические проявления возникающих мутаций (снижение ра-

диальной скорости роста, потеря характерных морфологических структур, снижение вирулентности для фитопатогенных и энтомопатогенных видов и т.д.) (Samšínáková, Kalalova, 1983; Humber, 1997; Borman et al., 2006). Молекулярные механизмы формирования мутаций при длительном последовательном субкультивировании изучены сравнительно слабо. Известно возникновение одонуклеотидного полиморфизма (ОП) у штаммов, претерпевавших множественные последовательные пересевы. ОП был отмечен в генах *Ganoderma lucidum*, кодирующих ряд ферментов, отвечающих за функционирование мевалонатного пути, синтеза 1,3-β-глюкана и цикла трикарбоновых кислот, после четырех лет субкультивирования при регулярных пересевах каждые 45 сут. ОП был зарегистрирован в 18 из 60 изученных генов, в 14 из них — в районе экзонов. Несинонимичные ОП были найдены в двух генах, кодирующих мевалонатный путь и в пяти генах, ответственных за синтез лигнинразрушающих ферментов. Появление ОП может приводить к изменениям во внутриклеточных биохимических процессах и, с их накоплением, влиять на продукцию биологически активных соединений, их состав, активность (Sakurai et al., 2019).

Помимо стандартного протокола субкультивирования, широко применяется ряд методов хранения штаммов на пробирках со скошенной агаризованной средой под слоем дистиллированной воды или минерального масла, что позволяет повысить продолжительность хранения, увеличив временные промежутки между регулярными пересевами до трех лет, снизить риск высыхания и бактериальной или зоологической контаминации биоматериала (Humber, 1997; Jong, Birmingham, 2001; Nakasone et al., 2004; Richter et al., 2016).

Эффективность хранения на агаризованных средах под слоем стерильной дистиллированной воды была показана для представителей разных таксономических и эколого-трофических групп грибов (Ellis, 1979; Croan et al., 1999; Richter et al., 2010). При этом, отмечено, что ксилотрофные макромицеты, как правило, лучше переживают длительные периоды хранения, сохраняя жизнеспособность после 30 лет хранения при 5°C (Richter, 2008; Richter et al., 2010; Richter et al., 2016). Разработано несколько вариантов хранения культур под слоем дистиллированной воды. Стандартный протокол подразумевает помещение блоков агаризованной среды с развившимся мицелием в запаиваемые стеклянные флаконы со стерильной дистиллированной водой и последующим хранением при комнатной температуре (Castellani, 1963). Модификации данного метода предлагают использовать пробирки с ватно-марлевыми пробками или завинчивающимися крышками, замену дистиллированной воды физиологическим р-ром и дальнейшее хранение при 5°C (Burdall, Dor-

worth, 1994). Может применяться асептическое внесение дистиллированной воды в пробирки со скошенной агаризованной средой с развившимся мицелием. Помимо этого, возможна закладка на хранение в холодильнике суспензии спор и фрагментов мицелия. В случае необходимости может проводиться добавление антибиотика в дистиллированную воду для снижения риска бактериальной контаминации в процессе хранения (Benedek, 1962; Castellani, 1963; McGinnis et al., 1974; de Capriles et al., 1989; Jong, Birmingham, 2001; Maia et al., 2012; Singh et al., 2018; Castro-Rios, Bermeo-Escobar, 2021).

Использование минеральных масел в хранении штаммов макромицетов также позволяет значительно увеличить временные промежутки между пересевами до двух лет, снизить риск бактериального и зоологического инфицирования культур (Stebbins, Robbins, 1949; Fennell, 1960). Стандартная методика хранения культур подразумевает внесение стерильного минерального масла в пробирки поверх скошенной среды с мицелием и дальнейшим хранением при комнатной температуре или в холодильной камере (Perrin, 1979; Humber, 1997). Эффективность протоколов хранения под слоем минерального масла показана для разных таксономических и эколого-трофических групп грибов. Тем не менее, применение данных протоколов осложняется высокой трудозатратностью, большими объемами занимаемого пространства для хранения пробирок и необходимостью освобождать фрагменты биоматериала от излишков минерального масла после изъятия с хранения. В ряде работ были показаны противоречивые результаты в способности закладываемых штаммов сохранять свою жизнеспособность после длительных периодов хранения под слоем минерального масла (Buell, Weston, 1947; Stebbins, Robbins, 1949; Smith, Onions, 1983; Johnson, Martin, 1992; Homolka, Lisá, 2008; Colauto et al., 2012b). Расхождение в результатах может быть связано не только с разной молекулярной массой используемого минерального масла и возможной контаминацией пробирок, но и с видо- и, предположительно, штаммоспецифичностью. Исходя из этого, использование минерального масла и дистиллированной воды в хранении коллекций штаммов целесообразно использовать в комплексе с традиционным серийным пересевом культур и методами криохранения (Psurtseva et al., 2014).

Хранение в лиофилизированном состоянии

Протоколы сублимационной сушки широко распространены в хранении биоматериала дрожжеподобных и мицелиальных микромицетов, формирующих конидии и хламидоспоры. Для неспорулирующих базидиальных макромицетов метод лиофилизации применяется сравнительно редко. Данные об эффективности лиофилизации

для сохранения жизнеспособности мицелия базидиальных грибов разнятся. Закладывание штаммов по стандартной методике, включающей использование агаровых блоков, помещенных в 10%-й р-р трегалозы, показало свою неэффективность (Palacio et al., 2014). Тем не менее, сохранение жизнеспособности после хранения в сублимированном состоянии в течение двух месяцев было отмечено для ряда видов базидиальных макромицетов (Smith, Onions, 1983; Tan et al., 1991; Sundari, Adholeya, 1999; Ivanushkina et al., 2010; Homolka, 2014).

Был предложен протокол подготовки образцов мицелия макромицетов к лиофильной сушке, включающий (Sundari, Adholeya, 1999):

1. Определение наиболее оптимального возраста культуры. Для этого проводилось внесение агаровых блоков с мицелием исследуемого штамма в криопробирки с раствором криопротектора и замораживание до -30°C с последующим помещением блока на чашки Петри, изучением скорости роста и выбором наиболее оптимального криопротектора.

2. Проведение предварительной двухступенчатой заморозки агаровых блоков с мицелием в среде с содержанием криопротектора до -100°C с последующим помещением в сублимационную установку.

3. Подбор регидратирующего р-ра (стерильная дистиллированная вода, жидкая питательная среда Мелин–Норкранс, на которой ранее развивался мицелий, р-р суслы).

Для штамма вида *Laccaria fraterna*, подготовленного к лиофилизационной сушке по указанному протоколу, наибольшую устойчивость к низким температурам и вакуумной сушке показал мицелий возрастом от трех до семи недель, помещенный в 10%-й р-р диметилсульфоксида (ДМСО). Данный протокол был успешно применен к штаммам видов *L. amethystina*, *L. laccata* и др. (Sundari, Adholeya, 1999). Было показано, что хранение в сублимированном состоянии не оказывает негативного действия на активность амилаз, липаз, уреаз, целлюлаз и лигнинразрушающих ферментов штаммов видов *L. amethystina*, *L. fraterna*, *L. laccata* и ряда других (Sundari, Adholeya, 2000a, 2000b).

При закладке биоматериала на хранение методами лиофилизационной сушки возможно применение питательных субстратов-носителей. Сохранение жизнеспособности после сублимации было показано для мицелия штаммов *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Volvariella volvacea*, развившегося на зернах жемчужного проса, использованного в качестве носителя биоматериала (Singh et al., 2004a).

Применение лиофилизации в хранении культур базидиальных макромицетов представляется

перспективным направлением. Тем не менее, для сохранения жизнеспособности исследуемых культур необходим поиск оптимальных условий культивирования, криопротекторных соединений и их комбинаций, субстратов-носителей, создание более специализированных протоколов заморозки (Croan, 2000; Singh et al., 2004b; Palacio et al., 2014).

Хранение при отрицательных температурах

Хранение при отрицательных температурах (криохранение) — группа методов поддержания коллекций штаммов путем заморозки биоматериала культур микроорганизмов с последующим их содержанием при широком спектре отрицательных температур. На данный момент методы криохранения считаются наиболее надежным и эффективным способом сохранения жизнеспособности штаммов макромицетов, не требующим больших затрат лабораторного оборудования и расходных материалов. Необходимым остается наличие холодильных установок, обеспечивающих хранение биоматериала при спектре температур от -80 до -196°C (Humber, 1997; Ryan, Smith, 2007; Homolka, 2013; Singh, Baghela, 2017). Создан ряд протоколов по криохранению культур макромицетов, включающих в себя подбор температуры хранения, скорости заморозки, использование субстратов-носителей и криопротекторных соединений (Homolka et al., 2006; Ozerskaya et al., 2013; Wolkers, Oldenhof, 2021; Linde et al., 2018; Sato et al., 2019).

Температура хранения

Одним из факторов, влияющих на сохранение жизнеспособности культур, является температура хранения исследуемых штаммов и скорость заморозки биоматериала. Наиболее распространено использование морозильных установок, обеспечивающих хранение биоматериала при температуре -80°C , в том числе и в связи со сравнительной доступностью подобных охладителей. Одним из наиболее эффективных протоколов заморозки считается охлаждение биоматериала до температур ниже -139°C . Применяется также и хранение в парах жидкого азота при температуре -196°C , что, согласно ряду сообщений, может обеспечивать наиболее высокую геномную и фенотипическую стабильность (Ryan, Smith, 2007). Возможно использование бытовых морозильных установок, осуществляющих заморозку культур до -20°C , но протоколы содержания штаммов макромицетов в спектре температур от -20 до -60°C применяются сравнительно редко ввиду более высокого риска получения культурами криотравм широкого спектра (Humber, 1997). Тем не менее, для *Pleurotus ostreatus* было показано успешное применение протоколов хранения при -20°C , включающих использование криопротекторных соединений (глю-

коза, сахароза, глицерин и т.д.) и питательного субстрата в виде зерен пшеницы, овса, риса и блоков картофельно-глюкозного агар в качестве контроля (Mantovani et al., 2012).

Известно, что микроструктура кристаллов льда меняется в зависимости от температуры, скорости ее понижения и атмосферного давления. В процессе охлаждения воды от 0 до -25°C происходит последовательное образование кристаллов льда в форме тонких гексагональных пластин, игл, полых колонн из призм, древоподобных структур и, снова, гексагональных пластин, наносящих механические повреждения гифам гриба и цитоплазматическим структурам (Mason et al., 1963; Linde et al., 2018). Помимо механических повреждений, вызываемых кристаллами льда, следствием медленного замораживания является также и резкое повышение концентрации электролитов, растворенных в цитоплазме и окружающем гифы пространстве, например, питательной среде. Это связано с потерей внутриклеточной воды и приводит к необратимым изменениям в структуре клеточных белков (Lovelock, 1953a; Lovelock, 1953b). Микроструктуры льда, формирующиеся в межклеточном пространстве, как правило, несут меньшую опасность по сравнению с внутриклеточными кристаллами (Pegg, 2010).

Известно, что сохранение жизнеспособности биоматериала зависит и от скорости заморозки, которая влияет на транспорт жидкой фазы в клеточной мембране (Mazur, 1963). Скорость заморозки биоматериала влияет на скорость изменения концентрации растворенных в цитоплазме и окружающей клетки жидкости соединений, от чего зависит объем воды, покидающей клетку в процессе заморозки и возвращающейся обратно в процессе оттаивания, и скорость этих процессов. В процессе замораживания вода выходит из клетки, что приводит к повышению концентрации растворенных соединений, что, в свою очередь, снижает температуру, необходимую для ее перехода в твердое состояние, позволяя сохранить цитоплазму в охлажденном, но не кристаллизованном состоянии. При слишком быстрой заморозке жидкая фракция не успевает покинуть клетку в достаточном объеме, что приводит к формированию внутриклеточных кристаллов льда, наносящих летальные повреждения клеткам (Mazur, 1963; Mazur et al., 1984; Mazur et al., 1992; Karlsson et al., 1993; Smith, Thomas, 1997). В свою очередь, слишком медленный процесс заморозки вызывает излишнюю дегидратацию клетки, что также приводит к гибели клеток. Тем не менее, предполагается, что образование внутриклеточных кристаллов льда не является прямой причиной гибели клеток (Farrant, 1977; Fowler, Toner, 2005). Была представлена гипотеза, утверждающая, что смерть биоматериала может быть связана с процессом перекристаллизации, происходящим при оттаива-

нии клеток (Mazur, 2010). В пользу данной гипотезы говорит тот факт, что ряд видов дрожжевых и мицелиальных микромицетов, обитающих в экотопях с температурами, близкими к нулю, способны к формированию и накоплению больших объемов ингибиторов перекристаллизации белковой природы, т.н. “лед-связывающих протеинов” (Lee et al., 2010; Xiao et al., 2010; Arai et al., 2019).

Вычисление оптимальной скорости заморозки культур было объектом ряда исследований. Для сохранения жизнеспособности штаммов бактерий и грибов чаще всего применяют скорость заморозки в $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (Hwang, 1960, 1966, 1968; Morris et al., 1988; Smith, Thomas, 1997; Ivanushkina et al., 2010; Lalaymia et al., 2014). Для достижения таких значений скорости снижения температуры используют программируемые морозильные установки или термоохлаждаемые контейнеры. Подобная скорость является стандартной и для крио-заморозки тканей, отдельных клеток и эмбрионов высших животных (Leibo, 1986; Rubinsky et al., 1988). Для культур грибов рекомендуется также применять методы быстрого оттаивания культур, например, помещение в теплую воду, что позволяет избежать рекристаллизации льда в процессе медленного размораживания биоматериала (Kolkowski, Smith, 1995). Тем не менее, возможно применение и заморозки с неизвестной скоростью снижения температуры (неконтролируемой заморозки), подразумевающей помещение биоматериала в холодильную установку без указанного оборудования (Kitamoto et al., 2002).

Учитывая крайне высокое таксономическое и эколого-трофическое разнообразие макромицетов, механизмов захвата субстрата и его переработки, представляется необходимой разработка методик криохранения, специфичных для определенных групп видов (Homolka, 2014; Zaghi et al., 2020). Помимо использования оптимальной температуры хранения, не менее важным в протоколах криохранения является использование криопротекторных соединений и субстратов-носителей.

Криопротекторные соединения

В процессе замораживания происходит формирование внеклеточных кристаллов льда, оказывающих осмотическое давление на клеточные мембраны биоматериала. Медленное замораживание позволяет избежать формирования крупных кристаллов льда внутри клетки, но может приводить к излишней дегидратации клеток, что в свою очередь, является причиной их гибели из-за резкого повышения концентрации внутриклеточных электролитов (Mazur, 2010). Сохранение жизнеспособности культур макромицетов зависит не только от целостности клеточных мембран, но и от их способности противостоять резким скачкам осмотического давления в процессе заморажива-

ния биоматериала и связанного с ним повышения содержания растворенных соединений. Применение криопротекторных соединений (КПС) необходимо как для искусственного увеличения общей концентрации растворенных соединений в протопласте клеток, так и для обеспечения их плавной дегидратации. Как правило, замораживание культур без добавления КПС приводит к гибели биоматериала (Lovelock, 1953b; Zaghi et al., 2018).

Для льда характерны как группа кристаллических фаз, так и аморфная форма. Среди 18 известных на сегодняшний день кристаллических фаз льда наиболее распространенной является гексагональная форма I_h , образующаяся во время медленной кристаллизации воды при атмосферном давлении на уровне моря (Fang et al., 2013; Zhu et al., 2020; Salzmann et al., 2021). Процесс перехода жидкой фазы в твердую состоит из двух фаз: стадии нуклеации и стадии роста кристаллов. Нуклеация происходит случайным образом в процессе броуновского движения, когда молекулы воды могут сформировать спонтанную, подобную льду структуру, но для формирования кристаллов льда необходимо, чтобы структуры превышали т.н. критический размер зародыша, находящегося в неустойчивом равновесии с окружающей средой. С понижением температуры жидкости и, соответственно, снижением скорости смещения молекул вероятность формирования “ядер” повышается. При увеличении числа молекул в зародыше кристалла, возможным становится его увеличение в размерах (Alexiades, Solomon, 1986).

Аморфная форма льда в чистой воде или другой однокомпонентной среде может сформироваться только при высоком давлении и крайне быстром охлаждении p -ра ($>10^7 \text{ K} \times \text{s}^{-1}$) (Whalley et al., 1989; Kolesnikov et al., 1999; Wolfe, Bryant, 1999). Добавление раствора КПС приводит к увеличению вязкости жидкой фракции биоматериала, связыванию молекул воды, что усложняет процесс формирования зародышей льда, что, в свою очередь, снижает температурную точку кристаллизации, переводя воду в переохлажденное состояние и, при дальнейшем охлаждении, превращая ее в стеклоподобную, аморфную форму (Wolfe, Bryant, 1999; Mandumpal et al., 2011). Таким образом, добавление криопротекторных соединений уменьшает не только объем кристаллического льда, образуемого при заморозке биоматериала, но и смягчает скачок концентрации растворенных электролитов, тем самым позволяя сохранить целостность клеточных стенок мицелия и, следовательно, его жизнеспособность (Wolkers, Oldenhof, 2021).

Криопротекторы можно классифицировать разными способами (Tao, Li, 1986; Hubálek, 2003; Homolka, 2013; Singh, Baghela, 2017):

1. По способности проникать через клеточные покровы [клеточные стенки (КС) и цитоплазма-

тические мембраны (ЦПМ)] – проникающие [диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин], полупроницающие (моно- и олигосахариды, аминокислоты и т.д.) и не проникающие (полисахариды, протеины, полимеры с высокой молекулярной массой)].

2. По скорости проникновения через клеточные покровы. Быстропроникающие (не более 30 мин) – этиленгликоль, ДМСО, диметилформамид. К сравнительно медленно проникающим веществам относят глицерин, моно-, олигосахариды, аминокислоты и др.

3. По химической структуре и молекулярной массе. Диолы (полиэтиленгликоль, пропиленгликоль и др.), моносахариды (глюкоза, ксилоза), дисахариды (сахароза, трегалоза) и т.д.

Проникающие криопротекторные соединения, диффундируя через ЦПМ, связываются с внутриклеточной водой, что приводит к снижению точки кристаллизации воды и уменьшению концентрации растворенных электролитов, сохраняя протоплазму в жидком состоянии, что, в свою очередь, защищает клетки от формирования внутриклеточных кристаллов льда и снижает негативный эффект от повышения концентрации растворенных во внутриклеточном матриксе соединений (Chen et al., 1984; Tao, Li, 1986; Chaytor et al., 2012). Полупроницающие криопротекторы вызывают частичную дегидратацию клеток перед замораживанием. Накапливаясь в пространстве между мембраной и клеточной стенкой, они действуют как буферный слой, защищающий мембрану от механических повреждений, наносимых кристаллами льда. Непроницающие КПС не вступают в непосредственное взаимодействие с клеточными покровами, но вызывают частичный отток внутриклеточной жидкости, повышают вязкость окружающего клетку р-ра, что тормозит рост кристаллов льда (Olien, Smith, 1981; Colauto et al., 2012b). К негативным эффектам от применения проникающих криопротекторных соединений относят их цитотоксичность, растущую с повышением концентрации р-ра, применяемого криопротектора. К наиболее распространенным видам повреждений, вызываемых проникающими КПС, относят нарушение работы сигнальной системы клеток, повреждение митохондрий, встраивание в элементы цитоскелета (Chaytor et al., 2012; Best, 2015).

ДМСО (диметилсульфоксид) – окисленный тиоэфир, обладающий хорошей растворимостью в воде и криопротекторным эффектом, линейно зависящим от концентрации. ДМСО в качестве криопротекторного соединения широко применяется в хранении культур грибов, бактерий, клеток высших животных, что обусловлено его способностью связывать широкий спектр плохо растворимых полярных и неполярных молекул и быстро проникать через клеточные покровы

(Hubálek, Kochková-Kratochvilová, 1978; Brayton, 1986; Galvao et al., 2014). Помимо криопротекторного действия, ДМСО обладает свойствами радиопротектора (Chapman et al., 1979). В ряде исследований была показана высокая цитотоксичность ДМСО, выражающаяся в угнетении роста колоний, подавлении экспрессии генов, индуцировании оксидативного стресса и апоптоза (MacGregor, 1967; Rammner, Zaffaroni, 1967; Typke, 1996; Randhawa, 2008; Momose et al., 2010; Colauto et al., 2012b). Было отмечено, что сохранение жизнеспособности при использовании протоколов криохранения с применением ДМСО штаммоспецифично и, предположительно, зависит от эластичности клеточных покровов и их толщины (Tomizawa et al., 2007; Colauto et al., 2012a).

Глицерин – один из наиболее широко применяемых КПС, используемых в криохранении биоматериалов различного биологического происхождения, показавший высокую эффективность в сохранении жизнеспособности культур базидиальных макромицетов, в том числе эктомикоризных видов (Tanaka et al., 2013; Linde et al., 2018). В ряде работ было показано, что для криохранения культур базидиомицетов наиболее оптимальными являются 5%-й и 10%-й р-ры глицерина (Ito, Nakagiri, 1996; Mantovani et al., 2012; Linde et al., 2018; Sato et al., 2019).

Глюкоза – полупроницающий криопротектор, также применяемый в протоколах криохранения культур базидиальных макромицетов. Тем не менее, было показано, что использование р-ра глюкозы в качестве КПС приводит к снижению жизнеспособности биоматериала базидиомицетов после длительных периодов хранения. Выживаемость зернового мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus* после двух лет хранения составила 97.6% с добавлением р-ра глюкозы и 93% – без криопротектора. На пятый год хранения процент жизнеспособных культур составил 88.6 и 91%, соответственно. При этом штаммы вида *Agaricus subrufescens* после двух лет хранения показали в среднем 94.4% сохранения жизнеспособности при добавлении р-ра глюкозы и 98.3% – без р-ра КПС. После пяти лет выживаемость составила 65% в пробирках с добавлением р-ра глюкозы и 86% – в его отсутствие (Zaghi et al., 2020). Потерю жизнеспособности культур базидиальных макромицетов можно связать с цитотоксичностью глюкозы, а также с индивидуальными характеристиками штаммов изученных видов (Tchounwou et al., 2014). Цитотоксичное действие глюкозы возникает при превышающих норму значениях внутриклеточной концентрации глюкозы и выражается в развитии оксидативного стресса, стресса ЭПР, митохондриального стресса, что приводит к выбросу активных форм кислорода и гибели клетки (Tesaro, Mazzotta, 2020).

Положительный эффект применения р-ра сахарозы в качестве КПС был отмечен для ряда бактериальных штаммов, вирусов и облигатного симбионта *Rhizophagus intraradices*, образующего арбускулярную микоризу (Calcott, MacLeod, 1974; Sehgal, Das, 1975; Chavarri et al., 1988; Declerck, Angelo-Van Coppenolle, 2000; Panoff et al., 2000). При этом опыт использования сахарозы в криохранении базидиальных грибов сравнительно небольшой. Применение р-ров сахарозы различной концентрации показало хорошие результаты для штаммов видов *Agaricus blazei*, *A. subrufescens*, *Lentinus crinitus* и *Pleurotus ostreatus* (Colauto et al., 2012b; Mantovani et al., 2012; Zaghi et al., 2018; Bertélli et al., 2022).

Трегалоза — дисахарид, накапливаемый в цитозоле растительных и грибных клеток, в частности, в покоящихся структурах (споры, склеротии и клетки, находящиеся в стационарной фазе развития), нашедший широкое применение в криохранении бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов (Jorge et al., 1997; Garg et al., 2002; Patist, Zoerb, 2005; Mahmud et al., 2009). Повышение концентрации трегалозы во внутриклеточном матриксе было отмечено для клеток, претерпевающих дегидратацию и другие формы стресса (Ribeiro et al., 1999; Saharan, Sharma, 2010). В случае наступления неблагоприятных условий повышение содержания трегалозы необходимо для стабилизации мембранных фосфолипидов и протеинов, что позволяет клетке сохранить жизнеспособность (Tereshina et al., 2011; Feofilova et al., 2014).

Положительные результаты в сохранении жизнеспособности культур базидиальных макромицетов были показаны для протоколов криохранения, включающих в себя использование смешанных р-ров КПС. Сохранение жизнеспособности культур эктомикоризных базидиомицетов при закладывании биоматериала на криохранение было показано для ряда протоколов, включающих в себя использование комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов. Применение комбинированных р-ров КПС с различными концентрациями компонентов позволяет усилить криопротекторный эффект без повышения риска нанесения повреждений биоматериалу, связанных с токсичностью отдельных составляющих смеси КПС (Sato et al., 2019; Sato et al., 2020).

Использование субстратов-носителей

На сегодняшний день, широко распространено использование метода “агаровых блоков”, подразумевающего помещение фрагментов агаризованной среды с развившимся мицелием в раствор КПС с дальнейшим замораживанием (Hwang, 1960; Hwang, 1966; Hwang, 1968). К модификациям данного метода относят широко распространенные варианты протокола с использованием трубочек

из полипропилена или ПВХ, внутрь которых проводится помещение блоков агаризованной среды с мицелием с дальнейшим запаиванием краев и замораживанием (Elliott, 1976; Challen, Elliott, 1986; Stalpers et al., 1987; Hoffmann, 1991; Homolka et al., 2003; Colauto et al., 2012b). Разработан протокол криохранения, включающий в себя выращивание культур в криопробирках со скошенной агаризованной средой с дальнейшим внесением раствора КПС и помещением в морозильную установку (Voyron et al., 2009; Crahay et al., 2013). Метод “агаровых блоков” и его модификации показали высокую эффективность в хранении широкого спектра видов макромицетов, но, тем не менее, не все базидиальные макромицеты могут сохранять жизнеспособность после длительных периодов хранения согласно указанным протоколам, например, виды, образующие эктомикоризу (Ito, Nakagiri, 1996; Danell, Flygh, 2002; Crahay et al., 2013; Sato et al., 2019).

Разработаны протоколы криохранения с использованием минеральных и органических субстратов-носителей. Среди минеральных субстратов-носителей можно выделить вспененный перлит различных фракций — аморфную алюмосиликатную породу вулканического происхождения, обладающую высокими адсорбционными и теплоизолирующими характеристиками (Sodeyama et al., 1999). Был предложен “перлитовый протокол”, включающий в себя инокуляцию биоматериалом исследуемых штаммов стерильного смоченного жидкой питательной средой с добавлением КПС перлита, с дальнейшей инкубацией и помещением в морозильную установку (Homolka et al., 2001).

Замораживание штаммов проходит через следующие этапы: образец биоматериала подвергается охлаждению с падением температуры до точки замерзания воды. При дальнейшем охлаждении начинает запускаться процесс нуклеации, который приводит к резкому скачку температуры в участке около точки кристаллизации до уровня точки замерзания жидкой фракции. Скачок температуры связан с выбросом скрытой теплоты образца, которая покидает объем биоматериала. Затем, происходит дальнейшее охлаждение уже кристаллизованного образца до установленной программой температуры (Tan et al., 2021). Использование обладающего высокими теплоизолирующими характеристиками вспененного перлита позволяет значительно сгладить скачок температур в процессе замораживания, что, предположительно, может оказывать положительный эффект на сохранение жизнеспособности и характеристик штаммов при закладке на хранение. Помимо этого, применение вспененного перлита в качестве субстрата-носителя позволяет значительно увеличить объем биоматериала штамма, находящегося на хранении в стандартных криопробирках, по сравнению с протоколами метода “агаровых бло-

ков” (Homolka et al., 2001). В отличие от протоколов метода “агаровых блоков”, подразумевающих вырезание блоков среды с мицелием и помещением в раствор КПС, при использовании “перлитового протокола” мицелий изучаемого штамма не подвергается механическим повреждениям в процессе изъятия из слоя агаризованной среды (Homolka et al., 2001).

Данный протокол показал свою эффективность в хранении широкого спектра видов микро- и макромицетов и ряда дрожжей (Homolka et al., 2007; Homolka, 2014). Были разработаны модифицированные варианты “перлитового протокола”, включающие в себя введение раствора КПС за короткий промежуток времени перед заморозкой, а не в начале периода инкубации, которые были успешно применены в хранении ряда видов эктомикоризных базидиомицетов (Sato et al., 2012; Sato et al., 2019).

Высокая эффективность была показана для протоколов криохранения культур базидиомицетов с использованием зерен пшеницы, проса, риса, подвергнутых паровой и тепловой обработке (Colauto et al., 2011; Linde et al., 2018; Bertéti et al., 2022). Для штамма *Agaricus bisporus* было показано сохранение жизнеспособности при использовании зерен пшеницы в качестве субстрата-носителя в отсутствие криопротекторных соединений (Mata, Estrada, 2005). Эндосперм зерен сельскохозяйственных культур отличается высоким содержанием крахмала, ряда аминокислот и жирных кислот, служащих богатым источником питания для мицелия (Šramková et al., 2009; Kowieska et al., 2011). Содержащиеся в эндосперме зерна углеводы и белки связывают молекулы воды, снижая объем свободной воды и, следовательно, количество внеклеточных кристаллов льда, сводя к минимуму риск получения биоматериалом механических повреждений. Помимо этого, важную роль может играть капиллярная микроструктура эндосперма зерна, которая ограничивает объем свободной воды, что препятствует формированию внеклеточных кристаллов льда (Tanaka et al., 2013; Marsola et al., 2022). Вместе с этим, содержащийся в зернах крахмал относится к группе непроникающих криопротекторов, оказывая дополнительный положительный эффект на выживаемость биоматериала на протяжении периодов криохранения (Singh, Baghela, 2017). Протокол с использованием зерен проса также показал свою высокую эффективность в отсутствие раствора криопротектора для мицелия ряда коммерческих штаммов макромицетов (Mata, Pérez-Merlò, 2003).

Вместе с зерновым материалом сельскохозяйственных культур в криохранении культур базидиальных макромицетов применяют целлюлозо-содержащие субстраты-носители. Использование опилок бука городчатого (*Fagus crenata*) в качестве субстрата-носителя показало свою эффектив-

ность для культур видов, относящихся к отделам *Oomycota*, *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, в том числе в варианте протокола без добавления р-ра КПС и при неконтролируемой скорости замораживания (Kitamoto et al., 2002). Для сохранения жизнеспособности культур эктомикоризных базидиомицетов были разработаны протоколы криохранения с использованием содержащей активированный уголь фильтровальной бумаги и измельченного вермикулита в качестве субстратов-носителей (Stielow et al., 2012; Sato et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Базидиальные макромицеты обладают значительным пищевым, биотехнологическим и биоремедиационным потенциалом, что делает их перспективными объектами исследований. С расширением списка изученных видов и видов, применяемых на пищевых и биотехнологических производствах, необходимым является создание коллекций штаммов, использующих протоколы хранения, обеспечивающие сохранение жизнеспособности, физиологических и биохимических свойств на протяжении длительного периода хранения. За последние годы был разработан ряд перспективных протоколов криохранения, включающих в себя использование субстратов-носителей и комбинаций криопротекторных соединений, показавших свою эффективность для чувствительных к замораживанию видов. Вместе с этим, перспективной является разработка протоколов с применением процесса сублимационной сушки. Во избежание потери ценных штаммов, необходимым представляется осуществление многолинейного хранения, включающего в себя хранение культур комплексом методов, к которым относят как протоколы хранения на агаризованных средах, так и протоколы криохранения.

Выражаем глубокую благодарность в.н.с. БИН РАН к.б.н. Н.В. Псурцевой за помощь в ознакомлении с основными методами хранения культур базидиальных макромицетов и проф. кафедры биохимии МГУ д.б.н. А.М. Рубцову за проведение сублимационной сушки культур нашей коллекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahlawat O.P., Manikandan K., Singh M. Proximate composition of different mushroom varieties and effect of UV light exposure on vitamin D content in *Agaricus bisporus* and *Volvariella volvacea*. Mushroom Research. 2016. V. 25 (1). P. 1–8.
- Albu C.V., Rădoi T.A., Diguță C.F. et al. Screening among micro and macromycetes for laccase production. AgroLife Scientific Journal. 2020. V. 9 (1). P. 11–16.
- Alexiades V., Solomon A.D. Critical radius for nucleation. Oak Ridge National Lab., 1986.
<https://doi.org/10.2172/5762299>

- Arai T., Fukami D., Hoshino T. et al. Ice-binding proteins from the fungus *Antarctomyces psychrotrophicus* possibly originate from two different bacteria through horizontal gene transfer. The FEBS journal. 2019. V. 286 (5). P. 946–962.
<https://doi.org/10.1111/febs.14725>
- Atila F. Evaluation of suitability of various agro-wastes for productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* mushrooms. J. Experimental Agriculture International. 2017. V. 17 (5). P. 1–11.
<https://doi.org/10.9734/JEAI/2017/36346>
- Atila F. Comparative evaluation of the antioxidant potential of *Hericium erinaceus*, *Hericium americanum* and *Hericium coralloides*. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus. 2019. V. 18 (6). P. 97–106.
<https://doi.org/10.24326/asphc.2019.6.10>
- Atila F., Owaid M.N., Shariati M.A. The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: a review. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2017. V. 7 (3). C. 281–286.
<https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286>
- Balaş T., Mangalagiu I.I., Tănase C. Lignicolous macromycetes: Potential Candidates for Bioremediation of Synthetic Dyes. Revta Chimie. 2013. V. 64 (9). P. 790–795.
<https://doi.org/10.2478/s11535-014-0302-5>
- Balaş T., Tănase C., Butnariu C. The use of heavy metals in mycoremediation of synthetic dyes. Open Life Sci. 2014. V. 9 (7). P. 659–667.
<https://doi.org/10.2478/s11535-014-0302-5>
- Baldrian P. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. Fungal Ecol. 2008. V. 1 (1). P. 4–12.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001>
- Benedek T. Fragmenta mycologica. II. On Castellani's "water cultures" and Benedek's "mycotheca" in chlorallactophenol. Mycopathologia. 1962. V. 17 (3). P. 255–260.
<https://doi.org/10.1007/BF02279298>
- Bertéti M.B.D., Pinheiro C.R., Philadelpho B.O. et al. Long-term cryopreservation of *Lentinus crinitus* strains by wheat grain technique. J. Microbiol. Methods. 2022. V. 198.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106491>
- Best B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. Rejuvenation Research. 2015. V. 18 (5). P. 422–436.
<https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
- Bisko N.A., Sukhomlyn M.M., Mykchaylova O.B. et al. Ex situ conservation of rare and endangered species in mushroom culture collections of Ukraine. Ukrainskiy botanichnyi zhurnal. 2018. V. 75 (4). P. 338–347.
<https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.04.338>
- Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K. et al. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. Mycopathologia. 2006. V. 161 (6). P. 361–368.
<https://doi.org/10.1007/s11046-006-0023-z>
- Brayton C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. The Cornell Veterinarian. 1986. V. 76 (1). P. 61–90.
- Buell C.B., Weston W.H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. American Journal of Botany. 1947. V. 34 (10). P. 555–561.
<https://doi.org/10.2307/2437337>
- Burdsall H.H. Jr., Dorworth E.B. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. Mycologia. 1994. V. 86 (2). P. 275–280.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026408>
- Calcott P.H., MacLeod R.A. Survival of *Escherichia coli* from freeze–thaw damage: a theoretical and practical study. Can. J. Microbiol. 1974. V. 20 (5). P. 671–681.
<https://doi.org/10.1139/m74-103>
- Castellani A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. Mycopathologia. 1963. V. 20. (1). P. 1–6.
<https://doi.org/10.1007/BF02054872>
- Castro-Rios K., Bermeo-Escobar L.P. Methods for the culture conservation of edible and medicinal fungi. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2021. V. 10 (4). P. 620–625.
<https://doi.org/10.15414/jmbfs.2021.10.4.620-625>
- Challen M.P., Elliot T.J. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. J. Microbiol. Methods. 1986. V. 5 (1). P. 11–22.
[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(86\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0167-7012(86)90019-9)
- Chang S.T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, in China. Int. J. Medicinal Mushrooms. 1999. V. 1 (4). P. 291–300.
<https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v1.i4.10>
- Chapman J.D., Doern S.D., Reuvers A.P. et al. Radioprotection by DMSO of Mammalian Cells Exposed to X-Rays and to Heavy Charged-Particle Beams. Radiation and Environmental Biophysics. 1979. V. 16 (1). P. 29–41.
<https://doi.org/10.1007/BF01326894>
- Chavarri F.J., De Paz M., Nuñez M. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains. Biotechnology Letters. 1988. V. 10 (1). P. 11–16.
<https://doi.org/10.1007/BF01030016>
- Chaytor J.L., Tokarew J.M., Wu L.K. et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. Glycobiology. 2012. V. 22 (1). P. 123–133.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115>
- Chen T.H.H., Kartha K.K., Constabel F. et al. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L.). G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. Plant Physiology. 1984. V. 75 (3). P. 720–725.
<https://doi.org/10.1104/pp.75.3.720>
- Colauro N.B., Cordeiro F.A., Geromini K.V.N. et al. Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. Anns Microbiol. 2012b. V. 62 (2). P. 871–876.
<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0368-5>
- Colauro N.B., da Eira A.F., Linde G.A. Cryopreservation at –80°C of *Agaricus blazei* on rice grains. World J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 27 (12). P. 3015–3018.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0772-9>
- Colauro N.B., da Eira A.F., Linde G.A. Cryopreservation of *Agaricus blazei* in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotectant. Biosci. J. 2012a. V. 28 (6). P. 1034–1037.
- Crahay C., Declerck S., Colpaert J.V. et al. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. Fungal Biol. 2013. V. 117 (2). P. 103–111.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.003>

- Croan S.C. Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting *Basidiomycotina*. *Mycologia*. 2000. V. 92 (4). P. 810–817.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061223>
- Croan S.C., Burdsall H.H. et al. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia*. 1999. V. 91 (5). P. 908–916.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061098>
- Danell E., Flygh G. Cryopreservation of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycol. Res.* 2002. V. 106 (11). P. 1340–1342.
<https://doi.org/10.1017/S0953756202006706>
- de Capriles C.H., Mata S., Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 1989. V. 106. P. 73–79.
<https://doi.org/10.1007/BF00437084>
- Declerck S., Angelo-Van Coppenolle M.G. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 2000. V. 148 (1). P. 169–176.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00740.x>
- Deepalakshmi K., Sankaran M. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J. Biochem. Technol.* 2014. V. 5 (2). P. 718–726.
- Deshmukh R., Khardenavis A.A., Purohit H.J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 2016. V. 56 (3). P. 247–264.
<https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Eggen T., Majcherzyk A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 1998. V. 41 (2). P. 111–117.
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00002-X)
- Elliott T.J. Alternative ampoule for storing fungal cultures in liquid nitrogen. *Trans. British Mycol. Soc.* 1976. V. 67 (3). P. 545–546.
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80197-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80197-0)
- Ellis J.J. Preserving Fungus Strains in Sterile Water. *Mycologia*. 1979. Vol. 71 (5). P. 1072–1075.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021113>
- Fang Y., Xiao B., Tao J. et al. Ice phases under ambient and high pressure: Insights from density functional theory. *Physical Review B*. 2013. V. 87 (21). P. 1–6.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.214101>
- Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philosophical Transact. Royal Soc. London. Ser. B. Biol.* 1977. V. 278 (959). P. 191–205.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0037>
- Fennell D.I. Conservation of fungous cultures. *Botanical Review*. 1960. V. 26 (1). P. 79–141.
<https://doi.org/10.1007/BF02860481>
- Feofilova E.P., Usov A.I., Mysyakina I.S. et al. Trehalose: Chemical Structure, Biological Functions, and Practical Application. *Microbiology*. 2014. V. 83 (3). P. 184–194.
<https://doi.org/10.1134/S0026261714020064>
- Field J.A., Jong E.D., Feijoo-Costa G. et al. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 1993. V. 11 (2). P. 44–49.
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90121-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90121-O)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Fowler A., Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1066. P. 119–135.
<https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>
- Furlani R.P.Z., Godoy H.T. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry*. 2008. V. 106 (2). P. 816–819.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.007>
- Galvao J., Davis B., Tilley M. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. 2014. V. 28 (3). P. 1317–1330.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G. et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natnl Acad. Sci.* 2002. V. 99 (25). P. 15898–15903.
<https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>
- Gąsecka M., Magdziak Z., Siwulski M. et al. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *European Food Res. Technol.* 2018. V. 244. P. 259–268.
<https://doi.org/10.1007/s00217-017-2952-9>
- González A., Atienza V., Montoro A. et al. Use of *Ganoderma lucidum* (*Ganodermataceae*, *Basidiomycota*) as radioprotector. *Nutrients*. 2020. V. 12 (4).
<https://doi.org/10.3390/nu12041143>
- Gregori A., Švagelj M., Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol. Biotechnol.* 2007. V. 45 (3). P. 238–249.
- Hoffmann P. Cryopreservation of fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1991. V. 7 (1). P. 92–94.
<https://doi.org/10.1007/BF02310923>
- Homolka L. Methods of cryopreservation in Fungi. In: V.K. Gupta etc. (eds). *Laboratory protocols in fungal biology: Current methods in fungal biol.* Springer, N.Y., 2013. P. 9–16.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_2
- Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes – Recent methods. *Fungal Biol.* 2014. V. 118 (2). P. 107–125.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Homolka L., Lisá L. Long-term maintenance of Fungal Cultures on Perlite in Cryovials – an Alternative for Agar Slants. *Folia Microbiologica*. 2008. V. 53 (6). P. 534–536.
<https://doi.org/10.1007/s12223-008-0084-0>
- Homolka L., Lisá L., Eichlerová I. et al. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. *J. Microbiol. Methods*. 2001. V. 47 (3). P. 307–313.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00338-4)
- Homolka L., Lisa L., Kubátová A. et al. Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. *Folia Microbiologica*. 2007. V. 52 (2). P. 153–157.
<https://doi.org/10.1007/BF02932154>
- Homolka L., Lisá L., Nerud F. Basidiomycete cryopreservation on perlite: Evaluation of a new method. *Cryobiology*. 2006. V. 52 (3). P. 446–453.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.02.003>
- Homolka L., Lisá L., Nerud F. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols. *Folia Microbiologica*. 2003. V. 48 (2). P. 219–226.
<https://doi.org/10.1007/bf02930959>

- Hu Z., Du R., Xiu L. et al. Protective effect of triterpenes of *Ganoderma lucidum* on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute liver injury. *Cytokine*. 2020. V. 127. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154917>
- Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003. V. 46 (3). P. 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Hubálek Z., Kocková-Kratochvilová A. Liquid nitrogen storage of yeast cultures I. Survival, and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1978. V. 44 (2). P. 229–241. <https://doi.org/10.1007/BF00643225>
- Humber R.A. Fungi: preservation of cultures. In: L.A. Lacey (ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Acad. Press, 1997. P. 269–279. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>
- Hwang S.W. Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia*. 1960. V. 52 (3). P. 527–529. <https://doi.org/10.2307/3755974>
- Hwang S.W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.* 1966. V. 14 (5). P. 784–788. <https://doi.org/10.1128/am.14.5.784-788.1966>
- Hwang S.W. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia*. 1968. V. 60 (3). P. 613–621. <https://doi.org/10.1080/00275514.1968.12018610>
- Ito T., Nakagiri A. Viability of frozen cultures of basidiomycetes after fifteen-year storage. *Microbiology and Culture Collections*. 1996. V. 12 (2). P. 67–78.
- Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Yeremina S.S. et al. Experience in using modern methods of long-term storage of mushrooms in the All-Russian Collection of Microorganisms. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2010. V. 44 (1). P. 19–30 (in Russ.).
- Jahani M., Noroznezhad F., Mansouri K. Arginine: Challenges and opportunities of this two-faced molecule in cancer therapy. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2018. V. 102. P. 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.109>
- Jiang M., Zhu M., Wang L. et al. Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2019. V. 120. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109506>
- Johnson G.C., Martin A.K. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Can. J. Microbiol.* 1992. V. 38 (8). P. 861–864. <https://doi.org/10.1139/m92-140>
- Jong S.C., Birmingham J.M. Cultivation and Preservation of Fungi in Culture. In: D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin, P.A. Lemke (eds). *The Mycota*, volume 7B. Systematics and Evolution. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 193–202.
- Jorge J.A., Polizeli M.D.L.T.M., Thevelein J.M. et al. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 1997. V. 154 (2). P. 165–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12639.x>
- Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. Sci. Food Agric.* 2012. V. 93 (2). P. 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Karlsson J.O., Cravalho E.G., Borel Rinkes I.H. et al. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biophysical J.* 1993. V. 65 (6). P. 2524–2536. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81319-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81319-5)
- Khan M.A., Tania M. Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: An overview. *Food Reviews International*. 2012. V. 28 (3). P. 313–329. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.637267>
- Kim J.Y., Woo E.E., Lee I.K. et al. New antioxidants from the culture broth of *Hericium coralloides*. *J. Antibiotics*. 2018. V. 71. P. 822–825. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0067-6>
- Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S. etc. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*. 2002. V. 43. P. 143–149. <https://doi.org/10.1007/s102670200021>
- Kolesnikov A.I., Li J., Parker F., Eccleston R.S. et al. Vibrational dynamics of amorphous ice. *Physical Review B*. 1999. V. 59 (5). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.59.3569>
- Kolkowski J.A., Smith D. Cryopreservation and freeze-drying of Fungi. In: J.G. Day, M.R. McLellan (eds.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Methods in Molecular Biology, V. 38. Humana Press, N.J., 1995, pp. 49–61. <https://doi.org/10.1385/0-89603-296-5:49>
- Kowieska A., Lubowicki R., Jaskowska I. Chemical composition and nutritional characteristics of several cereal grain. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*. 2011. V. 10 (2). P. 37–50.
- Kulikova N.A., Klein O.I., Pivchenko D.V. et al. Oil degradation by basidiomycetes in soil and peat at low temperatures. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52 (6). P. 629–637. <https://doi.org/10.1134/S0003683816060119>
- Lalaymia I., Cranenbrouck S., Declerck S. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2014. V. 24. P. 323–337. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0541-8>
- Lee J.K., Park K.S., Park S. et al. An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (2). P. 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.002>
- Leibo S.P. Cryobiology: Preservation of mammalian embryos. In: J.W. Evans, A. Hollaender, C.M. Wilson (eds). *Genetic engineering of animals, an agricultural perspective*. Springer, N.Y., 1986, pp. 251–272. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5110-8_21
- Li C.H., Chen P.Y., Chang U.M. et al. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sciences*. 2005. V. 77 (3). P. 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.045>
- Li I.C., Lee L.Y., Tzeng T.T. et al. Neurohealth properties of *Hericium erinaceus* mycelia enriched with erinacines. *Behavioural Neurology*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5802634>
- Linde G.A., Luciani A., Lopes A.D. et al. Long-term cryopreservation of basidiomycetes. *Brazilian J. Microbiol.*

2018. V. 49 (2). P. 220–231.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.004>
- Liu B., Liu J., Ju M. et al. Bacteria-white-rot fungi joint remediation of petroleum-contaminated soil based on sustained-release of laccase. RSC Advances. 2017. V. 7 (62). P. 39075–39081.
<https://doi.org/10.1039/C7RA06962F>
- Liu J., Du C., Wang Y. et al. Anti-fatigue activities of polysaccharides extracted from *Hericium erinaceus*. Experimental and Therapeutic Medicine. 2015. V. 9 (2). P. 483–487.
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.2139>
- Liu J., Jia L., Kan J. et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Food and Chemical Toxicology. 2013. V. 51. P. 310–316.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.014>
- Liu X., Yuan J.P., Chung C.K. et al. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. Cancer Letters. 2002. V. 182 (2). P. 155–161.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00080-0)
- Lladó S., Covino S., Solanas A.M. et al. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. J. Hazardous Materials. 2013. V. 248. P. 407–414.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.020>
- Lodge D.J., Ammirati J.F., O'Dell T.E. et al. Terrestrial and lignicolous macrofungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds). Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, 1st edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 127–172.
<https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50011-8>
- Lovelock J.E. Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochimica et Biophysica Acta. 1953a. V. 11. P. 28–36.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90005-5)
- Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochimica et Biophysica Acta. 1953b. V. 10. P. 414–426.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90273-X](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90273-X)
- Ma G., Yang W., Mariga A.M. et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. Carbohydrate Polymers. 2014. V. 114. P. 297–305.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.069>
- Ma H.T., Hsieh J.F., Chen S.T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 2015. V. 114. P. 109–113.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.017>
- MacGregor W.S. The chemical and physical properties of DMSO. Annls N.Y. Acad. Sci. 1967. V. 141 (1). P. 3–12.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34860.x>
- Mahmud S.A., Nagahisa K., Hirasawa T. et al. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2009. V. 26 (1). P. 17–30.
<https://doi.org/10.1002/yea.1646>
- Maia S.C., Toledo R.C.C., Almeida A.P.M.M. et al. Low-cost and low maintenance preservation of *Agaricus brasiliensis* cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 2411–2416.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1050-1>
- Mandumpal J.B., Kreck C.A., Mancera R.L. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. Physical Chemistry Chemical Physics. 2011. V. 13. P. 3839–3842.
<https://doi.org/10.1039/C0CP02326D>
- Mantovani T.R.D., Tanaka H.S., Umeo S.H. et al. Cryopreservation at –20 and –70°C of *Pleurotus ostreatus* on grains. Indian J. Microbiol. 2012. V. 52 (3). P. 484–488.
<https://doi.org/10.1007/s12088-012-0289-4>
- Marco-Urrea E., Aranda E., Caminal G. et al. Induction of hydroxyl radical production in *Trametes versicolor* to degrade recalcitrant chlorinated hydrocarbons. Biore-source Technology. 2009. V. 100 (23). P. 5757–5762.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.078>
- Marco-Urrea E., Gabarell X., Sarrà M. et al. Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Environmental Sci. Technol. 2006. V. 40 (24). P. 7796–7802.
<https://doi.org/10.1021/es0622958>
- Marsola S.J., Jorge L.F., Meniqueti A.B. et al. Endophytic fungi of *Brunfelsia uniflora*: isolation, cryopreservation, and determination of enzymatic and antioxidant activity. World J. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 38 (6).
<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03278-5>
- Mason B.J., Bryant G.W., Van den Heuvel A.P. The growth habits and surface structure of ice crystals. Philosophical Magazine. 1963. V. 8 (87). P. 505–526.
<https://doi.org/10.1080/14786436308211150>
- Mata G., Estrada A.E.R. Viability in spawn stocks of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*, after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. J. Agricultural Technol. 2005. V. 1. P. 153–162.
- Mata G., Pérez-Merlò R. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. Cryobiology. 2003. V. 47 (1). P. 14–20.
[https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00064-6)
- Mattila P., Kõnkö K., Eurola M. et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. J. Agric. Food Chemistry. 2001. V. 49 (5). P. 2343–2348.
<https://doi.org/10.1021/jf001525d>
- Mazur P. A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. Cryobiology. 2010. V. 60 (1). P. 4–10.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.12.001>
- Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. The Journal of General Physiology. 1963. V. 47 (2). P. 347–369.
<https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>
- Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Cell Biophysics. 1984. V. 6. P. 197–213.
<https://doi.org/10.1007/BF02788619>
- Mazur P., Schneider U., Mahowald A.P. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. Cryobiology. 1992. V. 29 (1). P. 39–68.
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90005-M](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90005-M)
- McGinnis M.R., Padhye A.A., Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic *Actinomycetes* in sterile distilled water. Appl. Microbiol. 1974. V. 28 (2). P. 218–222.
<https://doi.org/10.1128/am.28.2.218-222.1974>
- Momose Y., Matsumoto R., Maruyama A. et al. Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer

- tolerance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Cryobiology. 2010. V. 60 (3). P. 245–261.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.001>
- Morris G.J., Smith D., Coulson G.E. A Comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. Microbiology. 1988. V. 134 (11). P. 2897–2906.
<https://doi.org/10.1099/00221287-134-11-2897>
- Mueller G.M., Schmit J.P., Leacock P.R. et al. Global diversity and distribution of macrofungi. Biodiversity and Conservation. 2007. V. 16. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1007/s10531-006-9108-8>
- Muszyńska B., Kała K., Rojowski J. et al. Composition and Biological Properties of *Agaricus bisporus* Fruiting Bodies – a Review. Polish J. Food Nutr. Sci. 2017. V. 67 (3). P. 173–181.
<https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0032>
- Nagano M., Shimizu K., Kondo R. et al. Reduction of depression and anxiety by 4 weeks *Hericium erinaceus* intake. Biomedical Res. 2010. V. 31 (4). P. 231–237.
<https://doi.org/10.2220/biomedres.31.231>
- Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.C. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds). Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods, 1st ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 37–47.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehalotis C. et al. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. Bioresource Technol. 2015. V. 189. P. 121–130.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>
- Olien C.R., Smith M.N. Extension of localized freeze injury in barley by acute post-thaw bacterial disease. Cryobiology. 1981. V. 18 (4). P. 404–409.
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(81\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0011-2240(81)90114-0)
- Onions A.H.S. Preservation of Fungi. In: C. Booth (ed.). Methods in microbiology. V. 4. Academic Press, L., 1971, pp. 113–151.
[https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(09\)70009-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(09)70009-1)
- Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A. et al. Long-term preservation of fungal cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): Protocols and results. In: V.K. Gupta et al. (eds.). Laboratory protocols in fungal biology: Current methods in fungal biol. Springer, N.Y., 2013, pp. 17–65.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_3
- Palacio A., Gutiérrez Y., Rojas D. et al. Viability of basidiomycete fungal strains under different conservation methods: cryopreservation vs. freeze-drying processes. Actualidades Biológicas. 2014. V. 36 (100). P. 13–21.
- Panoff J.M., Thamavongs B., Guéguen M. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. Cryobiology. 2000. V. 40 (3). P. 264–269.
<https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2240>
- Patel Y., Naraian R., Singh V.K. Medicinal Properties of *Pleurotus* species (Oyster Mushroom): A review. World J. Fungal Plant Biol. 2012. V. 3 (1). P. 1–12.
- Patist A., Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2005. V. 40 (2). P. 107–113.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.003>
- Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. Cryobiology. 2010. V. 60 (3). P. 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003>
- Perrin P.W. Long-term storage of cultures of wood-inhabiting fungi under mineral oil. Mycologia. 1979. V. 71 (4). P. 867–869.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021086>
- Pillai T.G., Nair C.K.K., Janardhanan K.K. Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo. Environmental Toxicol. Pharmacol. 2008. V. 26 (1). P. 80–85.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.02.004>
- Pozdnyakova N.N., Nikitina V.E., Turovskaya O.V. Bioremediation of oil-polluted soil with an association including the fungus *Pleurotus ostreatus* and soil microflora. Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44 (1). P. 60–65.
<https://doi.org/10.1134/S0003683808010109>
- Psurtseva N.V., Kiyashko A.A., Senik S.V. Basidial fungi of the Botanical Garden of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences in pure culture. In: Botany: history, theory, practice (on the occasion of the 300th anniversary of the founding of the V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences): Proceedings of the International Scientific Conference. SPb., 2014, p. 260 (in Russ.).
- Purnomo A.S., Mori T., Takagi K., Kondo R. Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. Int. Biodeterior. Biodegradation. 2011. V. 65 (5). P. 691–695.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.004>
- Rai R.D. Production of Edible Fungi. In: D.K. Arora, P.D. Bridge, D. Bhatnagar (eds). Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Marcel Dekker, Inc., N.Y., 2004, pp. 382–404.
- Rammler D.H., Zaffaroni A. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. Annals of the N.Y. Academy of Sciences. 1967. V. 141 (1). P. 13–23.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34861.x>
- Randhawa M.A. Dimethyl sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2008. V. 49 (2). P. 125–128.
<https://doi.org/10.3314/jjmm.49.125>
- Reid I.D., Paice M.G. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiol. Reviews. 1994. V. 13 (2–3). P. 369–375.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00056.x>
- Ribeiro M.J.S., Leão L.S.C., Morais P.B. et al. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. Antonie van Leeuwenhoek. 1999. V. 75 (3). P. 245–251.
<https://doi.org/10.1023/a:1001806012566>
- Richter D.L. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 20 years in cold storage in sterile water. Can. J. Microbiol. 2008. V. 54. P. 595–599.
<https://doi.org/10.1139/W08-049>
- Richter D.L., Dixon T.G., Smith J.K. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 30 years in cold storage in sterile water. Can. J. Microbiol. 2016. V. 62. P. 932–937.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0272>

- Richter D.L., Kangas L.C., Smith J.K. et al. Comparison of effectiveness of wood decay fungi maintained by annual subculture on agar and stored in sterile water for 18 years. *Can. J. Microbiol.* 2010. V. 56. P. 268–271. <https://doi.org/10.1139/W10-001>
- Rodríguez-Rodríguez C.E., Castro-Gutiérrez V., Chin-Pampilo J.S. et al. On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. *FEMS Microbiology Letters*. 2013. V. 345 (1). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12161>
- Rosales E., Pazos M., Ángeles Sanromán M. Feasibility of solid-state fermentation using spent fungi-substrate in the biodegradation of PAHs. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2013. V. 41 (6). P. 610–615. <https://doi.org/10.1002/clen.201100305>
- Rubinsky B., Pegg D.E., Calne R.Y. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. *Proc. Royal Soc. London. Ser. B. Biol.* 1988. V. 234 (1276). P. 343–358. <https://doi.org/10.1098/rspb.1988.0053>
- Ryan M.J., Smith D. Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. In: J.G. Day, G.N. Stacey (eds). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, 2007. P. 127–140. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9
- Saharan R.K., Sharma S.C. Correlation studies of trehalose with oxidative stress in ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. *Current Res. J. Biol. Sci.* 2010. V. 2 (5). P. 300–305.
- Sakurai K., Yuasa M., Ohji S. et al. Gene mutations in *Ganoderma lucidum* during long-term preservation by repeated subculturing. *Biopreservation and Biobanking*. 2019. V. 17 (5). P. 395–400. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0149>
- Salzmann C.G., Loveday J.S., Rosu-Finsen A. et al. Structure and nature of ice XIX. *Nature Communications*. 2021. V. 12. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23399-z>
- Samšínáková A., Kálalová S. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebrate Pathol.* 1983. V. 42 (2). P. 156–161. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90057-5)
- Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Advances*. 2009. V. 27 (2). P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K. et al. *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnol.* 2009. V. 10 (8). P. 717–742. <https://doi.org/10.2174/138920109789978757>
- Sato M., Inaba S., Noguchi M. et al. Vermiculite as a culture substrate greatly improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Fungal Biol.* 2020. V. 124 (8). P. 742–751. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.05.002>
- Sato M., Inaba S., Sukenobe J. et al. A modified perlite protocol with a mixed dimethyl sulfoxide and trehalose cryoprotectant improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Mycologia*. 2019. V. 111 (1). P. 161–176. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1520035>
- Sato M., Sukenobe J., Nakagiri A. Cryopreservation of cryo-sensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. *CryoLetters*. 2012. V. 33 (2). P. 86–94.
- Sehgal O.P., Das P.D. Effect of freezing on conformation and stability of the virions of southern bean mosaic virus. *Virology*. 1975. V. 64 (1). P. 180–186. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90090-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90090-2)
- Semwal D.K., Semwal R.B., Combrinck S. et al. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*. 2016. V. 8 (2). <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
- Singh S.K., Baghela A.K. Cryopreservation of microorganisms. In: A. Varma, A.K. Sharma (eds). *Modern tools and techniques to understand microbes*. Springer, Cham, 2017, pp. 321–333. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_21
- Singh S.K., Singh P.N., Gaikwad S.B. et al. Conservation of Fungi: A review on conventional approaches. In: S.K. Sharma, A. Varma (eds). *Microbial resource conservation: Conventional to modern approaches*. Springer, Cham, 2018, pp. 223–237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_8
- Singh S.K., Upadhyay R.C., Kamal S. et al. Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *CryoLetters*. 2004a. V. 25 (1). P. 23–32.
- Singh S.K., Upadhyay R.C., Yadav M.C. et al. Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Sci.* 2004b. V. 87 (5). P. 568–570.
- Smirna T.P., Joseph J., Janardhanan K.K. *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent γ -radiation induced oxidative stress in Swiss albino mice in vivo. *Redox Report*. 2016. V. 21 (6). P. 254–261. <https://doi.org/10.1080/13510002.2015.1126098>
- Smith D. The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. *CryoLetters*. 1998. V. 19 (2). P. 79–90.
- Smith D., Onions A.H.S. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans. British Mycol. Soc.* 1983. V. 81 (3). P. 535–540. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80122-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80122-3)
- Smith D., Thomas V.E. Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 14. P. 49–57. <https://doi.org/10.1023/A:1008820432471>
- Sodeyama K., Sakka Y., Kamino Y. et al. Preparation of fine expanded perlite. *J. Materials Sci.* 1999. V. 34. P. 2461–2468. <https://doi.org/10.1023/A:1004579120164>
- Šramková Z., Gregová E., Šturdík E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*. 2009. V. 2 (1). P. 115–138.
- Stalpers J.A., Hoog A., Vlug I.J. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. *Mycologia*. 1987. V. 79 (1). P. 82–89. <https://doi.org/10.2307/3807747>
- Stebbins M.E., Robbins W.J. Mineral oil and preservation of fungous cultures. *Mycologia*. 1949. V. 41 (6). P. 632–636. <https://doi.org/10.1080/00275514.1949.12017806>

- Stielow J.B., Vaas L.A.I., Göker M. et al. Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic *Basidiomycota* and *Ascomycota*. *Mycologia*. 2012. V. 104 (1). P. 324–330. <https://doi.org/10.3852/11-155>
- Stoychev I., Homolka L., Nerud G. et al. Activities of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 73. P. 211–214. <https://doi.org/10.1023/A:1000837719510>
- Sundari S.K., Adholeya A. Freeze-drying vegetative mycelium of *Laccaria fraterna* and its subsequent regeneration. *Biotechnology Techniques*. 1999. V. 13. P. 491–495. <https://doi.org/10.1023/A:1008937719759>
- Sundari S.K., Adholeya A. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000a. V. 16 (4). P. 373–376. <https://doi.org/10.1023/A:1008984700163>
- Sundari S.K., Adholeya A. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzymes acting upon carbon compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000b. V. 16 (8). P. 865–868. <https://doi.org/10.1023/A:1008921419630>
- Tan C.S., van Ingen C.W., Stalpers J.A. Freeze-drying of fungal hyphae and stability of the product. In: *L.J.L.D. van Griensven* (ed.). *Genetics and Breeding of Agaricus*. Pudoc, Wageningen, 1991, pp. 25–30.
- Tan M., Mei J., Xie J. The formation and control of ice crystal and its impact on the quality of frozen aquatic products: A review. *Crystals*. 2021. V. 11 (1). <https://doi.org/10.3390/cryst11010068>
- Tanaka H.S., Mantovani T.R.D., dos Santos M.P. et al. Cereal grains and glycerol in *Agaricus blazei* cryopreservation. *Biosci. J.* 2013. V. 29 (3). P. 627–633.
- Tang W., Liu J.W., Zhao W.M. et al. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*. 2006. V. 80 (3). P. 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.001>
- Tao D., Li P.H. Classification of plant cell cryoprotectants. *J. Theoretical Biology*. 1986. V. 123 (3). P. 305–310. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80245-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80245-4)
- Tchounwou C.K., Yedjou C.G., Farah I. et al. D-glucose-induced cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects on human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *J. Cancer Sci. Therapy*. 2014. V. 6 (5). P. 156–160. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000265>
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R. The influence of various thermal effects on the composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in filamentous fungi. *Mikrobiologiya*. 2011. V. 80 (4). P. 447–453 (in Russ.).
- Tesaro M., Mazzotta F.A. Pathophysiology of diabetes. In: *G. Orlando et al.* (eds.). *Transplantation, bioengineering, and regeneration of the endocrine pancreas*. V. 1. Elsevier Academic Press, Amsterdam etc., 2020. P. 37–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814833-4.00003-4>
- Tomizawa M.M., Dias E.S., de Assis L.J. et al. Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using markers RAPD. *Ciência e Agrotecnologia*. 2007. V. 31 (4). P. 1242–1249. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000400045>
- Turkovskaya O.V., Pozdnyakova N.N. Features of the use of mushrooms in environmental biotechnologies. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2018. V. 3 (5). P. 60–66 (in Russ.).
- Typke V. The r_s structure of DMSO, revisited. *J. Molecular Structure*. 1996. V. 384 (1). P. 35–40. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(96\)09313-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(96)09313-1)
- Vetter J. Biological values of cultivated mushrooms – a review. *Acta Alimentaria*. 2019. V. 48 (2). P. 229–240. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.2.11>
- Voyron S., Roussel S., Munaut F. et al. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Micol. Res.* 2009. V. 113 (10). P. 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>
- Wang J.C., Hu S.H., Wang J.T. et al. Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. *J. Sci. Food Agric.* 2005. V. 85 (4). P. 641–646. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1928>
- Wang Z., Luo D., Liang Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polymers*. 2004. V. 57 (3). P. 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.018>
- Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *Int. J. Medicinal Mushrooms*. 1999. V. 1 (1). <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30>
- Wessels J.G.H. Fruiting in the higher fungi. *Advances Microbial Physiol.* 1993. V. 34. P. 147–202. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60029-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60029-6)
- Whalley E., Klug D.D., Handa Y.P. Entropy of amorphous ice. *Nature*. 1989. V. 342. P. 782–783. <https://doi.org/10.1038/342782a0>
- Wolfe J., Bryant G. Freezing, Drying, and/or vitrification of membrane–solute–water systems. *Cryobiology*. 1999. V. 39 (2). P. 103–129. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2195>
- Wolkers W.F., Oldenhof H. Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues. In: *W.F. Wolkers, H. Oldenhof* (eds). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, N.Y., 2021, pp. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_1
- Xia J., Dai L., Wang L. et al. Ganoderic acid DM induces autophagic apoptosis in non-small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR activity. *Chemico-Biological Interactions*. 2020. V. 316. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108932>
- Xiao N., Suzuki K., Nishimiya Y. et al. Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. *The FEBS Journal*. 2010. V. 277 (2). P. 394–403. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07490.x>
- Yang Z., Xu J., Fu Q. et al. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydrate Polymers*. 2013. V. 95 (2). P. 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.024>

- Young D., Rice J., Martin R. et al. Degradation of bunker C fuel oil by white-rot fungi in sawdust cultures suggests potential applications in bioremediation. *PIOS One*. 2015. V. 10 (6).
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130381
- Zaghi L.L., Bertéti M.B.D., de Freitas J.D.S. et al. Five-year cryopreservation at -80°C of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. *J. Microbiol. Methods*. 2020. V. 176.
https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106030
- Zaghi L.L. Jr., Lopes A.D., Cordeiro F.A. et al. Cryopreservation at -75°C of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. *Brazilian J. Microbiol.* 2018. V. 49 (2). P. 370–377.
https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.003
- Zanaroli G., Di Toro S., Todaro D. et al. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories*. 2010. V. 9.
https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-10
- Zhang Y., Geng W., Shen Y. et al. Edible mushroom cultivation for food security and rural development in China: Bio-innovation, technological dissemination and marketing. *sustainability*. 2014. V. 6 (5). P. 2961–2973.
https://doi.org/10.3390/su6052961
- Zhao L., Dong Y., Chen G. et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 2010. V. 80 (3). P. 783–789.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029
- Zhu C., Gao Y., Zhu W. et al. Computational prediction of novel ice phases: A perspective. *J. Phys. Chem. Letters*. 2020. V. 11 (17). P. 7449–7461.
https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c01635
- Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Еремина С.С. и др. (Ivanushkina et al.) Опыт использования современных методов длительного хранения грибов во Всероссийской коллекции микроорганизмов // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. № 1. С. 19–30.
- Псурцева Н.В., Кияшко А.А., Сеник С.В. (Psurtseva et al.) Базидиальные грибы Ботанического сада Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН в чистой культуре // Ботаника: история, теория, практика (к 300-летию основания Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук): Труды международной научной конференции. 2014. 260 с.
- Терешина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р. (Tereshina et al.) Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 447–453.
- Турковская О.В., Позднякова Н.Н. (Turkovskaya, Pozdnyakova) Особенности использования грибов в экологических биотехнологиях // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. Т. 3. № 5. С. 60–66.

Methods for Long-Term Storage of Pure Cultures of Macrofungi

N. S. Komissarov^{a,#}, M. Yu. Dyakov^{a,##}, and L. V. Garibova^{a,###}

^aLomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

[#]e-mail: macoloams@gmail.com

^{##}e-mail: max_fungi@mail.ru

^{###}e-mail: gariblv@yandex.ru

Basidiomycetous macrofungi have significant biotechnological potential and are promising objects for use in various industrial sectors, such as food production, pharmaceuticals, the production of active compounds and polysaccharides. The industrial use of macrofungi implies the presence of large collections of cultures using storage protocols that ensure the preservation of viability, reproduction, genetic stability and the ability to produce active compounds. With the expansion of the list of industrially used species, it is advisable to develop new protocols for the storage of strains and optimize the existing ones for new, promising types of macrofungi. It seems necessary to study in detail the effect of long periods of storage on morphological and cultural characteristics, genetic stability, enzymatic activity, and the ability to form sexual structures.

Keywords: basidiomycetes, cryopreservation, cryoprotectant, lyophilization, macrofungi

БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА,
ЭКОЛОГИЯ

УДК 582.28

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АГАРИКОИДНЫМ И ГАСТЕРОИДНЫМ
АГАРИКОМИЦЕТАХ (*AGARICOMYCETES*)
ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ (РОССИЯ)© 2023 г. А. И. Иванов^{1,*}, А. А. Ермолаева^{1,**}, А. А. Миронова^{2,***}¹Пензенский государственный аграрный университет, 440014 Пенза, Россия²Пензенский государственный университет, 440026 Пенза, Россия

*e-mail: rcgekim@mail.ru

**e-mail: ermolaeva7733@yandex.ru

***e-mail: mironovaanna20@gmail.com

Поступила в редакцию 15.09.2022 г.

После доработки 01.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Изучение агарикоидных и гастероидных грибов, относящихся к классу *Agaricomycetes*, в Пензенской обл. ведется с 1976 г. В связи с существенными изменениями в систематике данной группы грибов, произошедшими в последние десятилетия, возникла необходимость в ревизии материалов, накопленных за 46-летний период исследований. В результате проведенной ревизии было установлено, что на территории Пензенской обл. обитает 837 видов агарикоидных и гастероидных грибов класса *Agaricomycetes*. Они относятся к 8 порядкам, 39 семействам и 137 родам. Наиболее крупными семействами, включающими в себя более 50 видов, являются *Agaricaceae*, *Cortinariaceae*, *Psathyrellaceae*, *Russulaceae*, *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, от 20 до 50 видов — *Boletaceae*, *Bolbitiaceae*, *Crepidotaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Marasmiaceae* и *Mycenaceae*. Остальные семейства включают в себя менее чем по 20 видов. Первое место по видовому богатству занимает род *Cortinarius* (109 видов), второе — род *Russula* (60 видов). К родам, включающим в себя от 30 до 60 видов, относятся *Inocybe* и *Mycena*, от 20 до 30 видов — *Agaricus*, *Entoloma*, *Lactarius*, *Lepiota*, *Psathyrella* и *Tricholoma*, от 10 до 20 видов — *Amanita*, *Clitocybe*, *Conocybe*, *Coprinopsis*, *Galerina*, *Hebeloma*, *Hygrocybe*, *Hygrophorus*, *Marasmius*, *Melanoleuca*, *Panaeolus*, *Pholiota*. Остальные роды характеризуются меньшим видовым богатством. Они составляют 82% от общего количества родов. Из них 41 род включает в себя только по одному виду. В ходе исследований, проводившихся с 2018 по 2022 г., было найдено 27 видов агарикомицетов, новых для региона. Из них 3 — *Russula groenlandica*, *R. insignis* и *R. melzeri* отмечены впервые в России. В то же время 20 видов, обнаруженных ранее, не были подтверждены в результате проведенной ревизии. В ходе наблюдений с 1976 по 2022 г. было установлено, что численность некоторых видов грибов рассматриваемой группы не является постоянной и в многолетнем режиме подвержена изменениям. Например, у *Agaricus xanthodermus*, *Caloboletus radicans*, *Infundibulicybe geotropa*, *Lactarius semisanguifluus*, *Lepista personata*, *Mutinus ravenellii* и *Rubinoletus rubinus* она увеличивается, а у *Floccularia luteovirens*, *Lactarius turpis*, *Leucopaxillus tricolor*, *Russula chloroides* и *Tylopilus felleus* — уменьшается.

Ключевые слова: видовое богатство, Красные книги, микобиота, редкие виды, таксономическая структура, флуктуации

DOI: 10.31857/S0026364823030030, EDN: VCIJTS

ВВЕДЕНИЕ

Изучение агарикоидных и гастероидных грибов, относящихся к классу *Agaricomycetes*, в Пензенской обл. было начато в 1976 г. К 1983 г. в регионе было выявлено 532 вида агарикоидных и гастероидных макромицетов (Иванов, 1983а). В ходе дальнейших исследований эти сведения были существенно дополнены. В диссертационной работе А.И. Иванова (Иванов, 1992а) для лесостепи правобережного Поволжья приводится список, включающий 871 вид. Однако в него были включены

таксоны, отмеченные и в сопредельных областях — Самарской, Саратовской и Ульяновской. Они также расположены в пределах физико-географической зоны, рассматриваемой в диссертации. В этом списке непосредственно для территории Пензенской обл. указывается 775 видов. Эти материалы, а также результаты дальнейших исследований в основном опубликованы (Иванов, 1981, 1982, 1983b, 1983c; 1985; 1986; 1988a; 1988b; 1989; 1992b; 2013; 2014; 2018; Иванов, Nezdoiminogo, 1990). Кроме того, ссылки на образцы, собранные автором в Пензенской обл., имеются в монографических

сводках Э.Л. Нездойминого (Nezdoiminogo, 1996) и А.Е. Коваленко (Kovalenko, 1989).

Большая часть этих материалов, исключая широко распространенные виды, легко определяемые в полевых условиях, хранится в микологической коллекции лаборатории систематики и географии грибов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE). Материалы, собранные в 2021 и 2022 гг., находятся в гербарии им. И.И. Спрыгина (РКМ) Пензенского государственного университета. На его базе в 2021 г. авторами начата работа по созданию фунгария.

В связи с активным внедрением методов ДНК-анализа в последние десятилетия, в систематике грибов класса *Agaricomycetes* произошли существенные изменения. Поэтому анализ таксономической структуры их видового состава в условиях Пензенской обл., проводившийся в диссертационных работах (Ivanov, 1983a, 1992a), к настоящему времени устарел. Это усложняет возможность использования ранее опубликованных материалов, для сравнительного анализа таксономической структуры микобиот других регионов. Кроме того, актуализация ранее опубликованных аннотированных списков важна с точки зрения изучения географии вновь описанных родов и семейств.

Это определило цель данной работы, которая заключалась в систематизации имеющихся материалов в соответствии с современной систематикой агарикомицетов, а также подготовке аннотированного списка видов, новых для территории Пензенской обл., обнаруженных в последние пять лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пензенская обл. располагается в центральной части Русской равнины в 600 км к юго-востоку от Москвы в пределах Приволжского федерального округа. Она занимает западный склон Приволжской возвышенности, для которого характерен равнинный рельеф с сильным эрозионным расчленением. В восточной, наиболее возвышенной части области, распространены серые лесные почвы, которые формируются на силикатных породах — опоках, песчаниках и песках, а также на карбонатных породах — мергелях и мелах. В центральной и западной части области черноземные почвы формируются на лессовидных суглинках. Описанное геологическое строение и сложный рельеф определяют разнообразие экотопов, в условиях которых формировался почвенный и растительный покров региона (Ivanov et al., 2017). Растительность Пензенской обл. имеет типичный лесостепной облик. Ее лесистость составляет 20.5%. Главными лесообразующими породами являются *Betula pendula*, *Pinus sylvestris*, *Populus tremula*, *Quercus robur* и *Tilia cordata*. Коренным типом лесной растительности на большей части территории региона явля-

ются сосново-широколиственные леса. На наиболее плодородных серых лесных суглинистых и супесчаных почвах формируются сложные сосняки неморального типа, со значительным участием широколиственных пород *Quercus robur* и *Tilia cordata*. На маломощных песчаных почвах последние выпадают почти полностью. Здесь формируются сосняки бореального типа — зеленомошные и лишайниковые. В южных районах области встречаются остепненные сосняки. На фоне сосновых лесов встречаются сфагновые болота, находящиеся в рассматриваемом регионе на южной границе своего распространения. Лесные сообщества Пензенской обл. сильно нарушены рубками. В том случае, если на месте вырубок не создаются культуры *Pinus sylvestris*, формируются вторичные типы леса березняки и осинники, а также широколиственные леса из *Tilia cordata* и *Acer platanoides* с участием *Quercus robur* и мелколиственных пород. Все они сильно нарушены рубками и имеют преимущественно порослевое происхождение. В пойменных местообитаниях широко распространены леса из *Alnus glutinosa*, заросли *Salix* spp. с участием *Populus nigra*. Преобладающим типом травяной растительности на выщелоченных черноземах являются луговые степи. Встречаются также фрагменты песчаных и песчано-каменистых степей, приуроченных главным образом к смытым почвам склонов (Leonova, 2015; Ivanov et al., 2017).

Описанное разнообразие экотопов создает условия для формирования богатой видами микобиоты. Однако лимитирующим фактором для некоторых видов агарикомицетов обитателей наиболее влажных, главным образом приморских районов лесной зоны, является умеренно-континентальный климат района исследований. Для него характерен некоторый дефицит влаги и периодически повторяющиеся продолжительные засухи. Это накладывает определенный отпечаток на таксономическую структуру биоты агарикоидных и гастероидных базидиомицетов.

В качестве материала исследования были использованы образцы грибов, хранящиеся в РКМ и собранные авторами на территории Пензенской обл. с 2016 по 2022 г. Их описание, обработка и микроскопирование осуществлялись согласно стандартным методикам (Ivovlov et al., 2017) с применением световых микроскопов Levenhuk D870T и ZEISS Axio Vert. A1. Определение грибов осуществлялось с использованием руководств, учитывающих изменения, произошедшие в систематике агарикомицетов в последние десятилетия (Munož, 2005; Knudsen, Vesterholt, 2012; Kalamees, 2011; Flora., 2018; Kalamees, Liiv, 2019).

Актуальность названий грибов и правильность их написания выверялась в соответствии с базой данных Index Fungorum (2022).

РЕЗУЛЬТАТЫ

К настоящему времени на территории Пензенской обл. выявлено 837 видов грибов, относящихся к классу *Agaricomycetes*, которые ранее рассматривались как агарикоидные и гастероидные базидиомицеты. Они относятся к 8 порядкам, 39 семействам и 137 родам.

Наиболее крупным порядком в рассматриваемой биоте агарикомицетов, который включает в себя 80% выявленных видов, является порядок *Agaricales*. Высокое видовое богатство свойственно также порядку *Russulales* и *Boletales* на которые приходится 11 и 6%, соответственно. Остальные порядки *Geastrales*, *Gloeophyllales*, *Hymenochaetales*, *Phallales* и *Polyporales* включают в себя всего 3% выявленных видов.

Наиболее крупными семействами, включающими в себя более 50 видов, являются *Agaricaceae*, *Cortinariaceae*, *Psathyrellaceae*, *Russulaceae*, *Strophariaceae* и *Tricholomataceae*. Вторую группу семейств, объединяющих в себе от 20 до 50 видов, составляют *Boletaceae*, *Crepidotaceae*, *Bolbitiaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Mycenaceae* и *Marasmiaceae*. Остальные семейства включают в себя менее чем по 20 видов. Состав наиболее крупных семейств отражает лесостепной характер микобиоты. На него указывает нахождение в их числе семейств *Agaricaceae*, *Psathyrellaceae* и *Strophariaceae*, включающих большое количество видов, связанных с луговыми и степными сообществами.

Наиболее крупным родом в рассматриваемой микобиоте является род *Cortinarius*, представленный 109 видами. Это является результатом его детального изучения, проводившегося совместно с Э.Л. Нездоймино с 1985 по 1993 г., а не географической особенностью микобиоты района исследований. В связи с тем, что род *Cortinarius* является самым крупным родом грибов рассматриваемой группы (Nezdoiminogo, 1996), его ведущее положение по числу видов, вероятно, свойственно всем регионам, где имеют место лесные экотопы. Однако, как показывает анализ региональных сводок, выполненных в основном в рамках диссертационных работ, этот род не всегда оказывается на первом месте по видовому богатству. Причиной этого является то, что многие его представители, особенно относящиеся к подроду *Phlegmacium*, образуют плодовые тела не ежегодно, а лишь в годы высокой солнечной активности (Ivanov, 2016). В первую очередь это относится к видам, растущим в широколиственных лесах. Поэтому в годы, находящиеся в промежутке между одиннадцатилетними пиками солнечной активности, их просто не удастся выявить. Этим объясняется то, что в списках видов неморальных микобиот род *Cortinarius* хотя и находится в числе ведущих, но по видовому богатству обычно уступает другим родам (Kalinina, 2021).

Второе место по видовому богатству в рассматриваемой микобиоте занимает род *Russula*, представленный 60 видами. С одной стороны, это результат специальных исследований, проводившихся с 2016 по 2022 г., в результате которых он был изучен достаточно полно. С другой стороны, это особенность рассматриваемой микобиоты, т.к. среди представителей данного рода много видов, относительно нетребовательных к влажности почвы и способных к образованию плодовых тел при температуре воздуха от 20 до 25°C. То есть более сухой и теплый климат лесостепи, по сравнению с лесной зоной, оказывается благоприятным для представителей рода *Russula* (Shapogova, 2007). К наиболее крупным родам, включающим более 30 видов, относятся *Mycena* и *Inocybe*.

Среди родов, включающих в себя от 20 до 30 видов, наибольшим количеством таксонов представлен род *Lactarius*, включающий 27 видов. Учитывая, что большинство представителей этого рода предпочитают влажный приморский климат, можно считать, что его видовой состав в районе исследований несколько обеднен. Так, на территории Эстонии, сравнимой по площади с Пензенской обл., отмечено 56 видов, относящихся к рассматриваемому роду (Kalamees, 2011). Показательно также, что в северо-западных районах РФ виды родов *Lactarius* и *Russula* представлены близким количеством видов (Kalinina, 2021). В районе же исследований род *Lactarius* составляет всего 45% от видового богатства рода *Russula* (табл. 1).

К группе крупных родов, объединяющих более 20 видов, относятся также *Agaricus*, *Lepiota*, *Psathyrella* и *Tricholoma*. Большое количество видов в трех первых родах объясняется тем, что среди их представителей много обитателей травяных сообществ. Это указывает на лесостепной характер рассматриваемой микобиоты (Wasser, 1985). Видовой состав рода *Tricholoma*, несмотря на его положение в числе наиболее крупных родов, как и рода *Lactarius*, в районе исследований несколько обеднен. Если в Эстонии он представлен 41 видом (Kalamees, Liiv, 2019), то в Пензенской обл. отмечено всего 25 относящихся к нему видов, большая часть которых являются редкими в условиях региона.

Третья группа родов, объединяющая в себе от 10 до 20 видов, представлена 12 родами. Остальные роды характеризуются меньшим видовым богатством. Они составляют 82% от общего количества родов. Из них 41 род включает в себя только по одному виду.

Как было показано выше, к 1991 г. было выявлено порядка 90% видового состава агарикоидных и гастероидных агарикомицетов в условиях Пензенской обл. В последующие годы происходило как выявление новых, так и исключение из списка ранее опубликованных таксонов.

В ходе углубленного изучения рода *Agaricus* на территории региона было найдено три вида, но-

Таблица 1. Таксономическая структура биоты агарикоидных базидиомицетов Пензенской обл.

Порядок	Число видов	Семейство	Число видов	Род	Число видов
<i>Agaricales</i>	667	<i>Agaricaceae</i>	75	<i>Agaricus</i>	22
				<i>Apioperdon</i>	1
				<i>Bovista</i>	2
				<i>Bovistella</i>	2
				<i>Calvatia</i>	2
				<i>Chlorophyllum</i>	3
				<i>Coprinus</i>	1
				<i>Cystoderma</i>	3
				<i>Cystolepiota</i>	3
				<i>Disciseda</i>	2
				<i>Floccularia</i>	1
				<i>Lepiota</i>	21
				<i>Leucoagaricus</i>	1
				<i>Lycoperdon</i>	5
				<i>Macrolepiota</i>	4
				<i>Mecenastrum</i>	1
				<i>Tulostoma</i>	1
		<i>Amanitaceae</i>	18	<i>Amanita</i>	15
				<i>Limacella</i>	3
		<i>Bolbitaceae</i>	21	<i>Bolbitius</i>	3
				<i>Conocybe</i>	13
				<i>Pholiotina</i>	5
		<i>Cortinariaceae</i>	109	<i>Cortinarius</i>	109
		<i>Crepidotaceae</i>	39	<i>Crepidotus</i>	6
				<i>Inocybe</i>	31
				<i>Pleurotellus</i>	1
				<i>Simocybe</i>	1
		<i>Entolomataceae</i>	30	<i>Clitopilus</i>	3
				<i>Entoloma</i>	25
				<i>Rhodocybe</i>	1
				<i>Rhodophana</i>	1
		<i>Hydnangiaceae</i>	5	<i>Laccaria</i>	5
		<i>Hygrophoraceae</i>	28	<i>Cantharellula</i>	1
				<i>Cuphophyllus</i>	3
				<i>Hygrocybe</i>	10
				<i>Hygrophorus</i>	14
		<i>Hymenogastraceae</i>	34	<i>Galerina</i>	15
				<i>Gymnopilus</i>	3
				<i>Hebeloma</i>	16
		<i>Lyophyllaceae</i>	10	<i>Asterophora</i>	1
				<i>Calocybe</i>	2
				<i>Hypsizygus</i>	1
				<i>Lyophyllum</i>	3
				<i>Ossicaulis</i>	1
				<i>Tephrocybe</i>	1
				<i>Tricholomella</i>	1

Таблица 1. Продолжение

Порядок	Число видов	Семейство	Число видов	Род	Число видов
		<i>Marasmiaceae</i>	20	<i>Crinipellis</i>	1
				<i>Macrocystidia</i>	1
				<i>Marasmiellus</i>	2
				<i>Marasmius</i>	15
				<i>Megacollybia</i>	1
		<i>Mycenaceae</i>	39	<i>Hemimycena</i>	3
				<i>Mycena</i>	31
				<i>Panellus</i>	2
				<i>Roridomyces</i>	1
				<i>Xeromphalina</i>	2
		<i>Physalacriaceae</i>	11	<i>Armillaria</i>	5
				<i>Flammulina</i>	1
				<i>Hymenopellis</i>	1
				<i>Oudemansiella</i>	1
				<i>Rhodotus</i>	1
				<i>Strobilurus</i>	2
				<i>Collybiopsis</i>	2
				<i>Gymnopus</i>	8
				<i>Rhodocollybia</i>	3
		<i>Phyllotopsidaceae</i>	1	<i>Phyllotopsis</i>	1
		<i>Pleurotaceae</i>	7	<i>Hohenbuehelia</i>	1
				<i>Pleurotus</i>	6
		<i>Pluteaceae</i>	19	<i>Pluteus</i>	16
				<i>Volvariella</i>	3
		<i>Psathyrellaceae</i>	53	<i>Coprinellus</i>	8
				<i>Coprinopsis</i>	10
				<i>Lacrymaria</i>	1
				<i>Parasola</i>	3
				<i>Psathyrella</i>	29
				<i>Tulosesus</i>	2
		<i>Pseudoclitocybaceae</i>	1	<i>Pseudoclitocybe</i>	1
		<i>Strophariaceae</i>	58	<i>Agrocybe</i>	6
				<i>Flammula</i>	1
				<i>Gymnopilus</i>	1
				<i>Hemistropharia</i>	1
				<i>Hemipholiota</i>	2
				<i>Hypholoma</i>	9
				<i>Kuehneromyces</i>	1
				<i>Panaeolus</i>	10
				<i>Pholiota</i>	12
				<i>Psilocybe</i>	8
				<i>Stropharia</i>	7
		<i>Tricholomataceae</i>	70	<i>Clitocybe</i>	19
				<i>Delicatula</i>	1
				<i>Dendrocollybia</i>	1
				<i>Dermoloma</i>	1

Таблица 1. Продолжение

Порядок	Число видов	Семейство	Число видов	Род	Число видов
				<i>Infundibulicybe</i>	2
				<i>Leucopaxillus</i>	5
				<i>Melanoleuca</i>	13
				<i>Pseudoclitocybe</i>	1
				<i>Ripartites</i>	2
				<i>Tricholoma</i>	25
		<i>Tubariaceae</i>	6	<i>Flammulaster</i>	1
				<i>Phaeomarasmius</i>	1
				<i>Tubaria</i>	4
<i>Boletales</i>	50	<i>Boletaceae</i>	27	<i>Boletus</i>	4
				<i>Caloboletus</i>	2
				<i>Chalciporus</i>	1
				<i>Hemileccinum</i>	2
				<i>Hortiboletus</i>	1
				<i>Imleria</i>	1
				<i>Leccinellum</i>	1
				<i>Leccinum</i>	8
				<i>Neoboletus</i>	2
				<i>Pseudoboletus</i>	1
				<i>Rubinoboletus</i>	1
				<i>Xerocomellus</i>	2
				<i>Xerocomus</i>	1
		<i>Gomphidiaceae</i>	3	<i>Gomphidius</i>	3
<i>Gastrales</i>	9	<i>Gyroporaceae</i>	2	<i>Gyroporus</i>	2
		<i>Hygrophoropsidaceae</i>	2	<i>Hygrophoropsis</i>	2
		<i>Melanogastraceae</i>	1	<i>Melanogaster</i>	1
		<i>Paxillaceae</i>	3	<i>Paxillus</i>	3
		<i>Rhizopogonaceae</i>	1	<i>Rhizopogon</i>	1
		<i>Suillaceae</i>	6	<i>Suillus</i>	6
		<i>Sclerodermataceae</i>	3	<i>Scleroderma</i>	3
		<i>Tapinellaceae</i>	2	<i>Tapinella</i>	2
<i>Gloeophyllales</i>	2	<i>Gloeophyllaceae</i>	2	<i>Neolentinus</i>	2
<i>Hymenochaetales</i>	3	<i>Rickenellaceae</i>	3	<i>Rickenella</i>	3
<i>Phallales</i>	3	<i>Phallaceae</i>	3	<i>Mutinus</i>	1
				<i>Phallus</i>	2
<i>Polyporales</i>	13	<i>Panaceae</i>	3	<i>Panus</i>	2
				<i>Neofavolus</i>	1
		<i>Polyporaceae</i>	10	<i>Cerioporus</i>	2
				<i>Lentinus</i>	3
				<i>Picipes</i>	3
				<i>Polyporus</i>	2
<i>Russulales</i>	90	<i>Russulaceae</i>	90	<i>Lactarius</i>	27
				<i>Lactifluus</i>	3
				<i>Russula</i>	60

вых для Пензенской обл. (Ivanov, 2018). В то же время из списка таксонов были исключены: *Agaricus fissuratus* (F.H. Møller) F.H. Møller, который в настоящее время рассматривается как синоним *A. arvensis* Schaeff., *A. purplellus* (F.H. Møller) F.H. Møller — как синоним *A. haemorrhoidarius* Schulzer и *A. semotus* Fr. — как синоним *A. sylvaticus* Schaeff.

Ряд видов семейства *Boletaceae* также стали пониматься шире в связи с чем некоторые отмечавшиеся нами ранее таксоны были переведены в синонимы. Это *Leccinum percandidum* Lannou et Estades, *L. quercinum* (Pilát) E.E. Green et Watling и *L. subcinnamomeum* Pilát et Dermek. В настоящее время первый рассматривается как синоним *L. versipelle* (Fr.) Snell. второй — *L. aurantiacum* (Bull.) Gray, а третий — *L. scabrum* (Bull.) Gray.

Как показали исследования, проводившиеся в последние двадцать лет зарубежными и российскими микологами, представители семейства *Boletaceae*, характеризуются сильным внутривидовым полиморфизмом (Munož, 2005; Janda et al., 2017; Ivanov et al., 2017). Для большинства из них характерно высокое фенотипическое разнообразие, что привело в прошлом к описанию большого количества видов, которые оказываются лишь цветовыми вариациями уже известных таксонов (Janda, Kříž, 2016; Janda et al., 2017). Это подтверждается молекулярно-генетическими исследованиями и изучением таких анатомических структур плодовых тел, как споры, гифы кутикулы и т.п. (Šutara, 2014). В связи с этим возникла необходимость в ревизии результатов исследований, проводившихся до выхода последних монографических сводок, учитывающих указанные аспекты (Munož, 2005; Knudsen, Vesterholt, 2012; Flora., 2018). В результате проведения этой работы было установлено, что коллекционные образцы, определявшиеся нами ранее как *Boletus rhodopurpureus* Smotl. и *B. rhodoxanthus* (Krombh.) Kallenb., не были подтверждены новыми сборами и оказались цветовыми вариациями очень полиморфного вида — *Rubroboletus legaliae* (Pilát et Dermek) Della Magg. et Trassin., для которого характерна сильная изменчивость соотношения желтых и красных пигментов в окраске плодового тела.

Не менее выражен внутривидовой полиморфизм у *Caloboletus radicans* (Pers.) Vizzini. Особенно сильно он начал проявляться в последние десятилетия, когда этот вид стал активно осваивать новые местообитания, и из категории редких перешел в число широко распространенных. Как показали наши наблюдения, характерная для этого вида клубневидная ножка с веретеновидным основанием, погруженным в почву, оказывается выраженной только в условиях изреженных дубовых редколесий и на опушках. Под пологом леса, при сильном затенении ножка имеет цилиндрическую форму. Сильно варьирует также такой признак,

как горький вкус мякоти, который во влажную погоду сохраняется только в гименофоре. В результате изучения большого количества плодовых тел было установлено, что коллекционные образцы, определенные ранее как *Boletus fechtneri* Velen., оказались модификациями *Caloboletus radicans* (Pers.) Vizzini, выросшими в условиях затенения. Между ними и образцами с типичными для вида признаками наблюдались переходные формы. Кроме того, в ходе исследований, проводившихся в 2021 и 2022 гг., было установлено, что в окраске ножки *C. radicans* могут присутствовать красные пигменты. Как показало изучение большого количества плодовых тел, их присутствие может проявляться как в виде незначительного красноватого оттенка, так и в виде достаточно яркой окраски, на что отсутствуют указания в литературе. Последнее привело в прошлом к ошибочному определению подобного образца как *B. calopus* Pers.

Сильная изменчивость окраски, габитуса и размеров плодовых тел характерна для видов рода *Xerocomellus*. В результате изучения анатомического строения 18 образцов было установлено, что все они относятся к одному виду *X. porosporus* (Imler ex Watling) Šutara. Нахождение таких видов, как *X. chrysenteron*, *X. pruinatus* и *X. ripariellus*, отмечавшихся нами ранее (Ivanov, 2014), не было подтверждено.

Таким образом, из списка видов грибов семейства *Boletaceae* было исключено 9 видов, а вновь обнаружено всего три.

Определенные изменения за период исследований произошли в распространении некоторых видов. В первую очередь это связано с тем, что численность отдельных видов агарикомицетов нестабильна — подвержена флуктуациям в многолетнем режиме. Например, такой вид, как *Lepista personata* (Fr.) Cooke, отмеченный впервые для Пензенской обл. в 1991 г. всего одной находкой (Ivanov, Kalamees, 1992), за прошедшие 40 лет стал не только широко распространенным, но и массовым. В настоящее время он заготавливается населением как съедобный гриб. Изменение характера встречаемости в плане существенного увеличения численности было отмечено также для *Agaricus xanthodermus* Genev. и *Infundibulicybe geotropa* (Bull.) Nagtaja. Если в 1970–90-х гг. эти грибы отмечались единичными находками, в первые десятилетия XXI в. они стали широко распространенными видами. Из редких видов, занесенных в Красную книгу Пензенской обл. (Red data book, 2013), существенно расширили свое распространение в регионе *Caloboletus radicans* (Pers.) Vizzini и *Lactarius semisanguifluus* R. Heim et Leclair. Последний стал широко заготавливаться как съедобный гриб. В связи с этим данные виды не будут включены в последующее издание Красной книги региона. Заносный вид — *Mutinus ravenellii* (Berk. et M.A. Curtis) E. Fich., отмеченный ранее в Пензенской обл.

одной находкой в условиях антропогенного ландшафта, с 2021 г. стал активно внедряться в леса из *Alnus glutinosa* в условиях пойм. В аномально жарком и влажном августе 2022 г. он был найден в семи пунктах, где развивался довольно массово. Определенная тенденция в плане увеличения численности в последние десятилетия наблюдается у такого вида как *Rubinoboletus rubinus* (W.G. Smith) Pilát et Dermek. В последние 20 лет количество его находок в Пензенской обл. возросло с одной до 14. Кроме того этот гриб был обнаружен не только в пойменных дубравах на черноземовидных карбонатных почвах, но и на водоразделах на кислых светло-серых лесных, по опушкам под старыми деревьями дуба. Поэтому в следующем издании Красной книги Пензенской обл. его статус будет изменен с 1 на 3.

Наряду с увеличением численности, у некоторых видов проявляется ее снижение. Как показал мониторинг местообитаний ряда редких видов, занесенных в Красную книгу Пензенской обл. (Red data book, 2013), некоторые из них с 2000 г. вообще не образовывали плодовых тел. Это *Leucopaxillus tricolor* (Peck) Kühner и *Floccularia luteovirens* (Alb. et Schwein.) Pouzar. В связи с этим их статус с 3 и 2 должен быть изменен на статус 1.

Ниже приводится аннотированный список видов, которые отмечены впервые для Пензенской обл. за последние пять лет. Их распространение в России с указанием количества опубликованных ссылок на находки приводится по С.Ю. Большакову с соавторами (Bolshakov et al., 2021). Виды, впервые отмеченные на территории РФ, обозначены звездочкой.

Boletaceae

Hortiboletus rubellus (Krombh.) Simonini, Vizzini et Gelardi. — 20.07.2017. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”, дубняк. Распространение в Пензенской обл.: достаточно распространенный вид. Отмечено 10 находок в разных р-нах. LE 316225. Распространение в РФ: Европейская часть (10), Сибирь (3), Дальний Восток (6).

Neoboletus xanthopus (Klofac et A. Urb.) Klofac et A. Urb. — 03.08.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”, дубняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. Вероятно, довольно распространенный вид, т.к. на территории Памятника природы “Пойменная дубрава” отмечен пятью находками. РКМ F2. Распространение в РФ: Европейская часть, Тульская область (LE 316225, Т.Ю. Светашева).

Xerocomellus cisalpinus (Simonini, H. Ladurner et Penitner) Klofac — 30.07.2018. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”, дубовый лес. LE 316225. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. Распространение в РФ: Европейская часть (3).

Russulaceae

Lactarius fulvissimus Romagn. — 01.08.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Бурчихинские склоны”, дубняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: редкий, узко стенотопный, кальцефильный вид. РКМ F20. Распространение в РФ: Европейская часть (7), Сибирь (1), Дальний Восток (5).

Russula atropurpurea (Krombh.) Britzelm. — 01.08.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”, дубняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: довольно распространенный вид, в пределах памятника природы “Пойменная дубрава” и на прилегающих территориях отмечено 7 находок. РКМ F7. Распространение в РФ: Европейская часть (18), Сибирь (3), Дальний Восток (2).

R. atrorubens Qué. — 05.09.2021. Пензенский р-н. Светлополянское лесничество, сосняк чернично-моховой, во влажной западине. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. РКМ F21. Распространение в РФ: Европейская часть (14), Сибирь (2).

R. caerulea (Pers.) Fr. — 07.09.2021. Пензенский р-н. Светлополянское лесничество. Культурный сосняк 40 лет, среди травы. Распространение в Пензенской обл.: широко распространенный, типичный для травяных сосняков вид. РКМ F31. Распространение в РФ: Европейская часть (2), Сибирь (3), Дальний Восток (2).

R. citrinoclora Singer — 15.09.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Засурский бор черничник”, березо-сосняк чернично-моховой. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. РКМ F6. Распространение в РФ: Европейская часть (3), Сибирь (2), Дальний Восток (1).

R. clavipes Velen. — 12.09.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Засурский бор черничник”, березо-сосняк чернично-моховой. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. РКМ F4. Распространение в РФ: Европейская часть (2), Сибирь (2).

R. consobrina (Fr.:Fr.) Fr. — 23.09.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Бурчихинские склоны”, липодубняк с участием березы. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F18. Распространение в РФ: Европейская часть (43), Сибирь (11), Дальний Восток (11).

R. cretiaeovallanea Singer — 10.06.2021. Никольский р-н. Окр. с. Большое Пермиево, Березняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F16. Распространение в РФ: Европейская часть (6).

R. decipiens (Singer) Bon — 01.08.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”, дубняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид. РКМ F17. Распространение в РФ: Европейская часть (11).

R. fontqueri Singer — 13.09.2022. Пензенский р-н. Окр. пос. Ахуны, березняк разнотравный. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F19. Распространение в РФ: Европейская часть (8).

R. fragrantissima Romagn. — 07.07.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”. Дубово-осиновый лес, в западинах с застойным режимом увлажнения. РКМ F15. Распространение в РФ: Европейская часть (1).

R. gracillima Jul. Schaff. — 30.09.21. Лунинский р-н окр. с. Ломовка, березо-сосняк чернично-моховой. РКМ F14. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. Распространение в РФ: Европейская часть (26), Сибирь (14), Дальний Восток (15).

**R. groenlandica* Ruots. et Vauras — 12.09.2021. Пензенский р-н. Памятник “Засурский бор черничник”, березо-сосняк чернично-моховой. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. РКМ F12.

**R. insignis* Qué. — 29.06.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”, дубняк снытево-осоковый. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F4.

R. medullata Romagn. — 07.07.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”. В западине с застойным режимом увлажнения, окруженной дубово-осиновым лесом. Распространение в Пензенской обл.: очень полиморфный, распространенный вид, предпочитающий пойменные местообитания, отмечено более 10 находок. РКМ F23. Распространение в РФ: Европейская часть (16), Сибирь (3).

**R. melzeri* Zvara — 7.07.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Бурчихинские склоны”, дубняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: редкий, стенотопный, кальцефильный вид. РКМ F22.

R. minutula Velen — 15.09.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Засурский бор черничник”, березо-сосняк чернично-моховой. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. РКМ F32. Распространение в РФ: Европейская часть (7), Сибирь (1).

R. pallidospora J. Blum ex Romagn. — 17.07.2020. Пензенский р-н. Окр. пос. Ахуны. Липо-дубняк волосистоосоковый. Распространение в Пензенской обл.: довольно распространенный кальцефильный вид, отмечено более 10 находок. РКМ F24. Распространение в РФ: Европейская часть (3), Сибирь (1).

R. pectinatoides Peck — 17.08.21. г. Пенза. Сквер ПГСХА. Под липами. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F3. Распространение в РФ: Европейская часть (30), Сибирь (14).

R. pseudodelica J.E. Lange — 7.07.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”. В западинах с застойным режимом увлажнения, окруженных дубово-осиновым лесом. РКМ F25. Распространение в Пензенской обл.: довольно распространенный узко специализированный по отношению к пойменным местообитаниям вид, отмечено более 10 находок. Распространение в РФ: Европейская часть (10), Дальний Восток (20).

R. rhodopus Zvara — 15.09.2021. Пензенский р-н. Памятник “Засурский бор черничник”, березо-сосняк чернично-моховой. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид, на юго-восточной границе ареала. РКМ F26. Распространение в России: Европейская часть (9), Сибирь (4).

R. rutila Romagn. — 07.07.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”. В западинах с застойным режимом увлажнения, окруженных дубово-осиновым лесом. Распространение в Пензенской обл.: редкий вид. РКМ F27. Распространение в РФ: Европейская часть (1).

R. sororia (Fr.) Romell — 01.08.2021. Пензенский р-н. Памятник природы “Пойменная дубрава”. Распро-

странение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F28. Распространение в РФ: Европейская часть (5), Сибирь (2).

R. subfoetens W.G. Sm. — 25.08.2021. Пензенский р-н. Окр. пос. Барковка, влажный лиственный лес из *Alnus glutinosa*, *Betula pendula* и *Populus tremula*. Распространение в Пензенской обл.: требует дальнейшего изучения. РКМ F29. Распространение в РФ: Европейская часть (7), Сибирь (2).

R. vinosa Lindblad — 07.09.2021. Пензенский р-н. Памятник “Засурский бор черничник”, березо-сосняк чернично-моховой. Распространение в Пензенской обл.: распространенный, типичный для средневозрастных сосняков вид, отмечен 11 находками. РКМ F30. Распространение в РФ: Европейская часть (48), Сибирь (13), Дальний Восток (13).

ОБСУЖДЕНИЕ

Опубликованный ранее анализ таксономической структуры видового состава агарикоидных и гастероидных агарикомитетов Пензенской обл. к настоящему времени потерял свою актуальность. Это связано с существенными изменениями в систематике данной группы грибов, которые произошли в последние десятилетия. Количество семейств за счет вновь описанных таксонов, начиная с 1992 г. (Ivanov, 1992a) возросло с 25 до 39, а количество родов со 121 до 137. В связи с широким внедрением в систематику агарикомитетов методов молекулярно-генетических исследований изменилось понимание некоторых видов. Часть из них стала пониматься шире. Порядка 20 видов, обнаруженных ранее в районе исследований (Ivanov et al., 1992a), перешли в разряд синонимов. В то же время за последние 30 лет было выявлено 65 видов новых для рассматриваемого региона. Из них 28, ранее не опубликованных, приводятся в данной статье. Таким образом, на территории Пензенской обл. к настоящему времени зафиксировано 837 видов агарикоидных и гастероидных агарикомитетов. Как показывают результаты наблюдений, численность некоторых видов грибов рассматриваемой группы в многолетнем режиме не является постоянной, а подвержена изменениям. У одних видов она увеличивается, у других уменьшается. Это необходимо учитывать, как при планировании заготовок съедобных грибов, так и при определении статуса редкости охраняемых видов, при подготовке очередных изданий региональной Красной книги.

Своим приятным долгом авторы считают выразить глубокую благодарность к.б.н. Т.Ю. Светашевой за помощь в работе по определению видов семейства *Boletaceae*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bolshakov S., Kalinina L., Palomozhnykh E. et al. Agaricoid and boletoid fungi of Russia: the modern country-scale checklist of scientific names based on literature data. Bi-

- ological Communications. 2021. V. 66 (4). <https://doi.org/10.21638/spbu03.2021.404>
- Flora Agaricina Neerlandica. Critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands. V. 7. *Boletales. Russulales* pt 1 / M.E. Noordeloos et al. (eds). Candusso, 2018.
- Index Fungorum. CABI Bioscience, 2022. <http://www.indexfungorum.org>. Accessed 20.10.2022.
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Part I. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1981. V. 18. P. 86–93 (in Russ.).
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Part II. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1982. V. 19. P. 46–55.
- Ivanov A.I. Macrofungi in Penza Region (orders *Polyporales* s. str., *Boletales*, *Agaricales*, *Russulales* and an orders group *Gasteromycetes*). Cand. Biol. Thesis. SPb., 1983a (in Russ.).
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Part III. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1983b. V. 20. P. 76–83 (in Russ.).
- Ivanov A.I. *Gasteromycetes* of Penza Region. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1983c. V. 20. P. 83–84 (in Russ.).
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. Part IV. 1985a. V. 22. P. 117–119 (in Russ.).
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. Part V. 1986. V. 23. P. 129–131 (in Russ.).
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1 Part VI. 1988a. V. 25. P. 88–90 (in Russ.).
- Ivanov A.I. New for science and mycoflora of the USSR species and forms of the genus *Cortinarius* from the Penza region. Mikologiya i fitopatologiya. 1988b. V. 6 (22). P. 489–492 (in Russ.).
- Ivanov A.I. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Part VII. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1989. V. 26. S. 63–64 (in Russ.).
- Ivanov A.I. Biota of macromycetes of the forest-steppe of the Right-Bank Volga region. Dr. Sci. Thesis Moscow, 1992a (in Russ.).
- Ivanov A.I. Rare species of agaric fungi in the Penza region. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1992b. V. 28. P. 57–61 (in Russ.).
- Ivanov A.I. *Agaricomycetes* of the Volga Upland. Order *Boletales*. Penza, 2014 (in Russ.).
- Ivanov A.I. The impact of solar magnetic activity cycles and weather condition on the abundance and diversity of *Agaricomycetes* in nature communities in the Penza region. Mikologiya i fitopatologiya. 2016. V. 50 (4). P. 219–229 (in Russ.).
- Ivanov A.I. Problems of intraspecific systematics of *Agaricomycetes*. In: Proceedings of the VIII All-Russian mycological school-conference with international participation “The species concept in fungi: a new look at old problems”. Collection of reports and abstracts. Moscow, 2017, pp. 73–78 (in Russ.).
- Ivanov A.I. Champignons (the genus *Agaricus* L.) in Russia. Species composition, ecology, cultivation. Penza, 2018 (in Russ.).
- Ivanov A.I., Chernyshov N.V., Kuzin E.N. Nature conditions of the Penza Region. The current state. V. 1. Geological environment, relief, climate, surface, water, soil, vegetation. Penza, 2017b (in Russ.).
- Ivanov A.I., Nezdoinogo E.L. On the flora of agaric mushrooms of the Penza region. Part VIII. Novosti sistematiki nizshikh rasteniy. 1990. V. 27. P. 63–66 (in Russ.).
- Ivovlov A.V., Bolshakov S.Yu., Silaeva T.B. Study of species diversity of macromycetes. Mordovia State University, Saransk, 2017 (in Russ.).
- Janda V., Kříž M. *Rubroboletus satanas* f. *crataegi*, validly published name for xanthoid form of *Rubroboletus satanas*. Czech Mycol. 2016. V. 68. No 1. P. 109–110 (in Russ.).
- Janda V., Kříž M., Konvalinkova T., Borovicka J. Macroscopic variability of *Rubroboletus legaliae* with special regard to *Boletus spinarii*. Czech Mycol. 2017. V. 69 (1). P. 31–50.
- Kalamees K. Riisikad. The genus *Lactarius* in Estonia, Tartu, 2011.
- Kalamees K., Liiv V. Heinikud. The genus *Tricholoma* in Estonia. Tartu, 2019.
- Kalamees K.A., Ivanov A.I. *Lepista saeva* var. *anserina* (Fr.) Kalamees et A.I. Ivanov. Folia cryptog. Estonica. 1992. V. 30. P. 29.
- Kalinina L.B. Agaricoid fungi of broad-leaved forests of the North-West of the European part of Russia (Leningrad, Novgorod and Pskov Regions). Cand. Biol. Thesis. SPb., 2021 (in Russ.).
- Knudsen H., Vesterholt J. (eds). Funga Nordica. Nordsvamp, Copenhagen, 2012.
- Kovalenko A.E. The order *Hygrophorales*. Definitorium fungorum USSR. Nauka, Leningrad, 1989 (in Russ.).
- Leonova N.A., Kulakova D.A., Artemova S.N. The vegetation cover of the upper plateau of the Volga upland terrain within the Penza region. Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. 2013. (1). P. 72–81 (in Russ.).
- Munož J.A. *Boletus* s.l. (excl. *Xerocomus*) Fungi Europaei 2. Copenhagen, 2005.
- Nezdoinogo E.L. Order *Agaricales*. Familia *Cortinariaceae*. Issue. 1. Definitorium fungorum Rossiae. Nauka, SPb., 1996 (in Russ.).
- Red data book of the Penza Region. T. 1. Penza, 2013 (in Russ.).
- Shaporova YA.A. Russulaceous fungi of Belarus: *Lactarius* and *Russula*. Nauka, Minsk, 2007. (in Russ.).
- Šutara J. Anatomical structure of pores in European species of genera *Boletus* s.str. and *Butyriboletus* (*Boletaceae*). Czech Mycol. 2014. V. 66 (2). P. 157–170.
- Wasser S.P. *Agaricales* of the USSR. Nauk. Dumka, Kiev, 1985 (in Russ.). Васець С.П. (Вассер) Агариковые грибы СССР. Киев: Наук. думка, 1985. 184 с.
- Иванов А.И. (Иванов) К флоре агариковых грибов Пензенской области Ч. 1 // Новости систематики низших растений. 1981. Т. 18. С. 86–93.

- Иванов А.И. (Ivanov)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. II // Новости систематики низших растений. 1982. Т. 19. С. 49–55.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Гастеромицеты Пензенской области // Новости систематики низших растений. 1983. Т. 20. С. 83–84.
- Иванов А.И. (Ivanov)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. III // Новости систематики низших растений. 1983. Т. 20. С. 76–83.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Макромицеты Пензенской области (порядки Polyporales s.str., Boletales, Agaricales, Russulales и группа порядков Gasteromycetes). Автореферат диссертации ... канд. биол. наук. СПб., 1983. 22 с.
- Иванов А.И. (Ivanov)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. IV // Новости систематики низших растений. 1985. Т. 22. С. 117–119.
- Иванов А.И. (Ivanov)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. V // Новости систематики низших растений. 1986. Т. 23. С. 129–131.
- Иванов А.И. (Ivanov)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. VI // Новости систематики низших растений. 1988. Т. 25. С. 88–90.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Новые для науки и микофлоры СССР виды и формы рода *Cortinarius* из Пензенской области // Микология и фитопатология. 1988. Т. 6. № 22. С. 489–492.
- Иванов А.И. (Ivanov)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. VII // Новости систематики низших растений. 1989. Т. 26. С. 63–64.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Биота макромицетов лесостепи правобережного Поволжья. Дисс. ... докт. биол. наук. Москва, 1992. 293 с.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Редкие виды агариковых грибов в Пензенской области // Новости систематики низших растений. 1992. Т. 28. С. 57–61.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Агарикомицеты Приволжской возвышенности. Порядок Boletales. Пенза: РИО ПГСХА, 2014. 178 с.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Влияние солнечной активности и погодных условий на обилие и разнообразие агарикомицетов (*Agaricomycetes*) в природных сообществах Пензенской области // Микология и фитопатология. 2016. Т. 50. № 4. С. 219–229.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Проблемы внутривидовой систематики агарикомицетов (*Agaricomycetes*) // Материалы VIII Всероссийской микологической школы-конференции с международным участием “Концепции вида у грибов: новый взгляд на старые проблемы”. Сб. докладов и тезисов. Москва, 2017. С. 73–78.
- Иванов А.И. (Ivanov)* Шампиньоны России (род *Agaricus* L.). Видовой состав, экология, культивирование. Пенза: РИО ПГАУ, 2018. 200 с.
- Иванов А.И., Нездоймино Э.Л. (Ivanov, Nezdoymino)* К флоре агариковых грибов Пензенской области. Ч. VIII // Новости систематики низших растений. 1990. Т. 27. С. 63–66.
- Иванов А.И., Чернышов Н.В., Кузин Е.Н. (Ivanov et al.)* Природные условия Пензенской области. Современное состояние. Т. 1. Геологическая среда, рельеф, климат, поверхностные воды, почвы, растительный покров. Пенза: РИО ПГСХА, 2017. 236 с.
- Ивойлов А.В., Большаков С.Ю., Силаева Т.Б. (Ivailov et al.)* Изучение видового разнообразия макромицетов. Учебное пособие. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2017. 160 с.
- Калинина Л.Б. (Kalinina)* Агарикоидные грибы широколиственных лесов Северо-Запада европейской части России (Ленинградская, Новгородская и Псковская области). Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. СПб., 2021. 26 с.
- Коваленко А.Е. (Kovalenko)* Порядок Hygrophorales. Определитель грибов СССР. Л.: Наука, 1989. 175 с.
- Красная книга Пензенской области (Red data Book). Том 1. Грибы, лишайники, мхи, сосудистые растения. Пенза, 2013. 226 с.
- Леонова Н.А., Кулакова Д.А., Артемова С.Н. (Leonova et al.)* Растительный покров ландшафтов Верхнего плато Приволжской возвышенности в пределах Пензенской области // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2013. № 1 (1). С. 72–81.
- Нездоймино Э.Л. (Nezdoymino)* Определитель грибов России. Порядок агариковые. Вып. 1. Семейство паутинниковые. СПб.: Наука, 1996. 408 с.
- Шапорова, Я.А. (Shapорова)* Русслыльные грибы Беларуси: *Lactarius* и *Russula* (млечники и сыроежки). Минск: Беларус. наука, 2007. 275 с.

New Data on Agaricoid and Gasteroid *Agaricomycetes* in Penza Region (Russia)

A. I. Ivanov^{a,#}, A. A. Ermolaeva^{a,##}, and A. A. Mironova^{b,###}

^aPenza Agricultural Academy, Penza, Russia

^bPenza state University, Penza, Russia

[#]e-mail: rcgekim@mail.ru

^{##}e-mail: ermolaeva7733@yandex.ru

^{###}e-mail: mironovaanna20@gmail.com

The study of agaricoid and gasteroid fungi belonging to the class *Agaricomycetes* in the Penza region has been carried out beginning with 1976. Due to significant changes in the taxonomy of this group in recent decades, it became necessary to revise the materials accumulated over a 46-year research period. As a result of such a revision, it was found that in the territory of the Penza region, were recorded 837 species of agaricoid and gasteroid fungi

of the class *Agaricomycetes*. They belong to 8 orders, 39 families and 137 genera. The largest families, including more than 50 species, are *Agaricaceae*, *Cortinariaceae*, *Psathyrellaceae*, *Russulaceae*, *Strophariaceae*, *Tricholomataceae*, from 20 to 50 species – *Boletaceae*, *Bolbitiaceae*, *Crepidotaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Marasmiaceae*, and *Mycenaceae*. The remaining families include less than 20 species each. The first place in terms of species richness is occupied by the genus *Cortinarius* (109 species), the second by the genus *Russula* (60 species). The genera uniting from 30 to 60 species are *Inocybe* and *Mycena*, from 20 to 30 species – *Agaricus*, *Entoloma*, *Lactarius*, *Lepiota*, *Psathyrella*, and *Tricholoma*, from 10 to 20 species – *Amanita*, *Clitocybe*, *Conocybe*, *Coprinopsis*, *Galerina*, *Hebeloma*, *Hygrocybe*, *Hygrophorus*, *Marasmius*, *Melanoleuca*, *Panaeolus*, *Pholiota*. The remaining genera are characterized by lower species richness levels, although they make up 82% of the total species number. Of these, 41 genera include only one species. In the course of research carried out from 2018 to 2022, a total of 27 species of *Agaricomycetes* new to the region were found. Three of them, *Russula groenlandica*, *R. insignis*, and *R. melzeri*, were noted in Russia for the first time. At the same time, 20 previously discovered species were not confirmed as a result of our revision. During observations from 1976 to 2022, it was found that the number of some species of fungi in the group under consideration is not constant and is subject to changes in the long-term regime. For example, in *Agaricus xanthodermus*, *Caloboletus radicans*, *Infundibulicybe geotropa*, *Lactarius semisanguifluus*, *Lepista personata*, *Mutinus ravenellii* and *Rubinoboletus rubinus*, this number increases, whereas in *Floccularia luteovirens*, *Lactarius turpis*, *Leucopaxillus tricolor*, *Russula chloroides*, and *Tylopilus felleus*, on the contrary, it tends to decrease.

Keywords: fluctuations, mycobiota, rare species, red data lists, species richness, taxonomic structure

БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА,
ЭКОЛОГИЯ

УДК 631.466.1: 574.47: 582.28: 571.64

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ
НА ДРЕВЕСИНЕ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОСТРОВА ХЕЙСА
(АРХИПЕЛАГ ЗЕМЛЯ ФРАНЦА-ИОСИФА)

© 2023 г. И. Г. Панькова^{1,*}, И. Ю. Кирцидели^{1,**}, В. А. Ильюшин^{1,***}, М. С. Зеленская^{2,****},
Д. Ю. Власов^{1,2,*****}, М. В. Гаврило^{3,4,*****}, Е. П. Баранцевич^{5,*****}

¹Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197022 Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

³Арктический и Антарктический научно-исследовательский институт, 198397 Санкт-Петербург, Россия

⁴Ассоциация “Морское наследие: исследуем и сохраним”, 198397 Санкт-Петербург, Россия

⁵Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197341 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: inna2008@nextmail.ru

**e-mail: microfungi@mail.ru

***e-mail: ilva94@yandex.ru

****e-mail: marsz@yandex.ru

*****e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

*****e-mail: m_gavrilo@mail.ru

*****e-mail: lenabara2003@inbox.ru

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 04.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Материалом для исследования послужили образцы древесины, которые были собраны в летний период 2021 г. на побережье о. Хейса (архипелаг Земля Франца-Иосифа) в Северном Ледовитом океане. Древесина была принесена морем (“плавник”) и находилась на берегу на разном удалении от линии воды или имела антропогенное происхождение и являлась частью заброшенных строений. В результате исследований выявлены комплексы микроскопических грибов на древесине хвойных и лиственных пород. Идентифицировано 30 видов микроскопических грибов, преимущественно из отдела *Ascomycota*. Виды рода *Cadophora* отмечены в наибольшем числе исследованных образцов. Показатели видового разнообразия и встречаемости представителей отдела *Basidiomycota* оказались крайне низкими. Виды дрожжевых и дрожжеподобных грибов (аско- и базидиомицеты) составили 23% от общего числа выделенных видов. Всего на образцах древесины, имеющей антропогенное происхождение, было отмечено 25 видов, а на образцах древесины плавника — 12 видов. При исследовании ферментативной активности микроскопических грибов показано, что лигнинолитическая активность отмечена у 50% исследуемых штаммов, амилазная — у 62%, а целлюлозолитическая — у 85% исследованных штаммов. Выделена группа психротрофных видов, обладающих высокой лигнинолитической активностью в совокупности с целлюлозолитической и амилазной активностью, и являющихся хорошо адаптированными к разложению древесного субстрата в экстремальных условиях Арктики. Проявление ферментативной активности во многих случаях различается у штаммов одного вида.

Ключевые слова: Арктика, вторично-водные грибы, древесина, микробные сообщества, микроскопические грибы, плавник, ферментативная активность

DOI: 10.31857/S0026364823030091, **EDN:** VCTKRY

ВВЕДЕНИЕ

Высокая метаболическая пластичность и морфологическое разнообразие грибов позволили им освоить многочисленные местообитания в наземной и водной средах. В первую очередь это относится к микроскопическим грибам. Перестройка их метаболических процессов способствует адап-

тации к меняющимся условиям окружающей среды (Sprenger et al., 2018; Sazanova et al., 2019; Naranjo-Ortiz, Gabaldón, 2019), в том числе в полярных экосистемах, где микромицеты колонизируют как природные, так и антропогенные субстраты. В высоких широтах появление древесных субстратов связано либо с деятельностью человека, либо с на-

коплением привнесенной морем древесины (плавник) в прибрежной зоне (Blanchette et al., 2004; Kirtsideli et al., 2018).

Процессы деструкции древесины микроскопическими грибами в высоких широтах стали активно изучаться учеными в последние десятилетия. В ряде работ (Blanchette et al., 2004; Held et al., 2005, 2017) при исследовании деструкции антропогенной древесины в Антарктике выделили виды родов *Cladosporium*, *Hormonema*, *Penicillium* и *Lecythyphora* и ряд видов рода *Cadophora* (*C. malorum*, *C. luteo-olivacea*, *C. fastigiata*). Вид *Hypochniciellum molle* (*Amylocorticium molle*) был выделен из образцов антропогенной древесины в Арктике (арх. Шпицберген) и в Антарктике (Arenz et al., 2009; Mattsson et al., 2010). Виды этого рода известны как грибы, вызывающие бурую гниль древесины. С деловой древесины хижин Пирии из Форта Конгер (Blanchette et al., 2021) были выделены виды родов *Coniochaeta*, *Phoma*, *Cadophora*, *Graphium* и *Penicillium*. Виды других родов, таких как *Alternaria*, *Cosmospora*, *Phialophora*, *Sydowia* и *Valsa*, встречались с меньшей частотой.

При исследовании археологических объектов из древесины в Гренландии (Pedersen et al., 2020) отмечено, что представители отдела *Ascomycota* являются преобладающей группой грибов на древесных субстратах. По числу полученных изолятов доминирующим является род *Cadophora*. Виды родов *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Lecythyphora*, *Leptodontidium* и *Phialophora* были обнаружены в меньшем количестве. Единичными находками отмечены виды родов *Penicillium*, *Patinella*, *Xenoplyscytalum*, *Pseudeurotium* и *Phialemonium*. Кроме того, были отмечены единичные изоляты грибов из отдела *Basidiomycota*, причем большинство выявленных видов было обнаружено впервые на древесном субстрате в Арктике.

Следует отметить, что при изучении микроскопических грибов на плавнике в Арктике к числу наиболее распространенных на данном субстрате отнесены представители родов *Cadophora*, *Lecythyphora* и *Penicillium* (Blanchette et al., 2016). Вид *Tolyposcladium cylindrosporium* наиболее часто отмечался в исследованиях древесины плавника вдоль побережья Норвегии (Terro et al., 2013).

Немало работ посвящено исследованиям происхождения древесины на побережье островов арктического региона (Karvinen et al., 2006; Hellman et al., 2013, 2015, 2016, 2017; Linderholm et al., 2021). Древесина плавника происходит в основном из бореальной зоны и попадает в Северный Ледовитый океан из рек, по которым происходит сплав древесины (Dyke et al., 1997). В ряде исследований (Eggertsson et al., 1994; Hellmann et al., 2017) указывается, что древесина на северном побережье Шпицбергена происходит из северной части России, а большинство изученных образцов древесины имеют следы лесозаготовок. Большин-

ство пород древесины плавника — сосна и лиственница, которые сплавлялись по реке Енисей, а также ель, попавшая в арктические моря из рек Двина и Печора (Peterson et al., 2002; Hellman et al., 2016). При исследовании происхождения привнесенной древесины на побережье Исландии, было показано — плавник здесь представлен в основном сибирской лиственницей (Chuchala et al., 2021).

Появление известных наземных грибов в морской воде отмечалось широким кругом исследователей (Kirtsideli et al., 2012; Kejžareta, 2015; Rama et al., 2014, 2017; Gunde-Cimerman et al., 2018). Формирование комплексов микроскопических грибов может происходить как за счет видов, встречающихся на древесине в материковой зоне, так и морских и вторично-водных видов (Kirtsideli et al., 2021). В работе (Richards et al., 2012) показано, что переход к морскому существованию у микроскопических грибов из наземных местообитаний происходит сравнительно часто, как и обратный процесс.

Целью данной работы было исследование микроскопических грибов на древесине о. Хейса (архипелаг Земля Франца-Иосифа), проведение сравнительного анализа видового состава микроскопических грибов на плавнике и антропогенно привнесенной древесине (находящейся в условиях Арктики в течение длительного времени), а также оценка ферментативной активности выявленных микромицетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы древесины для микологического анализа отбирали на побережье о. Хейса (архипелаг ЗФИ) в Северном Ледовитом океане (80°27' с.ш., 58°03' в.д.) в июне—июле 2021 г. о. Хейса представляет собой останцы почти горизонтального базальтового плато, расчлененного тектоническими разломами. Мощность четвертичных отложений не превышает нескольких метров. Современные донные осадки имеют преимущественно алевропелитовый состав. Характеристика вещественного состава донных отложений сильно зависит от состава пород, лежащих под четвертичными осадками (Govorukha, 1968). о. Хейса имеет размеры примерно 10 × 15 км. Рельеф его слегка холмистый с обрывистыми и плавными спусками. Грунты проморожены вечной мерзлотой. Активный слой составляет не более 30 см. Растительность острова расположена пятнами, преимущественно на южных склонах холмов, где преобладают мхи и лишайники. Температура воздуха редко поднимается выше 0°C градусов. Самый теплый месяц — июль со среднемесячной температурой воздуха 0.2°C. Самый холодный месяц — март (среднемесячная температура — -24.4°C). Среднегодовая температура воздуха составляет -12.7°C, а относи-

тельная влажность воздуха — 88%. За год выпадает 304 мм осадков.

В пределах архипелага смешиваются холодные воды арктического происхождения, местные распресненные воды, образующие тонкий поверхностный слой в проливах, а также сравнительно теплые морские воды, характеризующиеся высокой соленостью (до 35‰) (Govorukha, 1968, 1970; Dryupin, 2004; Chilingarov, 2009).

Архипелаг ЗФИ относится к зоне полярных пустынь (Aleksandrova, 1977), а древесина на данной территории может иметь антропогенное происхождение или привнесена морем. В исследование были включены образцы плавника, которые имели признаки недавнего пребывания в морской воде (наличие морских водорослей и животных), а также антропогенно-привнесенная древесина, используемая в постройках.

Фрагменты древесины были помещены в стерильные контейнеры и хранились при температуре 4°C. Размер одного образца, как правило, составлял 10–20 см³.

Определение пород древесины проводилось с.н.с. сектора Химико-биологических исследований Государственного Русского музея Н.Г. Соловьевой на основе анализа микроструктурных признаков внутреннего строения древесины (Yatsenko-Khmelevskiy, 1954; Kolosova, Solovyeva, 2013).

Каждый образец был разделен на несколько мелких фрагментов, которые были помещены на поверхность питательной среды (прямой посев). Использовали следующие питательные среды: агар Чапека¹, сусло-агар, среда Гетчинсона² с целлюлозой и добавлением NaCl (5%).

Для подавления роста бактерий использовали антибиотик левомецетин (25 мг/л). Инкубацию полученных изолятов проводили в темноте при температуре 4–5° и 20°C. Чистые культуры были идентифицированы на основании культурально-морфологических признаков (Methods..., 1982; Rapar, Thom, 1949; Domsch et al., 2007 и др.) и результатов молекулярных исследований. Культуры, используемые для молекулярных исследований, выращивали на среде Чапека при 20°C в течение 14 дней. ДНК из чистых культур грибов выделяли с использованием коммерческого набора Diamond DNA Plant kit (ABT, Барнаул, Россия), согласно инструкции изготовителя. В качестве филогенетического маркера была использована последовательность региона ITS (White et al., 1990). Последовательность ITS1–5.8S–ITS2 амплифицировали с использованием праймеров ITS1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-TGC-GG-3') и ITS4 (5'-TCC-TCC-

GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'). По окончании амплификации проводили детекцию образцов электрофоретическим методом в 1.5%-м агарозном геле с GelRed. Секвенирование полученных фрагментов ДНК проводили в BioBeagle (Санкт-Петербург, Россия) методом Сэнгера. Последовательности были проверены и выровнены с использованием программы BioEdit версии 7.1.9. Анализировали данные с помощью программы поиска BLAST в GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для универсального региона ITS были выбраны критерии идентичности, предложенные Годиной с соавторами (Godinho et al., 2013). Если идентичность последовательности региона ITS составляла ≥98%, то считали, что изолят принадлежит данному виду, а если была между 95 и 97%, то считали, что изолят принадлежит данному роду.

Названия и положение таксонов микроскопических грибов унифицировали с использованием базы данных Index Fungorum (2022).

Для исследования особенностей распределения грибов и других микроорганизмов на образцах древесины использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Материал предварительно просматривали в стереомикроскопе марки Leica. Материалом для СЭМ-исследования служили небольшие фрагменты древесины с признаками развития мицелия и колоний грибов. Образцы готовили для СЭМ-исследования по специальной методике, включающей проводку по спиртам. Далее эти образцы закрепляли на алюминиевых пластинах при помощи углеродного скотча и напыляли углеродом (~15 нм). Образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM3000 в “Ресурсном центре микроскопии и микроанализа: СПбГУ. Диапазон увеличения при просмотре образцов варьировался от ×100 до ×1000.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистических программ EstimateS9.10, MS Excel 2007 и Statistica 10.0.

Для оценки ожидаемого числа видов в области исследования мы использовали подход, основанный на алгоритме генерации выборки (Colwell et al., 2012). В основе этого подхода лежит конструирование кривой разрежения (rarefaction curve) с помощью специального алгоритма случайной многократной перестановки данных в пределах выборок из числа обнаруженных изолятов. Данная кривая является функцией математического ожидания видовой насыщенности $S(N)$ при увеличении численности сообщества. Разрежение дает возможность найти предполагаемое число видов для любой промежуточной совокупности из N особей, считая ее случайной и независимой выборкой из всей генеральной совокупности. Эмпирические данные о числе видов при построении этой кривой сглаживаются параметрической мо-

¹ Среда Чапека (г/л): сахароза — 30; NaNO₃ — 3.0; K₂HPO₄ — 1; MgSO₄ — 0.5; KCl — 0.5; FeSO₄ — 0.01; агар — 15.

² Среда Гетчинсона (г/л): K₂HPO₄ — 1; CaCl₂ — 0.1; MgSO₄ — 0.3; NaCl — 0.1; FeCl₃ — следы; NaNO₃ — 2.5; агар — 20, обеззоленный целлюлозный фильтр.



Рис. 1. Географическое положение района исследований.

дельной зависимостью с последующей экстраполяцией к некоторой асимптоте “насыщения” (Shitikov et al., 2011).

Для расчета ожидаемого числа видов в генеральной совокупности, из которой была сделана выборка, использовался скорректированный индекс Chao1 (индекс с поправкой на смещение), который рассчитывали на основе регистрации количества видов, представленных одним изолятом. Для этого расчета использовали некоммерческую программу EstimateS 9.10 (Colwell et al., 2012).

Анализ ферментативной активности изолятов проводили на основе оценки их способности к лигнинолитической, амилазной и целлюлозолитической активности. Наличие лигнинолитических ферментов определяли путем быстрого скрининга по интенсивности появления окрашивания при росте культур на среде с танином. Контролем служила среда без танина.

Наличие амилазной активности изолятов определяли на среде, содержащей 0.5% крахмала в качестве единственного источника углерода, по зонам гидролиза крахмала после нанесения на поверхность среды р-ра, содержащего 0.5% (w/v) I_2 (Methods., 1982).

Активность целлюлозолитических ферментов у полученных изолятов определяли с использованием микрокристаллической целлюлозы (1.0%-я КМЦ и 1.0%-й агар “Дифко”) аппликационным методом. Оценивалось наличие светлой зоны через 48 ч после инокуляции с использованием раствора I_2 в KI (0.5% I в 2% KI) (Klán, Baudišová, 1990; Shakhova, Volobuev, 2020).

Для оценки активности ферментов проводили расчет по следующей формуле: $K = D_c/D_z$, где D_c — диаметр колонии, мм; D_z — диаметр зоны просветления, мм (Krishnan et al., 2018). Этот метод расчета ранее использовали для определения амилазной и целлюлозолитической активности у микроскопических грибов родов *Cosmospora* sp., *Pseudogymnoascus* sp., *Penicillium* sp., *Umbelopsis* sp.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование сканирующей электронной микроскопии позволило установить, что развитие микроскопических грибов происходит как в поверхностных, так и в глубинных слоях древесины (рис. 2). Использование данного метода не только позволило наглядно показать активное развитие микромицетов на древесине в условиях высокой Арктики, но и подтвердить наличие конидиального спороношения грибов на данном субстрате.

В результате культурально-морфологических исследований было получено около 1000 колоний микроскопических грибов, выделено более 100 типовых изолятов, которые были идентифицированы как 30 видов микроскопических грибов.

Отдел *Mucoromycota* представлен только одним видом, который был отмечен единичной находкой на антропогенно-привнесенной древесине, что возможно связано с вторичной антропогенной контаминацией древесного субстрата.

Отдел *Basidiomycota* оказался представлен тремя видами грибов, что согласуется с литературными данными о низкой встречаемости базидиомицетов в полярных экосистемах (Tosi et al., 2002;

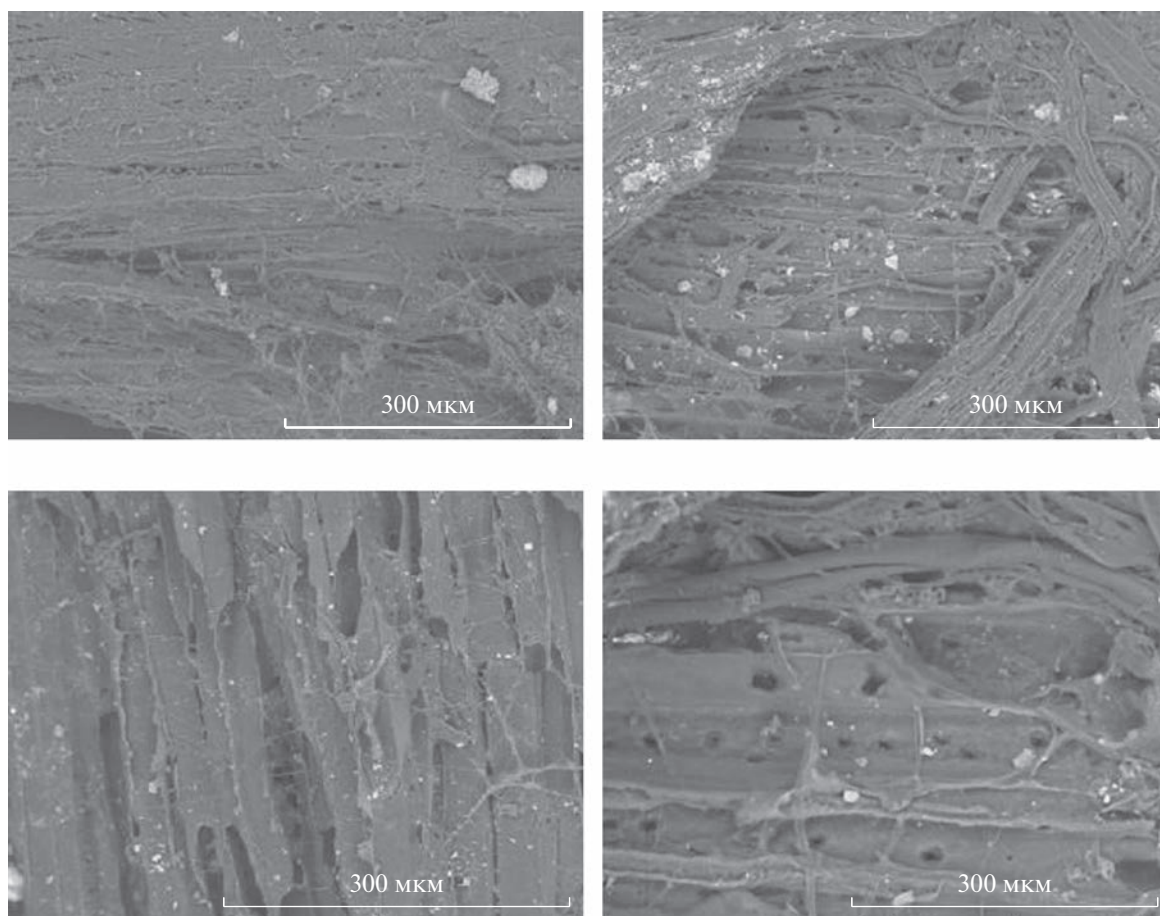


Рис. 2. Развитие микроскопических грибов на поверхности древесины.

Connell et al., 2006; Malosso et al., 2006; Ludley, Robinson, 2008; Blanchette et al., 2010; Arenz, Blanchette, 2011; Arenz et al., 2014). Виды *Goffeauzyma gilvescens*, *Cystobasidium ongulense* и *Rhodotorula mucilaginosa* представляли собой дрожжевые формы грибов с базидиомицетным аффинитетом. Стоит отметить, что вид *Cystobasidium ongulense* был выделен из антарктических местообитаний и описан в 2017 г. (Tsuji et al., 2017), а вид *Goffeauzyma gilvescens* отмечался ранее с высокой встречаемостью в Арктике и в Антарктике (Białkowska et al., 2017; Nikitin, Semenov, 2022).

Основное место в микобиоте древесных субстратов занимали представители *Ascomycota* (26 видов). Среди них отмечены дрожжеподобные грибы *Exophiala xenobiotica*, *Phaeococcomyces* sp., “fungal sp.” (наиболее близкий по молекулярным данным к виду *Neocelosporium eucalypti*), *Sydowia polyspora* (табл. 1). *Phaeococcomyces* sp. был широко приставлен на антропогенно-привнесенной древесине, но не отмечался на плавнике. Отметим, что *Neocelosporium eucalypti* был описан сравнительно недавно (Crous et al., 2018).

Интересно отметить, что практически 25% выделенных видов были представлены дрожжевыми

и дрожжеподобными формами, что весьма характерно для арктических и антарктических местообитаний (Guamán-Burneo et al., 2015; Perini et al., 2019; Rovati et al., 2013; Troncoso et al., 2017). На разных стадиях гниения древесины меняется состав этих грибов (Gonzalez et al., 1989). Дрожжи, колонизирующие разлагающуюся древесину, усваивают моносахариды, образующиеся в результате деполимеризации полисахаридов (Cadete et al., 2017). Лигниновый компонент древесины наиболее устойчив к биоразложению, однако известны дрожжевые грибы, способные его метаболизировать (Sampaio, 1999). При этом дрожжи способны создавать благоприятную среду для других микроорганизмов, разлагающих древесину.

Наиболее высокой была доля микромицетов из родов *Cadophora* (*C. luteo-olivacea*, *C. fastigiata*, *C. melinii*). Наибольшая встречаемость отмечена для *C. melinii*, как на плавнике, так и на антропогенно-привнесенной древесине. Род *Cadophora* был обнаружен в морской среде сравнительно недавно (Gunde-Cimerman et al., 2005; Burgaud et al., 2009; Almeida et al., 2010), однако более ранние находки рода *Phialophora* могут рассматриваться как возможные представители рода *Cadophora* (из-за

Таблица 1. Микромицеты на древесном субстрате с о. Хейса и их распределение по породам древесины

№ в Генбанке	Название вида	Антропогенно-привнесенная древесина	Плавник
	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	сосна	—
	<i>Acremonium</i> sp.	сосна	—
OP961963	<i>Exophiala xenobiotica</i> de Hoog, J.S. Zeng, Harrak et Deanna A. Sutton	ель, сосна	—
OP961971	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. et McNew	ель, сосна	—
OP961972			
OP961973			
OP961974			
OP961976	<i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. et Melin	сосна	—
OP961975	<i>Cadophora melinii</i> Nannf.	ель, сосна	ива
OP961970	<i>Cephalotrichum nanum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	сосна	—
	<i>Coniochaeta hoffmannii</i> (J.F.H. Beyma) Z.U. Khan, Gené et Guarro	ель, сосна	ель
	<i>Coniothyrium</i> sp.	сосна	ель
OP961962	<i>Cystobasidium ongulense</i> M. Tsuji, Tsujimoto et S. Imura	сосна	—
	<i>Didymella pomorum</i> (Thüm.) Qian Chen et L. Cai	ель, сосна	ель
OP961959	Fungal sp. (сходство по ITS с <i>Neocelosporium eucalypti</i> Crous 88%)	сосна	—
OP961961	<i>Goffeauzyma gilvescens</i> (Chernov et Babeva) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. et Boekhout	ель, сосна	ель, ива
OP961960			
OP961968	<i>Hormodendrum</i> sp.	ель	—
OP961977	<i>Leptosphaeria sclerotioides</i> (Preuss ex Sacc.) Gruyter, Aveskamp et Verkley	—С	ель
	<i>Mucor</i> sp.	сосна	—
OP961964	<i>Ochrocladosporium frigidarii</i> Crous et U. Braun	ель	—
		сосна	
OP961978	<i>Paraphoma fimeti</i> (Brunaud) Gruyter, Aveskamp et Verkley	сосна	—
	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	—	ель
	<i>Penicillium lividum</i> Westling	сосна	—
OP961979	<i>Phaeococcomyces</i> sp.	сосна	—
OP961967	<i>Phoma herbarum</i> Westend.	ель, сосна	—
	<i>Phoma</i> sp.	—	ель
OP961980	<i>Phialemonium atrogriseum</i> (Panas.) Dania García, Perdomo, Gené, Cano et Guarro	сосна	—
OP961969	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis et D.L. Lindner	ель, сосна	ель, ива
OP961981	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A. Jörg.) F.C. Harrison	ель, сосна	ель, ива
	<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	—	ива
OP961982	<i>Sydowia polyspora</i> (Bref. et Tavel) E. Müll.	сосна	—
OP961966	<i>Xenopolyscytalum pinea</i> Crous	сосна	
OP961965	<i>Xenopolyscytalum</i> sp.	—	ель
	Всего	25 видов	12 видов

номенклатурных изменений) (Gams, 2000). Накопленные данные указывают на то, что грибы рода *Cadophora* скорее являются аборигенными видами в полярных экосистемах и способны колонизировать различные субстраты.

В изученных пробах постоянно присутствовал аскомицет *Pseudogymnoascus pannorum*, который

относится к типичным обитателям почв и природных субстратов в зонах полярных пустынь и арктических тундр (Kirtsideli et al., 2015, 2016, 2020). *P. pannorum* был отмечен как на антропогенно привнесенной древесине, так и в древесине плавника.

Интересно отметить, что род *Penicillium* был представлен только 2 видами (*Penicillium citrinum*

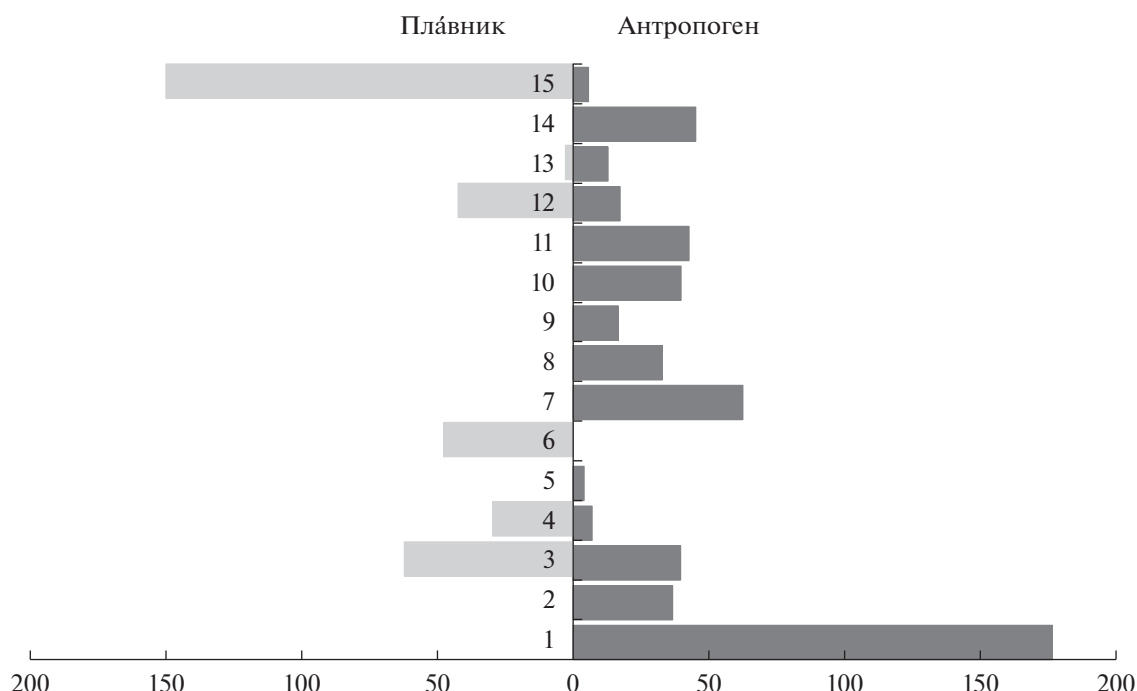


Рис. 3. График рангового распределения микроскопических грибов в изученных образцах древесины I — Антропогенно-привнесенная древесина; II — древесина плавника. По горизонтали — число изолятов. По вертикали ранжированы виды микроскопических грибов: 1 — *Exophiala xenobiotica*; 2 — *Cadophora luteo-olivacea*; 3 — *Cadophora melinii*; 4 — *Goffeauzyma gilvescens*; 5 — *Hormodendrum* sp.; 6 — *Leptosphaeria sclerotioides*; 7 — *Ochrocladosporium frigidarii*; 8 — *Paraphoma fimeti*; 9 — *Penicillium lividum*; 10 — *Phaeococcomyces* sp.; 11 — *Phoma herbarum*; 12 — *Pseudogymnoascus pannorum*; 13 — *Rhodotorula mucilaginosa*; 14 — *Sydowia polyspora*; 15 — *Xenopolyscytalum* sp.

на плавнике и *P. lividum* на антропогенно-привнесенной древесине). Род *Penicillium*, как правило, доминирует в почвах тундровой зоны и средних широт, но его встречаемость резко снижается в зоне полярных пустынь.

Представители рода *Alternaria* были отмечены единичными находками исключительно на образцах антропогенно привнесенной древесины. Виды *Ochrocladosporium frigidarii*, *Paraphoma fimeti*, *Phoma herbarum* отмечены с высокой встречаемостью на образцах антропогенно привнесенной древесины. Виды *Leptosphaeria sclerotioides* и *Xenopolyscytalum* sp. отмечали преимущественно на древесине плавника. Распределение основных групп микроскопических грибов на древесине острова Хейса представлено на рис. 3.

Всего на образцах антропогенно привнесенной древесины было выявлено 25 видов микромицетов, а на древесине плавника — 12 видов. Общими оказались всего 7 видов грибов, что свидетельствует о различных путях формирования комплексов микромицетов на древесном субстрате, имеющем различное происхождение.

По максимальному среднему значению индекса Chao1, рассчитанному для кривой накопления видов (рис. 4), нами выявлены практически все ожидаемые виды, обитающие на древесине плавника (I) ($Chao1 = 13.0 \pm 2.27$; 12 видов). В меньшей

степени выявлен видовой состав грибов для антропогенно-привнесенной древесины (II) ($Chao1 = 34.48 \pm 9.57$; 25 видов).

При изучении микроскопических грибов, разрушающих древесину различного происхождения, большой интерес представляет ферментативная активность, способствующая данному процессу. Важно учитывать, что относительное количество трех основных компонентов древесины (целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина) сильно различается у разных видов древесных растений (Henriksson et al., 2009; Stokland, 2012). Полученные нами результаты исследования ферментативной активности микроскопических грибов приведены в табл. 2 и на рис. 5 и 6.

В ходе проведенных нами экспериментов было обнаружено, что уровни ферментативной активности полученных изолятов незначительно изменяются с течением времени. Изучение лигнинолитической активности показало ее наличие у 16 изолятов (50%), однако существенных значений она достигала только у 11 из них (коэффициент ≥ 0.5), принадлежащих таким таксонам как *Hormodendrum* sp., *Pseudogymnoascus pannorum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Ochrocladosporium frigidarii*, *Phoma herbarum*, *Cadophora melinii*, *Xenopolyscytalum pinea* (указаны в порядке снижения ферментативной активности). Как правило, в комплексах поч-

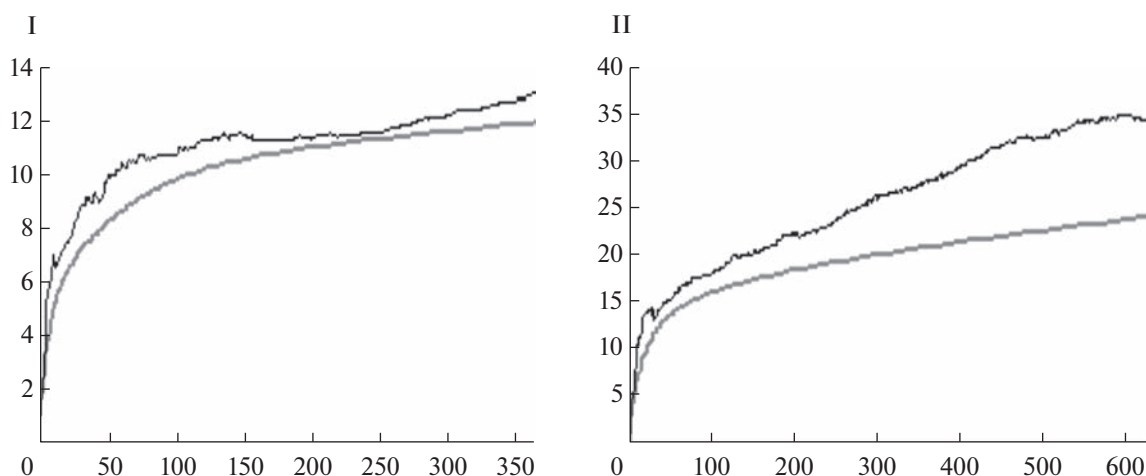


Рис. 4. Результаты бутстреп-анализа для оценки полноты выявления видов в зависимости от числа полученных изолятов. Тонкие линии показывают средние значения индекса Chao1 (ожидаемое число видов) по мере увеличения числа изолятов, сплошные линии — сглаженные кривые разрежения (individual-based rarefaction curves) в зависимости от числа выявленных изолятов. I — образцы древесины плавника; II — образцы антропогенно-привнесенной древесины (по горизонтали — число изолятов; по вертикали — число видов).

венных микромицетов высоких широт доля изолятов, обладающих лигнинолитической активностью, не превышает 15% (Kirtsideli et al., 2010, 2022). Стоит отметить, что различные изоляты одного вида показали разные уровни лигнинолитической активности. Так, у изолятов *Cadophora luteo-olivacea* (DI-116 и DI-138) значение коэффициентов лигнинолитической активности колебалось от 0.7 до 0.9 соответственно, а у изолятов *Ochro-*

cladosporium frigidarii (DI-103 и DI-203) от 0.3 до 0.6. У разных изолятов *Pseudogymnoascus pannorum* отмечали как сравнительно высокую способность к лигнинолитической активности, так и ее полное отсутствие.

Изучение амилазной активности исследуемых штаммов показало ее наличие у 20 штаммов (62%), однако существенных значений она достигала только у восьми из них (коэффициент ≥ 0.5): *Coniochaeta hoffmannii*, *Xenopolyscytalum* sp., *Hormodendrum* sp., *Cadophora melini*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Phoma herbarum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Ochrocladosporium frigidarii* (таксоны указаны в порядке снижения ферментативной активности). Стоит отметить, что различные изоляты одного вида также показали различные уровни амилазной активности.

Целлюлозолитическая активность проявлялась у микромицетов наиболее ярко (значения коэффициентов достигали наибольших показателей) и была отмечена у 27 штаммов (85%), однако существенных значений она достигала у 24 штаммов (коэффициент ≥ 1): *Alternaria alternata*, *Cephalotrichum nanum*, *Penicillium lividum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Acremonium* sp., *Goffeauzyma gilvescens*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Ochrocladosporium frigidarii*, *Phoma herbarum* и ряд других (виды указаны в порядке снижения ферментативной активности). Стоит отметить, что различные изоляты одного вида также показали разные уровни целлюлозолитической активности.

Из 32 исследованных изолятов только один изолят (*Phaeosaccotycus* sp.) показал полное отсутствие лигнинолитической, целлюлозолитической и амилазной активности, 10 изолятов (31%) показали положительную реакцию только в одном из

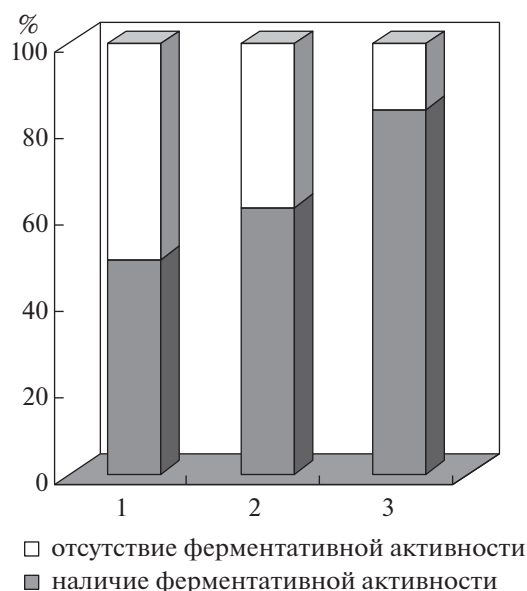


Рис. 5. Проявление ферментативной активности у исследованных штаммов грибов (% от общего количества исследованных штаммов): 1 — лигнинолитическая активность; 2 — амилазная активность; 3 — целлюлозолитическая активность.

Таблица 2. Результаты экспресс-тестов по выявлению лигнинолитической, амилазной и целлюлозолитической активности микромицетов, выделенных из древесины на о. Хейса

№ штамма (в рабочей коллекции)	Название вида	Коэффициент*		
		Лигнинолитическая активность	Амилазная активность	Целлюлозолитическая активность
ID-211	<i>Acremonium</i> sp.	—	0.33	2.8
ID-114	<i>Alternaria alternata</i>	0.4	++	3.4
ID-116	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	0.7	0.5	2.3
ID-133	“ ”	0.7	—	1.9
ID-138	“ ”	0.9	0.6	2.7
ID-135	<i>Cadophora melinii</i>	0.5	1.8	—
ID-226	“ ”	—	0.5	1.6
ID-211c	<i>Cephalotrichum nanum</i>	—	—	3.4
ID-211к	“ ”	—	—	1.0
ID-266	<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	1	2	—
ID-101a	<i>Exophiala xenobiotica</i>	0.4	—	—
ID-115	“ ”	0.4	0.2	1.8
ID-104	“ ”	—	—	1
ID-209	<i>Fungal</i> sp.	±	±	1
ID-129	<i>Goffeauzyma gilvescens</i>	—	—	0.2
ID-255	“ ”	—	—	2.7
ID-126	<i>Hormodendrum</i> sp.	1.3	0.3	0.2
ID-111	<i>Mucor</i> sp.	—	++	++
ID-103	<i>Ochrocladosporium frigidarii</i>	0.3	0.4	2.2
ID-203	“ ”	0.6	0.5	2.9
ID-234	<i>Penicillium lividum</i>	—	—	3.1
ID-112c	<i>Phaeococcomyces</i> sp.	—	—	—
ID-357	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	—	—	1.8
ID-109	<i>Phoma herbarum</i>	0.6	0.7	2.5
ID-123	“ ”	0.3	0.3	2.1
ID-288	<i>Phoma</i> sp.	—	0.1	1
ID-355	“ ”	—	—	1.8
ID-128	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	—	1.3	2.9
ID-289	“ ”	1.2	1.1	3.0
ID-117	<i>Sydowia polyspora</i>	—	++	—
ID-127	<i>Xenopolyscytalum pinea</i>	0.7	—	2.9
ID-253	<i>Xenopolyscytalum</i> sp.	0.5	1.8	1.8

Примечание. *Расчет коэффициентов проводился для видов, обладающих наиболее выраженной активностью: “—” — отсутствие активности у исследуемых видов; “±” — слабая активность; “++” — высокая активность.

тестов, девять изолятов (27.9%) — в двух тестах, 12 изолятов (37.2%) — во всех трех тестах. К числу последних относились изоляты *Exophiala xenobiotica*, *Ochrocladosporium frigidarii*, *Phoma herbarum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Hormodendrum* sp., *Pseudogymnoascus pannorum*, *Xenopolyscytalum* sp.

Почти все изученные изоляты можно отнести к психротрофам (кроме *Stachybotrys chartarum*), т.е. они были способны активно расти при температуре 5°C, а также при содержании 5% NaCl в среде.

На основании результатов проведенного анализа изученные изоляты были условно разделены на 3 группы, отличающиеся по степени адаптации к древесному субстрату.

В первую группу (случайных для древесного субстрата) входит *Phaeococcomyces* sp., показавший отсутствие способности к разложению лигнина, целлюлозы и крахмала. К этой группе можно отнести изолят *Sydowia polyspora*, который показал только амилазную активность. Возможно, данный

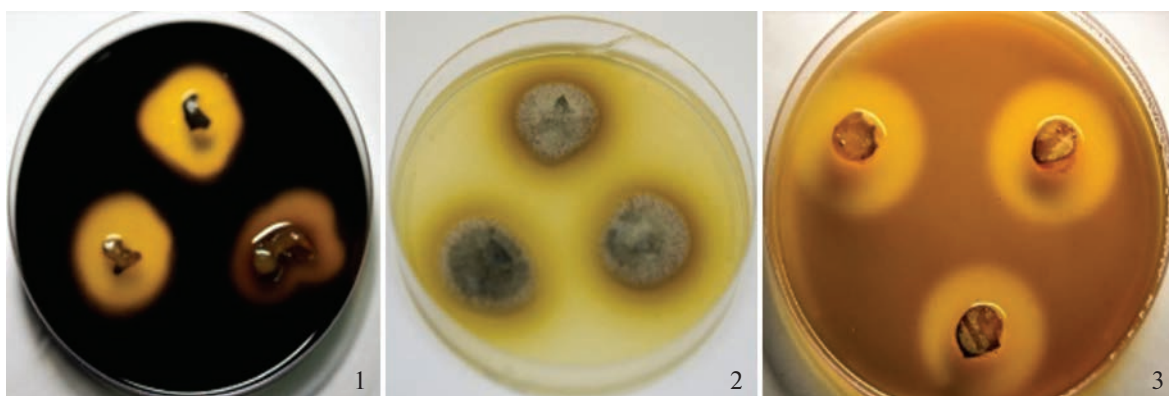


Рис. 6. Ферментативная активность штаммов (примеры результатов экспресс-тестов): 1 — амилазная активность *Cadophora melinii* (ID-135); 2 — лигнинолитическая активность *Ochrocladosporium frigidarii* (ID-203); 3 — целлюлозолитическая активность *Exophiala xenobiotica* (ID-115).

вид, известный как патоген хвойных пород и в первую очередь сосны (Silva et al., 2019; Pan et al., 2018) паразитировал на древесине в естественных условиях и сохранил жизнеспособность при низких температурах.

Ко второй группе можно условно отнести виды, обладающие амилазной и целлюлозолитической активностью, поскольку, за исключением *Sydowia polyspora*, все виды, обладающие целлюлозолитической активностью, обладали и амилазной (но не наоборот). К этой группе относятся такие виды как *Goffeauzyma gilvescens*, *Acremonium* sp., *Cephalotrichum nanum*, *Penicillium lividum*, *Phialemonium atrogriseum*, *Phoma* sp., некоторые изоляты *Pseudogymnoascus pannorum* и *Cadophora melinii*.

Интересно отметить, что изолят *Pseudogymnoascus pannorum* DI-289 обладал высокой способностью к разложению лигнина, целлюлозы и крахмала, тогда как другой изолят *Pseudogymnoascus pannorum* DI-128, обладал способностью только к амилазной и целлюлозолитической активности.

К третьей группе можно отнести виды, обладающие лигнинолитической активностью, как правило, в совокупности с целлюлозолитической активностью, и являющиеся хорошо адаптированными к разложению древесного субстрата в экстремальных условиях Арктики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что при формировании комплексов микромицетов на древесине в арктических экосистемах происходит заселение древесины видами, типичными для почв Арктики и вторично-водными микро-скопическими грибами (преимущественно аскомицетами). Хотя древесина является привнесённым субстратом в высоких широтах Арктики, она, по всей вероятности, является источником новых

видов и местообитанием грибов, обладающих свойствами биодеструкторов.

Формирование комплексов микромицетов на древесине, имеющей различное происхождение, происходит разными путями. Проведенная работа позволяет сделать заключение о том, что в состав микобиоты древесных субстратов входят виды хорошо адаптированные к экстремальным условиям Арктики. Можно предположить, что длительное нахождение в морской воде при низких температурах приводит к отбору микромицетов, способных разлагать древесный субстрат в экстремальных условиях высоких широт.

Результаты исследования ферментативной активности микромицетов, впервые проведенного для микромицетов древесных субстратов с острова Хейса, свидетельствуют о том, что по мере заселения древесины происходит накопление грибов, обладающих способностью к ферментативному разложению лигнина и целлюлозы. Проявление ферментативной активности во многих случаях существенно различается у изолятов одного вида и не коррелирует с типом древесины.

Работа выполнялась в рамках государственного задания согласно тематическому плану БИН РАН по теме № АААА-А19-119020890079-6, часть работы выполнена на оборудовании ЦКП “Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов” Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург). Выражаем благодарность Н.Г. Соловьевой за проведение работ по определению пород древесины и к.б.н. Н.В. Шаховой за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aleksandrova V.D.* Geobotanical zoning of the Arctic and Antarctic. Nauka, Leningrad, 1977 (in Russ.).
Almeida C., Eguereva E., Kehraus S. et al. Hydroxylated sclerosporin derivatives from the marine-derived fungus *Ca-*

- dophora malorum*. J. Nat. Prod. 2010. V. 73 (3). P. 476–478.
<https://doi.org/10.1021/np900608d>
- Arenz B.E., Blanchette R.A. Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. Can. J. Microbiol. 2009. V. 55. P. 46–56.
<https://doi.org/10.1139/W08-120>
- Arenz B.E., Blanchette R.A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea region and McMurdo dry valleys. Soil Biol. Biochem. 2011. V. 43. P. 308–315.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.016>
- Arenz B.E., Blanchette R.A., Farrell R.L. Fungal diversity in Antarctic soils. In: D. Cowan (ed.). Antarctic terrestrial microbiology: Physical and biological properties of Antarctic soils. Springer, 2014. P. 35–53.
<https://doi.org/10.1139/W08-120>
- Białkowska A.M., Szulczewska K.M., Krysiak J. Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. Polar Biol. 2017. V. 40. P. 1787–1803.
<https://doi.org/10.1007/s00300-017-2102-7>
- Blanchette R.A., Held B.W., Arenz B.E. et al. An Antarctic hot spot for fungi at Shackleton's historic hut on Cape Royds. Microb. Ecol. 2010. V. 60. P. 29–38.
<https://doi.org/10.1007/s00248-010-9664-z>
- Blanchette R., Held B., Hellman L. et al. Arctic driftwood reveals unexpectedly rich fungal diversity. Fungal Ecol. 2016. V. 23. P. 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.06.001>
- Blanchette R.A., Held B.W., Jurgens J.A. et al. Wood destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 1328–1335.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1328-1335.2004>
- Blanchette R.A., Held B.W., Jurgens J. et al. Fungi attacking historic wood of Fort Conger and the Peary Huts in the High Arctic. PLOS One. 2021. V. 16 (1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246049>
- Burgaud G., Le Calvez T., Arzur D. et al. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. Environ. Microbiol. 2009. V. 11(6). P. 1588–1600.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01886.x>
- Cadete R.M., Lopes M.R., Rosa C.A. Yeasts associated with decomposing plant material and rotting wood. In: P. Buzzini, M.A. Lachance, A. Yurkov (eds). Yeasts in natural ecosystems: diversity. Springer, 2017, pp. 265–292.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_9
- Chilingarov A.N. Essays on the geography of the Arctic. Moscow, 2009 (in Russ.).
- Chuchala D., Sandak A., Orlowski K.A. et al. Characterization of Arctic driftwood as naturally modified material. Pt 1: Machinability. Coatings. 2021. V. 11 (3). P. 278–284.
<https://doi.org/10.3390/coatings11030278>
- Colwell R.K., Chao A., Gotelli N.J. et al. Models and estimators linking individual-based and sample based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. J. Plant Ecol. 2012. V. 5 (1). P. 3–21.
<https://doi.org/10.1093/jpe/rtr044>
- Connell L., Redman R., Craig S. et al. Distribution and abundance of fungi in the soils of Taylor Valley, Antarctica. Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. P. 3083–3094.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.02.016>
- Crous P.W., Luangsa-ard J., Wingfield M.J. et al. Fungal planet description sheets: 785–867. Persoonia. 2018. V. 41. P. 238–417.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.12>
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching, 2007.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01052_1.x
- Dryupin V.G. Franz Joseph Land. Arkhangelsk, 2004 (in Russ.).
- Dyke A.S., England J., Reimnitz E. et al. Changes in driftwood delivery to the Canadian Arctic Archipelago: the hypothesis of postglacial oscillations of the Transpolar Drift. Arctic. 1997. V. 50 (1). P. 1–16.
- Eggertsson Ó. Driftwood as an indicator of relative changes in the influx of Arctic and Atlantic water into the coastal areas of Svalbard. Polar Research. 1994. V. 13. P. 209–218.
<https://doi.org/10.1111/J.1751-8369.1994.TB00450.X>
- Gams W. *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent *Ascomycetes*. Stud. Mycol. 2000. V. 45. P. 187–199.
- Godinho V.M., Furbino L.E., Santiago I.F. et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. The ISME J. 2013. V. 7. P. 1434–1451.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.77>
- González A.E., Martínez A.T., Almendros G. et al. A study of yeasts during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chilean rain forest. Antonie van Leeuwenhoek. 1989. V. 55. P. 221–236.
<https://doi.org/10.1007/bf00393851>
- Govorukha L.S. Landscape and geographic characteristics of Franz Josef Land. Tr. AANII Problemy polyarnoy geografii. 1968. P. 86–117 (in Russ.).
- Govorukha L.S. Franz Joseph Land. Moscow, 1970 (in Russ.).
- Guamán-Burneo M.C., Dussan K.J., Cadete R.M. et al. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis*, sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek. 2015. V. 108. P. 919–931.
<https://doi.org/10.1007/s10482-015-0546-8>
- Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya. 2005.
<https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7>
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. FEMS Microbiol. 2018. V. 42. P. 353–375.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Held B., Jurgens J., Duncan S. et al. Assessment of fungal diversity and deterioration in a wooden structure at New Harbor, Antarctica. Polar Biology. 2005. V. 29. P. 526–531.
<https://doi.org/10.1007/s00300-005-0084-3>
- Held B.W., Blanchette R.A. Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. Fungal Biol. 2017. V. 121 (2). P. 145–157.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.009>

- Held B.W., Jurgens J.A., Arenz B.E. et al. Environmental factors influencing microbial growth inside the historic huts of Ross Island, Antarctica. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 2005. V. 55. P. 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.06.011>
- Hellmann L., Agafonov L., Churakova O. et al. Regional coherency of boreal forest growth defines Arctic driftwood provenancing. *Dendrochronologia*. 2016. V. 39. P. 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2015.12.010>
- Hellmann L., Kirdyanov A.V., Büntgen U. Effects of boreal timber rafting on the composition of Arctic driftwood. *Forests*. 2016. V. 7 (11) P. 257–266. <https://doi.org/10.3390/f7110257>
- Hellmann L., Tegel W., Eggertsson Ó. et al. Tracing the origin of Arctic driftwood. *J. Geophysical Res. Biogeosciences*. 2013. V. 118 (1). P. 68–76. <https://doi.org/10.1002/jgrg.20022>
- Hellmann L., Tegel W., Geyer J. et al. Dendro-provenancing of Arctic driftwood. *Quaternary Science Reviews*. 2017. V. 162. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2017.02.025>
- Hellmann L., Tegel W., Kirdyanov A.V. et al. Timber logging in central Siberia is the main source for recent Arctic driftwood. *Arctic Antarct. Alpine Res.* 2015. V. 47. P. 449–460. <https://doi.org/10.1657/aaar0014-063>
- Henriksson G., Brännval E., Lennholm H. 2. The trees. V. 1. In: *Ek M. etc. (eds). Wood chemistry and wood biotechnology*. Berlin, N.Y., 2009, pp. 13–44.
- Index Fungorum. CABI Bioscience, 2022. <http://www.indexfungorum.org>. Accessed 13.09.2022.
- Karvinen S., Valkky E., Tornaiainen T. et al. Northwest Russian Forest Sector in a Nutshell. Working Papers of Finnish Forest Research Institute. 2006.
- Kejzar A., Grötl M., Tamás M.J. et al. HwHog1 kinase activity is crucial for survival of *Hortaea werneckii* in extremely hyperosmolar environments. *Fungal Genet. Biol.* 2015. V. 74. P. 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.004>
- Kirtsideli I.Yu. Microfungi from soils of Heiss Island (Franz Joseph Land). *Novosti Sistematiki Nizshikh Rasteniy*. 2015. V. 49. P. 151–160 (in Russ.).
- Kirtsideli I.Yu., Abakumov E.V., Teshebaev Sh.B. et al. Microbial communities in regions of Arctic settlements. *Gigiena i sanitariya*. 2016. V. 95 (10). P. 923–929 (in Russ.).
- Kirtsideli I.Yu., Ilyushin V.A., Vlasov D.Yu. et al. Microfungi in the Soils of Chernavaya Taiga of Western Siberia. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2022. V. 56 (2). P. 86–95 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026364822020076>
- Kirtsideli I.Yu., Llukina E., Iliushin V.A. et al. Diversity of microfungi on driftwood in the coastal zone of the Greenland Sea (Svalbard Archipelago). *Mikologiya i fitopatologiya*. 2021. V. 55 (3). P. 178–188 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/s0026364821030053>
- Kirtsideli I.Yu., Vlasov D.Yu., Abakumov E.V. et al. Diversity and enzyme activity of microfungi from antarctic soils. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2010. V. 44 (5). P. 387–397 (in Russ.).
- Kirtsideli I., Vlasov D., Barantsevich E. et al. Distribution of terrigenous microfungi in Arctic Seas. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2012. V. 46 (5). P. 306–310 (in Russ.).
- Kirtsideli I.Yu., Vlasov D.Yu., Novozhilov Yu.K. et al. Assessment of anthropogenic influence on Antarctic mycobiota in areas of Russian polar stations. *Contemporary Problems of Ecology*. 2018. V. 11 (5). P. 449–457. <https://doi.org/10.1134/S1995425518050074>
- Kirtsideli I.Yu., Vlasov D.Yu., Zelenskaya M.S. et al. Assessment of anthropogenic invasion of microfungi in Arctic ecosystems (exemplified by Spitsbergen archipelago). *Gigiena i sanitariya*. 2020. V. 99 (2). P. 145–151 (in Russ.). <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-2-145-151>
- Klán J., Baudišová D. Enzyme activity of mycelial cultures of saprotrophic macromycetes (*Basidiomycotina*). I. Methods of hydrolases estimation. *Česká Mykol.* 1990. V. 44 (4). P. 203–211.
- Kolosova M.I., Solovyeva N.G. The main anatomical features of the wood of deciduous trees and shrubs. SPb., 2013 (in Russ.).
- Krishnan A., Convey P., Gonzalez M. et al. Effects of temperature on extracellular hydrolase enzymes from soil microfungi. *Polar Biology*. 2018. V. 41. P. 537–551. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00300-017-2215-z>
- Linderholm H.W., Gunnarson B.E., Fuentes M. et al. The origin of driftwood on eastern and south-western Svalbard. *Polar Science*. 2021. V. 29. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2021.100658>
- Ludley K.E., Robinson C.H. Decomposer *Basidiomycota* in Arctic and Antarctic ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. P. 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.023>
- Malosso E., Waite I.S., English L. et al. Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques. *Polar Biol.* 2006. V. 29. P. 552–561. <https://doi.org/10.1007/s00300-005-0088-z>
- Mattsson J., Flyen A.C., Nunez M. Wood-decaying fungi in protected buildings and structures on Svalbard. *Int. J. Medicinal Mushrooms*. 2010. V. 29. P. 5–14.
- Methods of experimental mycology / V.I. Bilay (ed.). Naukova Dumka, Kiev, 1982 (in Russ.).
- Naranjo-Ortiz M.A., Gabaldón T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the *Fungi*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2019. V. 94 (6). P. 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Nikitin D.A., Semenov M.V. Characterization of Franz Josef Land soil mycobiota by microbiological palating and real-time PCR. *Microbiology*. 2022. V. 91 (1). P. 56–66.
- Pan Y., Ye H., Lu J. et al. Isolation and identification of *Sydowia polyspora* and its pathogenicity on *Pinus yunnanensis* in Southwestern China. *J. Phytopathology*. 2018. V. 166 (6). P. 383–395. <https://doi.org/10.1111/jph.12696>
- Pedersen N.B., Matthiesen H., Blanchette R.A. et al. Fungal attack on archaeological wooden artefacts in the Arctic: Implications in a changing climate. *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 14577. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71518-5>
- Perini L., Gostinčar C., Gunde-Cimerman N. Fungal and bacterial diversity of Svalbard subglacial ice. *Scientific Reports*. 2019. V. 9 (1). P. 20230. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56290-5>

- Peterson B.J., Holmes R.M., McClelland J.W. et al. Increasing river discharge to the Arctic Ocean. *Science*. 2002. V. 13. P. 2171–2173.
<https://doi.org/10.1126/science.1077445>
- Rämä T., Hassett B.T., Bubnova E. Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operational taxonomic units and beyond. *Botanica Marina*. 2017. V. 60 (4). P. 433–452.
<https://doi.org/10.1515/bot-2016-0104>
- Rämä T., Norden J., Davey M. et al. Fungi ahoy! Diversity on marine wooden substrata in the high North. *Fungal Ecol.* 2014. V. 8. P. 46–58.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.12.002>
- Raper K.B., Thom C.A. Manual of the *Penicillia*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1949.
- Richards T.A., Jones M.D.M., Leonard G. et al. Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Ann. Rev. Marine Sci.* 2012. V. 4. P. 495–522.
<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100802>
- Rovati J.I., Pajot H.F., Ruberto L. et al. Polyphenolic substrates and dyes degradation by yeasts from 25 de Mayo/King George Island (Antarctica). *Yeast*. 2013. V. 30. P. 459–470.
<https://doi.org/10.1002/yea.2982>
- Sampaio J.P. Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Can. J. Microbiol.* 1999. V. 45. P. 491–512.
<https://doi.org/10.1139/cjm-45-6-491>
- Sazanova K.V., Senik S.V., Kirtsideli I. Yu. et al. Metabolomic profiling and lipid composition of Arctic and Antarctic strains of micromycetes *Geomyces pannorum* and *Thelebolus microsporus* grown at different temperatures. *Microbiology*. 2019. V. 88. P. 282–291.
<https://doi.org/10.1134/S0026261719030111>
- Shakhova N.V., Volobuev S.V. Revealing new active and biotechnologically perspective producers of oxidative and cellulolytic enzymes among pure cultures of xylophilic *Agaricomycetes* from the Southern Non-Chernozem zone of the European part of Russia. *Current Res. Environm. Appl. Mycology (J. Fungal Biol.)* 2020. V. 10 (1). P. 113–119.
<https://doi.org/10.11910.5943/cream/10/1/12>
- Shitikov V.K., Zinchenko T.D., Rozenberg G.S. Macroecology of river communities: concepts, methods, models. Tolyatti, 2011 (in Russ.).
- Silva A.C., Henriques J., Diogo E.L. et al. First report of *Sydowia polyspora* causing disease on *Pinus pinea* shoots. *Forest Pathology*. 2019. V. 50. e12570.
<https://doi.org/10.1111/efp.12570>
- Sprenger M., Kasper L., Hensel M. et al. Metabolic adaptation of intracellular bacteria and fungi to macrophages. *Int. J. Med. Microbiol.* 2018. V. 308 (1). P. 215–227.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.001>
- Stokland J., Siitonen J., Jonsson B. Biodiversity in dead wood (ecology, biodiversity and conservation). Univ. Press, Cambridge, 2012.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139025843>
- Teppo R., Norden J., Marie L. et al. Fungi ahoy! Diversity on marine wooden substrata in the high North. *Fungal Ecol.* V. 8. P. 46–58.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.12.002>
- Tosi S., Casado B., Gerdol R. et al. Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biol.* 2002. V. 25. P. 262–268.
<https://doi.org/10.1007/s00300-001-0337-8>
- Troncoso E., Barahona S., Carrasco M. et al. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* 2017. V. 40. P. 649–658.
<https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9>
- Tsuji M., Tsujimoto M., Imura S. *Cystobasidium tubakii* and *Cystobasidium ongulense*, new basidiomycetous yeast species isolated from East Ongul Island, East Antarctica. *Mycoscience*. 2017. V. 58. P. 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.11.002>
- White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. Innis etc. (eds.). *PCR Protocols: A Guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 1990, pp. 315–322.
- Yatsenko-Khmelevskiy A. A. Fundamentals and methods of anatomical study of wood. Moscow, Lenindrad, 1954 (in Russ.).
- Александрова В.Д. (Aleksandrova) Геоботаническое районирование Арктики и Антарктики. Л.: Наука, 1977, 188 с.
- Говоруха Л.С. (Govorukha) Ландшафтно-географическая характеристика Земли Франца-Иосифа // Тр. АНИИ. Проблемы полярной географии. 1968. Т. 285. С. 86–117.
- Говоруха Л.С. (Govorukha) Земля Франца-Иосифа. М.: Советская Арктика, 1970. С. 328–359.
- Дрюпин В.Г. (Dryupin) Земля Франца-Иосифа. Архангельск: СГМУ, 2004. 135 с.
- Кирицели И.Ю. (Kirtsideli) Микроскопические грибы в почвах острова Хейса (земля Франца-Иосифа) // Новости систематики низших растений. 2015. Т. 49. С. 151–160.
- Кирицели И.Ю., Абакумов Е.В., Тешебаев Ш.Б. и др. (Kirtsideli et al.) Микробные сообщества в районах арктических поселений // Гигиена и санитария. 2016. Т. 95. № 10. С. 923–929.
- Кирицели И.Ю., Власов Д.Ю., Абакумов Е.В. и др. (Kirtsideli et al.) Разнообразие и ферментативная активность микромицетов из слабообразованных почв береговой Антарктики // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. № 5. С. 387–397.
- Кирицели И.Ю., Власов Д.Ю., Баранцевич Е.П. и др. (Kirtsideli et al.) Распространение терригенных микромицетов в водах Арктических морей // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. № 5. С. 306–310.
- Кирицели И.Ю., Власов Д.Ю., Зеленская М.С. и др. (Kirtsideli et al.) Оценка антропогенной инвазии микроскопических грибов в Арктические экосистемы (на примере пос. Баренцбург, архипелаг Шпицберген) // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99. № 2. С. 145–151.
- Кирицели И.Ю., Власов Д.Ю., Ильющин В.А. и др. (Kirtsideli et al.) Микроскопические грибы в почвах черновой тайги Западной Сибири // Микология и фитопатология. 2022. Т. 56 (2). С. 86–95.
- Кирицели И.Ю., Лукина Е.Г., Ильющин В.А. и др. (Kirtsideli et al.) Разнообразие микроскопических гри-

- бов на древесине в береговой зоне Гренландского моря (архипелаг Шпицберген) // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 3. С. 178–188.
- Колосова М.И., Соловьева Н.Г. (Kolosova, Solovyeva) Основные анатомические признаки древесины лиственных деревьев и кустарников. СПб., 2013. 104 с.
- Методы экспериментальной микологии (Methods) / В.И. Билай (ред.). Киев: Наукова думка, 1982. 550 с.
- Чилингаров А.Н. (Chilingarov) Очерки по географии Арктики. М., 2009. 56 с.
- Шитиков В.К., Зинченко Т.Д., Розенберг Г.С. (Shitikov et al.) Макроэкология речных сообществ: концепции, методы, модели. Тольятти, 2011. 255 с.
- Яценко-Хмелевский А.А. (Yatsenko-Khmelevskiy) Основы и методы анатомического исследования древесины. М.-Л., 1954. 337 с.

Diversity of Microfungi on Wood of the Coastal Zone of Heiss Island (Franz Joseph Land Archipelago)

I. G. Pankova^{a,#}, I. Yu. Kirtsideli^{a,##}, V. A. Iliushin^{a,###}, M. S. Zelenskaya^{b,####}, D. Yu. Vlasov^{a,b,#####},
M. V. Gavrilov^{c,d,#####}, and E. P. Barantsevich^{e,#####}

^aBotanical Institute of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^bSaint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^cArctic and Antarctic Research Institute, St. Petersburg, Russia

^dAssociation Maritime Heritage, St. Petersburg, Russia

^eNorthwestern Almazov Federal medical research center of the Russian Federation Ministry of Health, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: inna2008@nextmail.ru

^{##}e-mail: microfungi@mail.ru

^{###}e-mail: ilva94@yandex.ru

^{####}e-mail: marsz@yandex.ru

^{#####}e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

^{#####}e-mail: m_gavrilov@mail.ru

^{#####}e-mail: lenabara2003@inbox.ru

The material for the study was wood samples that were collected in the summer of 2021 on the coast of Heiss Island in the Franz Josef Land archipelago, in the Arctic Ocean. Heiss Island is located in the central area of the archipelago. The wood was 1) brought by the sea ("drift wood") and was located on the shore at minor distances from the water line or 2) anthropogenic origin and was an external part of abandoned structures. As a result of investigations, we revealed complexes of microfungi on coniferous and deciduous wood, which include 30 species of microfungi, mainly from the *Ascomycota* division. Species of the genus *Cadophora* were found in the greatest number of examined samples. Indicators of species diversity and occurrence of representatives of the *Basidiomycota* department were low. The yeast component (*Ascomycota* and *Basidiomycota*) accounted for 23% of the identified species. A total of 25 species were found in wood samples of anthropogenic origin and 12 species in drift wood samples. Studies of the enzymatic activity of microfungi showed that ligninolytic activity was noted in 50% of the strains studied, amylolytic in 62%, and cellulolytic in 85% of the strains studied. A group of psychrotrophic species with high ligninolytic activity, together with cellulolytic and amylase activity, and well adapted to decomposition of wood substrate in the extreme conditions of the Arctic was identified. Activity profiles of different isolates of the same species do not always coincide and expression of individual enzymatic activity factors in many cases has a strain character.

Keywords: Arctic, enzymatic activity, microbial communities, microscopic fungi, secondary aquatic fungi, wood

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.67: 579.8: 664

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *ASPERGILLUS* – КОНТАМИНАНТОВ ЗЕЛЕННОГО КОФЕ НА ОСНОВЕ ПОЛИФАЗНОЙ ТАКСОНОМИИ

© 2023 г. Л. П. Минаева^{1,*}, Ю. М. Маркова^{1,**}, А. Д. Евсюкова^{1,***},
И. Б. Седова^{1,****}, З. А. Чалый^{1,*****}

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 109240 Москва, Россия

*e-mail: liuminaeva-ion@mail.ru

**e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com

***e-mail: st.shtolz@gmail.com

**** e-mail: isedova1977@mail.ru

***** e-mail: tokka66@bk.ru

Поступила в редакцию 27.10.2022 г.

После доработки 05.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Грибы рода *Aspergillus* широко распространены в окружающей среде, способны расти при высоких температурах и минимальной влажности, в том числе в регионах с жарким тропическим климатом, отдельные виды *Aspergillus* обладают потенциалом токсинообразования. Это определяет риск контаминации грибами рода *Aspergillus* и продуцируемыми ими микотоксинами (МТ) растительного сырья и пищевой продукции, что возможно на любом этапе производства, транспортировки и хранения. В объеме импортируемого в РФ кофе, 85% приходится на сырье – зеленый кофе, для которого сохраняются риски поражения плесневыми грибами на всех стадиях, предшествующих стадии обжарки. Актуально исследование видового состава и токсиногенных свойств *Aspergillus* spp., контаминирующих сырье для производства пищевой продукции массового потребления, к которой, в том числе, относится кофе, входящий в число базовых продуктов потребительской корзины. Достоверные данные видовой идентификации и токсиногенного потенциала микромицетов могут быть получены только при комплексном подходе на основе полифазной таксономии. Цель представленной работы – изучение видового состава грибов рода *Aspergillus*, выделенных из зеленого кофе, с применением комплексного подхода на основе полифазной таксономии. Проведено изучение видового состава грибов рода *Aspergillus* из внутренней микофлоры 16 образцов зерен зеленого кофе сортов арабика и робуста. Видовая принадлежность выделенных 34 моноспоровых изолятов *Aspergillus* spp. определена культурально-морфологическими методами и подтверждена при молекулярно-генетическом анализе – ПЦР-РВ с ДНК-маркерами консервативных последовательностей (ITS, Calmodulin, β -tubulin), в условиях *in vitro* изучен профиль продуцируемых вторичных токсических метаболитов. Установлено доминирование видов секции *Niger* – *A. niger* (90%), *A. tubingensis*, *A. carbonarius*; далее в порядке уменьшения следовали виды секции *Flavi* – *A. flavus* (100%); секции *Circumdati* – *A. ochraceus* (40%) и *A. westerdijkiae* (60%); в секцию *Fumigati* был выделен один штамм *A. fumigatus*. Анализ профиля токсических метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мультidetекции показал продукцию микотоксинов видами: *A. niger* – фумонизина В2 и охратоксина А, *A. flavus* – афлатоксинов В1 и В2 совместно со стеригматоцистином, *A. westerdijkiae* – охратоксина А и пеницилловой кислоты, *A. ochraceus* – пеницилловой кислоты. Количества продуцируемых МТ показывают высокий токсиногенный потенциал *Aspergillus* spp. – контаминантов зеленого кофе. Так 20 из 34 штаммов продуцировали в значительных количествах опасные, регламентируемые микотоксины: АФЛ В1, ОТА, ФВ2. Нетоксиногенные изоляты были представлены видами *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus* и *A. fumigatus*. Изучение видового состава и токсиногенных свойств грибов рода *Aspergillus* – контаминантов зеленого кофе с применением полифазного подхода проведено в России впервые.

Ключевые слова: *Aspergillus*, ВЭЖХ-МС/МС, кофе, микотоксины, полифазная таксономия, ПЦР, токсиногенность, эмерджентные микотоксины

DOI: 10.31857/S0026364823030078, EDN: VCPMMC

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Aspergillus* имеют повсеместное распространение в окружающей среде, способны

расти на широком спектре растительных субстратов, в широком диапазоне температур и влажности, а высокие скорости роста и распространения

спор *Aspergillus* spp. обеспечивает их доминирование в различных экологических нишах. При этом отдельные виды *Aspergillus* spp. являются продуцентами как опасных, нормируемых в пищевой продукции и сырье, микотоксинов (МТ) — афлатоксинов (B1, B2, G1, G2), охратоксина А, фумонизинов (B2, B4), так и новых, так называемых — эмерджентных (emergent) МТ: стеригматоцистина, циклопиазоновой кислоты, значение которых с точки зрения опасности для здоровья человека в настоящее время изучается, и в отношении которых отсутствуют регламенты безопасности в пищевой продукции. Все эти факторы во многом определяют высокий риск загрязнения пищевой продукции на всех этапах ее производства от сырья до конечного продукта, как грибами рода *Aspergillus*, так и продуцируемыми ими микотоксинами. Для оценки контаминации продуктов МТ и научного обоснования эффективных путей минимизации их негативного воздействия на организм человека необходимо изучение видового состава и токсиногенного потенциала микромицетов в продукции, характеризующейся высокой степенью риска поражения плесенью. Одним из таких видов продукции является кофе, при производстве которого наиболее уязвимыми с точки зрения безопасности являются послеуборочные этапы сушки и ферментации плодов в естественных климатических условиях за счет собственной микрофлоры, включающей в том числе микромицеты — потенциальные продуценты МТ. Проблема контаминации кофе опасным охратоксином (ОТА) побудила Научный комитет Европейской комиссии по пищевым продуктам провести оценку риска и признать необходимость контроля ОТА в кофе. Было отмечено, что кофе входит в группу продуктов питания, являющихся основными источниками поступления ОТА в организм человека с пищей (Commission., 2006). Актуальность изучения определяется и тем, что в объеме импортируемого в РФ кофе, 85% приходится на сырье — необработанный зеленый кофе (Iratova, 2020), для которого сохраняются риски поражения плесневыми грибами на стадиях транспортировки и хранения, предшествующие стадиям обжарки.

Идентификация микромицетов рода *Aspergillus* до уровня вида является сложной задачей в силу высокого сходства морфологических структур отдельных видов, неоднородности подходов к таксономии грибов, накоплением новых данных молекулярно-генетических исследований, отражающих сложность эволюционных процессов в формировании видов, поэтому не существует простых стратегий для однозначной их идентификации (Grube et al., 2017; Inderbitzin et al., 2020). Созданная ранее и используемая на протяжении многих десятилетий таксономическая система микроскопических грибов, основанная на морфологических характеристиках, в последнее время претерпевает

кардинальные, а для некоторых видов революционные изменения. Применение методов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) в формате мультidetекции позволило выявить видоспецифичный характер метаболитных профилей микромицетов, что обусловило появление хемотаксономии. Объем накопленных данных позволил провести более глубокую видовую и родовую дифференциацию, в результате чего многие морфологически схожие изоляты грибов, в частности рода *Aspergillus*, рассматриваемые ранее как представители одного вида, были реклассифицированы и отнесены к группе или комплексу видов. Так понимание вида *Aspergillus niger* было расширено до комплекса *Aspergillus* секции *Nigri* (*A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* и др., всего 19 видов) (Samson et al., 2007), а вида *A. flavus* — до комплекса *Aspergillus* секции *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. aflatoxiformans* и др., всего 33 вида) (Hubka et al., 2019). Надежные данные видовой идентификации микромицетов могут быть получены только при использовании комплексного подхода на основе полифазной таксономии, включающего изучение фенотипических, молекулярно-генетических и хемотаксономических характеристик микромицетов с учетом их происхождения.

Цель представленной работы — изучение видового состава грибов рода *Aspergillus*, выделенных из зеленого кофе, с применением комплексного подхода на основе полифазной таксономии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Штаммы грибов рода *Aspergillus*, выделенные из 16 образцов зерен зеленого кофе сортов арабика и робуста, выращенных в регионах Африки, Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, были получены из розничной сети Московского региона (табл. 1).

Выделение изолятов микромицетов. От каждого образца зеленого кофе отбирали по 10 зерен, поверхность стерилизовали в 70%-м этаноле, просушивали и раскладывали в чашки Петри на картофельно-сахарозный агар (КСА) с добавлением антибиотика (стрептомицин 200 мг/л, ОАО “Синтез”, Курган) и Тритона™X-100 (0.5%, Sigma-Aldrich) (Gagkaeva, et al., 2011). Посевы инкубировали 7 сут при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте. Выросшие из кофейных зерен микромицеты отсеивали на среду КСА для последующих расщепов до получения моноспоровых изолятов (МСИ), всего был выделен 34 МСИ.

Фенотипическая идентификация МСИ. Проведена по результатам культуральных и морфологических исследований в соответствии с рекомендованной схемой (Samson et al., 2014). Скорость ро-

ста грибов при температурах 15, 24, 36 и 40°C на агаризованной среде Чапека с дрожжевым экстрактом (СЧА) определяли по размеру колоний через 7 сут; кислотообразование оценивали на креатинин-сахарозном агаре (CREA) через 5–7 сут при $24 \pm 1^\circ\text{C}$; макроморфологию колоний (цвет мицелия и реверса, споруляцию и др.) и микроморфологические характеристики (форма конидиальных головок, размер и форма конидий и др.) отмечали при выращивании на среде СЧА при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ через 7 сут. По совокупности признаков определяли принадлежность к виду, а для морфологически схожих видов указывали на принадлежность к секции видов (Samson et al., 2007; Jurjevic et al., 2012; Samson et al., 2014; Visagie et al., 2014; Frisvad et al., 2019).

Экстракция ДНК. Проведена с использованием набора Проба-ЦТАБ (ООО “Агро-Диагностика”). Культуры грибов выращивали на картофельно-сахарозном бульоне (КСБ) в пластиковых пробирках типа “фалькон” с неплотно закрученными крышками, при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10–14 сут в темноте. Полученный мицелий отделяли центрифугированием, промывали 96%-м этанолом, повторно центрифугировали и переносили в размоленные пробирки. Дезинтеграцию мицелия проводили в размоленных пробирках объемом 2 мл, содержащих стеклянные шарики диаметром 0.4–0.5 мм и 0.5 мл р-ра для лизиса (Проба-ЦТАБ). Пробирки встряхивали в течение 2 мин на вортексе “Vortex genie 2”, используя горизонтальную подставку “MN Bead Tube Holder”, затем проводили лизис в течение 30 мин при 65°C в термошейкере. Далее экстрагировали ДНК в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Концентрацию и чистоту ДНК в экстрактах оценивали на спектрофотометре BioSpectrometer®basic (Eppendorf) и путем ПЦР анализа с универсальными праймерами ITS1 F и ITS4 R критерием пригодности был положительный результат ПЦР (табл. 2). Дополнительную очистку экстрактов ДНК при необходимости проводили с использованием автоматической станции “KingFisher Duo Prime” (Thermo Fisher Scientific) и набора реагентов “РеалБест УниМаг” (АО “Вектор Бест”) в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Амплификация ДНК. ПЦР проводили в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с интеркалирующим красителем SYBR Green на амплификаторе “LightCycler® 96” (Roche). Общий объем реакционной смеси 25 мкл включал: 5 мкл готовой смеси для ПЦР “qPCRmix-HS SYBR” (ЗАО “Евроген”), по 1.0 мкл прямого и обратного праймера с концентрацией 5 или 10 ПкМоль/мкл (табл. 2), 17 мкл воды без нуклеаз и 1 мкл экстракта ДНК. Программа амплификации: первичная денатурация – 10 мин при 95°C , амплификация – 40 циклов при 95°C (20 с) (температура отжига – см. табл. 2) и анализ кривых плавления. Флуоресценция реги-

Таблица 1. Происхождение, выделенных из зеленого кофе штаммов *Aspergillus* spp.

№ штаммов	Регион происхождения кофе
22/2, 22/3, 23/2, 24/2, 29/1, 29/2, 34/1, 34/2	Бразилия (n = 5)
38/1, 38/3	Вьетнам (n = 1)
30/1, 30/2, 30/4	Гватемала (n = 1)
32/1, 32/3	Гондурас (n = 1)
33/1, 33/2, 36/1, 36/2	Индия (n = 2)
27/2, 35/1, 35/2, 35/4	Колумбия (n = 3)
25/2, 25/3	Куба (n = 1)
37/1, 37/2, 37/3	Танзания (n = 1)
28/1, 28/2, 28/3	Уганда (n = 1)
31/1, 31/2, 31/3	Эфиопия (n = 1)

Примечание. Число образцов обозначено буквой n.

стрировалась в каждом цикле амплификации на стадии элонгации (72°C). Результаты оценивали по нарастанию флуоресценции, значения пороговых циклов Cq (quantification cycle) рассчитывались автоматически программным обеспечением “LightCycler® 96” (Version 1.1.0.1320), специфичность реакции оценивали путем анализа кривых плавления. Все реакции проводили в трех повторностях.

Молекулярная идентификация. Видоспецифичные праймеры подбирали для доминирующих представителей микобиоты зеленого кофе – секций *Nigri*, *Flavi* и других видов продуцентов МТ и ЭМТ. На основе анализа научной литературы были отобраны 20 пар родо- и видоспецифичных праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям различных участков генома данных грибов (*CaM*, β -*tub*, *18SrDNA*, ITS, *cyp51A*) (табл. 2). Оценку заявленной специфичности праймеров проводили с использованием сервиса “Primer-BLAST” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). При проверке подсчитывали количество гомологов в базах данных “nr” и “RefSeq Representative Genome Database”, с ограничением поиска по царству *Fungi* (taxid: 4751). Валидацию видоспецифичных праймеров проводили со штаммами, полученными из отечественных коллекций микроорганизмов: ВКМ – *A. niger* F-3883, *A. flavus* F-25, *A. ochraceus* F-1265 и ВКПМ – *A. carbonarius* F-40, *A. parasiticus* F-1267.

Исследование токсинообразования в условиях *in vitro*. Проведено по разработанной ранее авторами методике (Minaeva et al., 2021). В качестве субстрата использовали два вида модельных питательных сред: КСА и рисовую (рис шлифованный/вода – 1.3/0.7). Стерильную КСА разливали по 2 мл в стерильные пластиковые пробирки типа “фалькон” (15 мл) с закручивающимися крышка-

Таблица 2. Праймеры, использованные при видовой идентификации изолятов *Aspergillus* и параметры амплификации

Специфичность	Целевой локус	Праймеры	Последовательность (5'–3')	t отжига, °C	N праймера, пкмоль/мкл	Авторы
Универсальные праймеры к грибной рРНК	ITS	ITS1 F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	58	5	White et al. (1990)
		ITS4 R	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<i>A. niger</i>	CaM	An F	GGATTTCGACAGCATTTTCC AGAACG	66	5	Palumbo et al. (2015)
		An R	GATAAAACCATTGTTGTCGC GGTCG			
<i>A. carbonarius</i>	“ ”	Ac F	AGCCGTTTTCCAAGCGACTT GAGC	66	5	“ ”
		Ac R	CCTCGTGTGAACACAAGCCC GC			
<i>A. welwitschiae</i>	“ ”	Aw F	GGGATTTCGACAGCATTTCT CAGAATT	66	5	“ ”
		Aw R	GATAAAACCATTGTTGTCGC GGTCA			
<i>A. tubingensis</i>	“ ”	At F	GGATTTCGACAGCTATTTCC CCCTT	66	5	“ ”
		At R	GCGGCAAAAGTCAATCACAA TCCATA			
<i>A. flavus</i>	ITS2 rDNA	FVAVIQ1	GTCGTCCCCTCTCCGG	58	10	Sardiñas et al. (2011)
		FLAQ2	CTGGAAAAAGATTGATTGCG			
<i>A. parasiticus</i>	“ ”	FVAVIQ1	GTCGTCCCCTCTCCGG	58	10	“ ”
		PARQ2	GAAAAAATGGTTGTTTTGCG			
<i>A. ochraceus</i>	ITS1–5.8 S–ITS2	OCRAF	CTTTTCTTTTAGGGGGGCAC AG	57	10	El Sheikha (2019)
		OCRAR	CAACCTGGAAAAATAGTTGG TTG			
<i>A. fumigatus</i>	β -tub	Fum1 F	TGACGGGTGATTGGGATCTC	59	10	Serrano et al. (2011)
		Fum1 R	CGTCCGCTTCTTCCTTGTTT			
<i>A. nomius</i>	ITS	Anits-F	ACACCACGAACCTCTGAAC	65	10	Godet et al. (2010)
		Anits-R	CGAGGTCAACCTGGAAAGAA TGTTGTTT			

Примечание. N – концентрация, t – температура.

ми и раскладывали в скошенном положении для застывания; рисовую среду вносили непосредственно в пробирки по 2 г в каждую, стерилизовали с плотно закрученными крышками при 121°C 15 мин дважды через день. Подготовленные пробирки со средами инокулировали по 0.1 мл споровой суспензией, полученной смывом с предварительно выращенных на КСА исследуемых культур. Посев проводили в трех повторностях на каждую среду, крышки пробирок закручивали неплотно для создания аэробных условий роста грибных культур. В качестве отрицательного контроля для каждого вида среды вместо инокулята вносили стерильный физраствор. Посевы инкубировали при 25 ± 1°C в течение 14 сут.

Экстракция микотоксинов. Проведена непосредственно из субстратного мицелия. В пробирки с посевами вносили по 5 мл экстрагента (ацетонитрил/вода/уксусная кислота – 80/20/0.5% об.), крышки плотно закручивали и интенсивно перемешивали на вортексе не менее 1 мин, выдерживали 1 ч в ультразвуковой бане с периодическим перемешиванием, после чего 1 ч интенсивно встряхивали на шейкере. Далее центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин и отбирали по 1 мл супернатанта А, из трех параллельных посевов делали объединенную пробу. К супернатанту А добавляли деионизированную воду (miliQ) в соотношении 1 : 1, повторно центрифугировали на мини-центрифуге при 12100 g 10 мин. Супернатант Б,

объемом 1.5 мл помещали в хроматографическую виалу для анализа ВЭЖХ-МС/МС.

Анализ микотоксинов. Афлатоксины АФЛ (В1, В2, G1 и G2), ократоксин А (ОТА), стеригматоцистин (СТЦ), фумонизины В1 и В2 (ФБ1 и ФБ2), микофеноловую кислоту (МФК), пеницилловую кислоту (ПК) определяли методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мультidetекции по разработанной ранее методике (Sedova et al., 2022). Для исключения влияния матрикса и получения ложноположительных результатов, стандарты МТ разводили в экстрактах соответствующих питательных сред. Стандартное отклонение для трех повторностей анализа микотоксинов в экстрактах из субстратного мицелия, составляло 7.4% (получено с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипическая идентификация

Из внутренней микофлоры 16 образцов зерен зеленого кофе были выделены 34 МСИ различных видов грибов рода *Aspergillus*, преобладавших в посевах.

Морфологические характеристики изучаемых изолятов сопоставляли со штаммами, полученными из российских коллекций микроорганизмов ВКМ¹: *A. niger* ВКМ F-3883, *A. flavus* ВКМ F-25, *A. ochraceus* ВКМ F-43 и ВКПМ²: *A. carbonarius* ВКПМ F-40 и *A. ochraceus* ВКПМ F-1265. По результатам фенотипической идентификации среди 34 исследованных МСИ наибольшую группу — 20 изолятов (59%) — составили виды секции *Nigri*, в меньшем количестве выявлены изоляты из секции *Flavi* — восемь (23.5%), секции *Circumdati* — пять (14.7%) и секции *Fumigati* — один (табл. 3).

В группе секции *Nigri* 19 морфологически схожих МСИ проявили типичные признаки: формирование колоний со светлым мицелием и конидиями от темно-коричневого до черного цвета; активный рост в диапазоне от 24 до 40°C и низкий при 15°C; высокий уровень кислотообразования; формирование шаровидных конидий 3–5 мкм в диам. на двухрядных конидиальных головках. Только один штамм (28/3) отличался активным ростом в широком диапазоне от 15 до 40°C, значительно сниженным кислотообразованием и крупными конидиями 7–9 мкм в диам. с характерной колючей поверхностью. Такие признаки внутри видов секции *Nigri* характерны для *A. carbonarius* (Samson et al., 2007; Pitt et al., 2009), что позволило идентифицировать видовую принадлежность штамма (28/3) по культурально-морфологическим признакам.

¹ ВКМ — Всероссийская коллекция микроорганизмов.

² ВКПМ — Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт”.

В группу *Aspergillus* секции *Flavi* было выделено восемь морфологически схожих изолятов, растущих активно при 24 и 36°C, умеренно при 40°C и слабо при 15°C, кислотообразование отсутствовало. В окраске всех колоний доминировали цвета различной насыщенности (желто-зеленый, оливковый зеленый), шаровидные конидии 3–6 мкм в диам. с небольшими шипами формировались на однорядных и двурядных конидиальных головках.

В группу секции *Circumdati* было выделено пять изолятов, формирующих колонии с характерной окраской от светлого желто-бежевого цвета в центре колонии до белого на периферии с обильными конидиями от белого до светло-желтого цвета. Два изолята (30/4 и 33/2) проявляли активный рост при 24°C, умеренный при 36°C и отсутствие роста при 40°C. Другие три изолята (27/2, 35/1 и 37/3) отличались отсутствием роста при 36 и 40°C, формированием складчатых колоний с ярко-розовыми склероциями и образованием пигмента на среде СYA при 33°C. У всех пяти штаммов шаровидные мелко шероховатые конидии 3–5 мкм в диам. образовывались на двурядных конидиальных головках. Образование склероциев ярко-розового цвета внутри видов секции *Circumdati* характерно для *A. westerdijkiae*, а наличие желтовато-оранжевого пигмента при 33°C является признаком, отличающим *A. westerdijkiae* от *A. ochraceus* (Visagie et al., 2014).

Один изолят (24/2) образовывал колонии серо-голубого цвета, активно растущие при 36°C и 40°C, при 24°C рост был умеренный, а при 15°C — слабый. Отличительной особенностью от описанных выше видов было формирование шаровидных конидий 2–4 мкм в диам. на однорядных столбчатых конидиальных головках с характерным однонаправленным ростом фиалид. По совокупности морфологических признаков этот штамм был отнесен к секции *Fumigati* (Pitt et al., 2009).

Молекулярно-генетические исследования

Изоляты, отнесенные к секции *Nigri* по фенотипическим признакам, тестировали с праймерами, специфичными к видам *A. niger* (An), *A. carbonarius* (Ac), *A. tubingensis* (At) и *A. welwitschiae* (Aw); изоляты, отнесенные к секции *Flavi* — с праймерами, специфичными к *A. flavus* (FVAVIQ1/FLAQ2), *A. parasiticus* (FVAVIQ1/PARQ2) и *A. nomius* (Anits-F/Anits-R); изоляты, отнесенные к секции *Circumdati* — с праймерами, специфичными к *A. ochraceus* (OCRAF/OCRAR), изолят, отнесенный к секции *Fumigati* — с праймерами, специфичными к *A. fumigatus* (Fum1 F/Fum1 R) (табл. 4).

По результатам ПРЦ с видоспецифичными праймерами была подтверждена или уточнена фенотипически установленная видовая дифференциация. Среди изолятов морфотипа секции *Nigri* 18 штаммов идентифицированы как *A. niger*, по

Таблица 3. Морфологические характеристики исследуемых изолятов *Aspergillus* spp.

№ штамма	Размер колоний на СУА при 15, 24, 36 и 40°C	Цвет колоний и окраска реверса на среде СУА при 24°C	Кислотообразование на среде CREA	Диаметр и форма конидий	Видовая принадлежность
22/3, 23/2, 25/2, 28/1, 29/1, 29/2, 30/1, 31/1, 31/3, 32/1, 34/1, 36/1, 37/1, 37/2, 22/2, 28/2, 33/1, 35/4, 38/1	15°C: 11–14 мм; (24, 36 и 40)°C: 60–86 мм	От белого до светло-коричневого цвета с конидиями от темно-коричневого до черного. Реверс от белого до желтого разной насыщенности	обнаружено	3–5 мкм, шаровидные, от гладких до мелко морщинистых на двурядных конидиальных головках	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>
28/3	15°C: 50–55 мм; 24°C: 60–63 мм; 36°C: 60–63 мм; 40°C: 40–44 мм	От белого до светло-коричневого цвета с конидиями от темно-коричневого до черного. Реверс желтого цвета разной насыщенности	слабое	7–9 мкм, шаровидные с шипами на двурядных конидиальных головках	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i> (<i>A. carbonarius</i>)
30/2, 34/2, 35/2, 38/3, 25/3, 31/2, 32/3, 36/2	15°C: 9–20 мм; 24°C: 34–55 мм; 36°C: 30–60 мм; 40°C: 28–30 мм	Оливково-желтый мицелий с желто-зелеными конидиальными головками. Реверс не окрашен	не обнаружено	3–6 мкм, шаровидные гладкие и шероховатые на однорядных и двурядных конидиальных головках. Везикулы 30–45 мкм. Склероции белые в глубине мицелия	<i>Aspergillus</i> секции <i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i>)
30/4, 33/2	15°C: 18–19 мм; 24°C: 55–61 мм; 36°C: 34–36 мм; 40°C: роста нет	От светлого желто-бежевого цвета в центре колонии до белого на периферии с конидиями от белого до светло-желтого цвета, прозрачный экссудат центральной части колонии. Реверс кремово-желтого цвета	не обнаружено	3–4 мкм, шаровидные с шероховатой поверхностью на двурядных конидиальных головках. Склероции желто-коричневые	<i>Aspergillus</i> секции <i>Circumdati</i> (<i>A. ochraceus</i>)
27/2, 35/1, 37/3	15°C: 25–28 мм; 24°C: 45–53 мм; 36–40°C: роста нет	От светлого желто-бежевого цвета в центре колонии до белого на периферии с конидиями от бледно-желтого до светло-желтого цвета, прозрачный экссудат в центральной части колонии. Реверс от светлого желтого до желто-оранжевого. Образование пигмента при 33°C	не обнаружено	3–5 мкм, шаровидные шероховатые на двурядных конидиальных головках. Склероции ярко розовые	<i>Aspergillus</i> секции <i>Circumdati</i> (<i>A. westerdijkiae</i>)
24/2	15°C: 10–12 мм; 24°C: 30–55 мм; 36°C: 60–80 мм; 40°C: 75–86 мм	Серовато-голубой. Реверс кремовый	не обнаружено	2–4 мкм, шаровидные мелко-шероховатые на однорядных столбчатых конидиальных головках, везикулы колбовидной формы 12–25 мкм	<i>Aspergillus</i> секции <i>Fumigati</i> (<i>A. fumigatus</i>)

Таблица 4. Видовая принадлежность изолятов *Aspergillus* sp. по результатам анализа ПЦР-РВ

№ штамма	По фенотипу	Методом ПЦР-РВ	Результаты ПЦР анализа с видоспецифическими праймерами								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Оригинальные штаммы											
22/2, 23/2, 25/2, 28/1, 28/2, 29/1, 29/2, 30/1, 31/1, 31/3, 32/1, 33/1, 34/1, 35/4, 36/1, 37/1, 37/2, 38/1	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	+	—	—	—					
22/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	—	—	+	—					
28/3	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Nigri</i> (<i>A.</i> <i>carbonarius</i>)	<i>A. carbonarius</i>	—	+	—	—					
25/3, 30/2, 31/2, 32/3, 34/2, 35/2, 36/2, 38/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i>)	<i>A. flavus</i>					+	—			—
30/4, 33/2	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Circum-</i> <i>dati</i> (<i>A.ochraceus</i>)	<i>A. ochraceus</i>							+		
27/2, 35/1, 37/3	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Circum-</i> <i>dati</i> (<i>A.westerdi-</i> <i>jkiae</i>)								—		
24/2	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Fumigati</i> (<i>A. fumigatus</i>)	<i>A. fumigatus</i>								+	
Штаммы из российских коллекций											
<i>A. niger</i> ВКМ F-3883		<i>A. niger</i>	+	—	—	—					
<i>A. carbonarius</i> ВКПМ F- 40		<i>A. carbonarius</i>	—	+	—	—					
<i>A. flavus</i> ВКМ F-25		<i>A. flavus</i>					+	—			
<i>A. parasiticus</i> ВКПМ F-1267		<i>A. parasiticus</i>					—	+			
<i>A. ochraceus</i> ВКПМ F-1265		<i>A. ochraceus</i>							+		

Примечание. Положительный результат ПЦР обозначен как “+”, отрицательный — как “—”. Пустая ячейка таблицы означает отсутствие данных (ПЦР с указанными праймерами не проводили). Видоспецифические праймеры: 1 — *Aspergillus niger*; 2 — *A. carbonarius*; 3 — *A. tubingensis*; 4 — *A. welwitschiae*; 5 — *A. flavus*; 6 — *A. parasiticus*; 7 — *A. ochraceus*; 8 — *A. fumigatus*; 9 — *A. nomius*.

одному — как *A. tubingensis* и *A. carbonarius* (табл. 4); все восемь изолятов морфотипа секции *Flavi* определены как *A. flavus*; из пяти изолятов секции *Circumdati* два штамма дали положительный результат с праймерами *A. ochraceus*, а для трех других положительной ПЦР не было отмечено; штамм из секции *Fumigati* был идентифицирован как *A. fumigatus*.

Анализ продукции токсичных метаболитов. Сравнительные исследования токсиногенных свойств 34 изолятов на рисовой среде и КСА в условиях *in vitro* показали выявление на рисовой среде большего числа видов МТ и наибольшие уровни их синтеза для всех исследованных видов МТ (табл. 5). Из 20 штаммов *A. niger* у 12 была выявлена продукция ФБ2, при этом уровень синтеза

Таблица 5. Видовая принадлежность изолятов *Aspergillus* spp. по результатам полифазного анализа

№ штамма	Видовая принадлежность на основе		Микотоксины, продуцируемые в условиях <i>in vitro</i> : мг/кг субстрата	Видовая принадлежность на основе полифазного подхода
	морфологии	молекулярного анализа		
23/2, 25/2, 28/1, 29/1, 29/2, 30/1, 31/1, 31/3, 32/1, 34/1, 36/1, 37/1, 37/2	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	ФВ2: 0.017–24.1	<i>A. niger</i>
22/2, 28/2, 33/1, 35/4, 38/1		<i>A. niger</i>	ОТА: 0.9	<i>A. niger</i>
22/3		<i>A. niger</i>	н/о	<i>A. niger</i>
28/3		<i>A. tubingensis</i>	н/о	<i>A. tubingensis</i>
30/2, 34/2, 35/2, 38/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Flavi</i>	<i>A. carbonarius</i>	н/о	<i>A. carbonarius</i>
25/3, 31/2, 32/3, 36/2,		<i>A. flavus</i>	АФЛ В1: 11.9–27.9; АФЛ В2: 0.15–1.44; СТП: 0.01–0.66	<i>A. flavus</i>
30/4, 33/2	<i>Aspergillus</i> секции <i>Circumdati</i>	<i>A. flavus</i>	н/о	<i>A. flavus</i>
27/2, 35/1, 37/3		<i>A. ochraceus</i>	ПК: 0.07–0.15	<i>A. ochraceus</i>
		вид не установлен	ОТА: 6.0; 145.4 и 518.0; ПК: 0.81; 0.95 и 0.57	<i>A. westerdijkiae</i>
24/2	<i>Aspergillus</i> секции <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	н/о	<i>A. fumigatus</i>

Примечание: “н/о” – не обнаружено.

на рисовой среде в 1.1–130 раз превышал таковой на среде КСА, из них у трех изолятов продукция ФВ2 на КСА отсутствовала вовсе. Один штамм *A. niger* (37/2) продуцировал ОТА в небольших количествах на обоих видах субстратов, остальные пять штаммов *A. niger* и штаммы *A. tubingensis* и *A. carbonarius* были не токсиногенными.

Среди восьми штаммов *A. flavus* только четыре (30/2, 34/2, 35/2 и 38/3) были токсиногенными и синтезировали на рисовой среде одновременно афлатоксины (В1 и В2) и СТП, причем на КСА продукция АФЛ В2 не была выявлена ни у одного штамма, а продукция АФЛ В1 обнаруживалась только у двух штаммов, но в значительно меньших количествах, уровни которых были ниже в 8 и 1100 раз. Штаммы 25/3, 31/2, 32/3, 36/2 токсины не продуцировали.

Из пяти штаммов секции *Circumdati* три (27/2, 35/1, 37/3) накапливали на рисовой среде ОТА на очень высоких уровнях – 6.0, 145.4 и 518.0 мг/кг субстрата, соответственно (что превышало таковой на КСА от 2.5 до 830 раз), а также ПК в количествах от 0.57 до 0.95 мг/кг субстрата. Два штамма *A. ochraceus* (30/4 и 33/2) производили только ПК на рисовой среде – 0.15 и 0.07 мг/кг субстрата, соответственно. Штамм *A. fumigatus* не продуцировал ни один из исследованных МТ.

Обобщенные результаты исследования 34 штаммов, полученные при культурально-морфологическом, молекулярно-генетическом и хемотаксономическом анализе, представлены в табл. 5. Видовая принадлежность 31 штамма подтверждена молекулярно-генетическим методом, а для трех указана видовая принадлежность с учетом совокупности полученных характеристик.

ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексный подход при изучении видового состава микромицетов зерен зеленого кофе позволил получить наиболее полную характеристику выделенных изолятов. Род *Aspergillus* включает разнообразные группы видов, дифференциация которых, ранее основанная на фенотипических признаках, в последние десятилетия сильно расширилась с учетом молекулярных и хемотаксономических характеристик. Для описания видов и выявления фенотипических отличий ранее были предложены наиболее информативные диагностические инструменты, включающие описание макроскопических (темпы роста колоний при разных температурах, текстуру, степень споруляции, продукцию склероциев, цвет мицелия и реверса, пигментацию, эксудацию и др.) и микроскопических характеристик (форма конидиальных голо-

вок, их расположение, размер и форма везикул, метул, фиалид, конидий, особенности скульптуры поверхности конидий, и др.) (Samson et al., 2014). Как известно, *Aspergillus* sect. *Nigri* считается одной из наиболее сложных групп в отношении классификации и фенотипической идентификации ввиду схожести морфологических характеристик (Samson et al., 2007).

Применение вышеуказанных диагностических методик позволило четко выделить 20 штаммов в группу секции *Nigri*, отличающуюся от других групп наличием кислотообразования, а внутри группы выявить *A. carbonarius* (28/3), видовая принадлежность которого была подтверждена с видоспецифичными праймерами. Для остальных морфологически близких изолятов видовая дифференциация была проведена в результате анализа ПЦР: 18 штаммов идентифицированы как *A. niger*, один *A. tubingensis* (22/3). Среди штаммов *A. niger* 12 продуцировали ФВ2 и один ОТА, остальные пять штаммов *A. niger*, а также *A. carbonarius* и *A. tubingensis* были нетоксиногенными. Образование ФВ2 штаммами *A. niger* в условиях *in vitro* варьировало от низких значений (0.017 мг/кг субстрата) до высоких — 24.1 мг/кг (табл. 5), достигая уровней, сопоставимых с продукцией этого МТ типичным продуцентом — *Fusarium verticillioides*. Стоит отметить, что продуцент ОТА штамм 37/2 был выделен из образца кофе, выращенного в Танзании, а продуценты ФВ2 были выделены из образцов кофе различного географического происхождения (Бразилия, Куба, Гватемала, Гондурас, Уганда, Эфиопия, Танзания и Индия) (табл. 1 и 5), что свидетельствует о широком распространении фумонизинпродуцирующих видов *A. niger*. Способность *A. niger*, выделенных из зерен зеленого кофе, синтезировать ОТА, была описана в 2004 г. (Samson et al., 2004), а ФВ2 — в 2008 г. (Noonim, 2008). Также в секции *Nigri* были описаны другие ОТА-продуцирующие виды, изолированные из кофе (*A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* и *A. carbonarius*), последний часто выделяется также из винограда и изюма (Samson et al., 2004).

В следующей группе секции *Flavi* все восемь изолятов идентифицированы с видоспецифичными праймерами как *A. flavus*. У половины штаммов *A. flavus* обнаружена способность к синтезу одновременно нескольких МТ: АФЛ (В1 и В2) и СТЦ (табл. 5). Как известно, СТЦ является биогенным предшественником АФЛ В1, при этом не все продуценты афлатоксинов способны к совместному их накоплению. Такая способность в секции *Flavi* описана для видов *A. nidulans*, *A. motae* и *A. togoensis* (Frisvad et al., 2019). В генетической регуляции кластеров генов афлатоксина и стеригматоцистина положительную роль играет регуляторный ген *aflR*, однако нарушение регуляции может тормозить превращение СТЦ в АФЛ и приводить к накоплению последнего (Yu et al.,

2011). Штаммы *A. flavus*, способные к накоплению высоких уровней АФЛ В1, были выделены из образцов, полученных из Гватемалы, Бразилии, Колумбии и Вьетнама.

К группе секции *Circumdati* фенотипически были отнесены пять изолятов, из которых три (27/2, 35/1, 37/3) имели морфологические признаки характерные для *A. westerdijkiae*, у двух других изолятов (30/4 и 33/2) результатами ПЦР анализа была подтверждена принадлежность к виду *A. ochraceus* (табл. 4). Все штаммы продуцировали ПК, при этом синтез опасного ОТА был выявлен только у трех штаммов (27/2, 35/1, 37/3), причем на очень высоких уровнях — до 518 мг/кг. По опубликованным данным, в секции *Circumdati* наиболее важными видами, с точки зрения потенциального образования ОТА в кофе, являются *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* и *A. steynii* (Frisvad et al., 2004), причем для *A. ochraceus* характерно нестабильное производство ОТА как в малых, так и в больших количествах, в то время как для *A. westerdijkiae* отмечены стабильно высокие уровни синтеза ОТА и высокая частота обнаружения в кофейных зернах (Noonim et al., 2008). При исследовании источников ОТА в бразильском кофе *A. westerdijkiae* был признан основным видом, продуцирующим ОТА (Taniwaki et al., 2019). Синтез ПК ранее был отмечен у большинства видов секции *Circumdati* (24 из 27), включая *A. ochraceus* и *A. westerdijkiae*, но при этом отсутствовал у *A. steynii* (Visagie et al., 2014). Морфологически *A. westerdijkiae* отличается от *A. steynii* розовым цветом склероциев, тогда как *A. steynii* формирует желтовато-зеленые склероции, а от *A. ochraceus* отличается отсутствием роста при 36°C и стабильной продукцией желтовато-оранжевого пигмента на среде СУА при 33°C (Visagie et al., 2014). С учетом фенотипических характеристик и высоких уровней продукции ОТА и ПК, три штамма (27/2, 35/1 и 37/3) были отнесены к *A. westerdijkiae*. Регионы происхождения образцов показывают широкую географическую распространенность видов секции *Circumdati* — *A. ochraceus* выделен из образцов, произведенных в Гватемале и Индии, а изоляты *A. westerdijkiae* — суперпродуценты ОТА из образцов, полученных из Колумбии и Танзании.

Секция *Fumigati* была представлена одним изолятом *A. fumigatus*, выделенным из бразильского кофе, видовая принадлежность которого была определена при ПЦР с видоспецифичными праймерами. Основной средой обитания *A. fumigatus* является разлагающаяся растительность, этот вид часто обнаруживают в тропических регионах в продуктах, в которых при хранении происходит процесс самопроизвольного нагревания, например, на стадиях ферментации и сушки кофе. Способность расти одновременно при низкой активности воды и высоких температурах обеспечивает этому виду экологическое преимущество. Сооб-

шалось, что *A. fumigatus* являлся одной из причин посторонних привкусов кофе “Рио” (Liardon et al., 1992), но при этом не являлся причиной серьезной порчи (Pitt et al., 2009). У выделенного в данном исследовании штамма (24/2) продукция МТ не была выявлена (табл. 5).

Показано, что наиболее полно потенциальные токсинопродуцирующие способности *Aspergillus* spp. выявляются на среде с рисом. Высокие уровни ФВ2 до 54 мг/кг и ОТА до 0.43 мг/кг, синтезируемые на рисовой среде и превышающие таковые на других видах питательных субстратов (СУА, РДА), были показаны также в исследованиях, проводимых на штаммах *A. niger* — промышленных продуцентах, используемых в пищевой промышленности (Han et al., 2017, 2019).

Полифазный подход позволяет получать надежные данные о видовом составе, расширенную характеристику профиля токсичных метаболитов и наиболее полную характеристику новых штаммов микромицетов. Полученные авторами результаты видового состава грибов рода *Aspergillus* с доминированием *A. niger* на фоне присутствия *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. fumigatus* в зернах зеленого кофе согласуются с результатами других исследователей, которые также отмечали похожий состав *Aspergillus* spp. с преобладанием *A. niger* (Perrone et al., 2007; Frisvad et al., 2004; Pitt et al., 2009). Анализ вторичных метаболитов, накопленных в условиях *in vitro*, показал у выделенных штаммов высокий потенциала токсинообразования. Так, 20 из 34 штаммов продуцировали в значительных количествах как опасные, регламентируемые МТ: АФЛ В1, ОТА, ФВ2, так и эмерджентный МТ — СТЦ. Это подтверждает наличие высокого риска загрязнения кофе МТ на стадиях ферментации, сушки и других, предшествующих стадии обжарки, в случаях нарушения технологических режимов. Наличие высокотоксичных штаммов рода *Aspergillus* вызывает особую настороженность, в связи с тем, что отдельные виды *Aspergillus*, преимущественно *A. niger*, наиболее широко используются в качестве промышленных продуцентов различных пищевых ферментов, органических кислот и других продуктов микробного синтеза (Frisvad et al., 2011; Han et al., 2017, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение видового состава микромицетов рода *Aspergillus* выделенных из внутренней микофлоры 16 образцов зерен зеленого кофе сортов арабика и робуста, выращенных в регионах Африки, Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, полученных из розничной сети Московского региона. С применением полифазного подхода культурально-морфологическими методами определены фенотипы 34 изолятов

Aspergillus spp., молекулярно-генетическим анализом уточнена их видовая принадлежность, в условиях *in vitro* изучен профиль продуцируемых токсических метаболитов. Установлено доминирование в микофлоре кофе токсиногенных видов *A. niger*, большинство из которых продуцировали ФВ 2, а один опасный ОТА. В группе *Aspergillus* секции *Flavi* половина штаммов *A. flavus* продуцировала одновременно АФЛ (В1 и В2) и СТЦ (ЭМТ). В секции *Circumdati* все изоляты *A. ochraceus* и *A. westerdijkiae* синтезировали ПК и только *A. westerdijkiae* — ОТА. Количественные уровни продуцируемых МТ демонстрируют высокий токсиногенный потенциал *Aspergillus* spp. — контаминантов зеленого кофе. Нетоксиногенные изоляты были представлены видами *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus* и *A. fumigatus*. Изучение видового состава и токсиногенных свойств грибов рода *Aspergillus* — контаминантов зеленого кофе проведено в России впервые.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда “Эмерджентные микотоксины в пищевых продуктах растительного происхождения: разработка методов анализа, изучение контаминации, видовая характеристика микромицетов-продуцентов, разработка гигиенических нормативов” (проект № 18-16-00077-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Al-Shuhaib M.B.S., Albakri A.H., Alwan S.H. et al. Optimal pcr primers for rapid and accurate detection of *Aspergillus flavus* isolates. Microb Pathog. 2018. V. 116. P. 351–335. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.049>
- Commission Regulation (EC) No 1831/2006. Commission Directive 2006/1831/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Off. J. Eur. Commun. 2006. L364. P. 5–24.
- El Sheikh A.F. Molecular detection of mycotoxigenic fungi in foods: The case for using PCR-DGGE. Food Biotechnol. 2019. V. 33 (1). P. 54–108. <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1547644>
- Frisvad J.C., Frank J.M., Houbaken J.A.M.P. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Stud. Mycol. 2004. 50. P. 23–43.
- Frisvad J.C., Hubka V., Ezekiel C.N. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud. Mycol. 2019. V. 93. P. 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Frisvad J.C., Larsen T.O., Thrane U. et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. PLOS One. 2011. V. 6 (8). P. e23496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023496>
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Levitin M.M. et al. *Fusarium* head blight. Zashchita i karantin rasteniy. Supplement. 2011. N 5. P. 69–120 (in Russ.).
- Godet M., Munaut F. Molecular strategy for identification in section *Flavi*. FEMS Microbiol. Letters. 2010. V. 304 (2). P. 157–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x>

- González-Salgado A., González-Jaén T., Vázquez C. et al. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants*. 2008. V. 25 (6). P. 758–764. <https://doi.org/10.1080/02652030701765715>
- Grube M., Gaya E., Kauserud H. et al. The next generation fungal diversity researcher. *Fungal Biology Reviews*. 2017. 31. P. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.02.001>
- Han X., Jiang H., Xu J. et al. Dynamic fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* intended used in food industry in China. *Toxins*. 2017. V. 9 (7). P. 217. <https://doi.org/10.3390/toxins9070217>
- Han X., Jiang H., Li F. Dynamic ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* intended used in food industry of China. *Toxins*. 2019. V. 11 (2). P. 122. <https://doi.org/10.3390/toxins11020122>
- Inderbitzin P., Robbertse B., Schoch C.L. Species identification in plant-associated prokaryotes and fungi using DNA. *Phytobiomes Journal*. 2020. V. 4. P. 103–114. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-19-0067-RVW>
- Ipatova A.A. Overview of the Russian coffee market in 2017–2019. *Russian food market*. 2020. № 1 (in Russ.).
- Jens C., Frisvad J., Frank M. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 2004. V. 50. P. 23–43.
- Jurjevic Z., Peterson S.W., Horn B.W. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*. 2012. V. 3 (1). P. 59–79. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2012.03.01.07>
- Liardon R., Braendlin N., Spadone J.C. Biogenesis of Rio flavour impact compound: 2,4,6-trichloroanisole. In: *Proc. 14th Int. Conf. Coffee Sci.*, San Francisco, 14–19 July 1991. Paris, Assoc. Sci. Int. Café, 1992, pp. 608–614.
- Minaeva L.P., Polyana A.S., Kiseleva M.G. et al. Dried fruits marketed in Russian: toxigenic mold contamination. *Gigiena i sanitariya*. 2021. V. 100 (7). P. 717–723 (in Russ.). <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-717-723>
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 2008. V. 128 (2). P. 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- Palumbo J.D., O’Keeffe T.L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. *Letters Appl. Microbiol.* 2015. V. 60. (2). P. 188–195. <https://doi.org/10.1111/lam.12358>
- Perrone G., Susca A., Cozzi G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.* 2007. 59. P. 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
- Pitt J.I., Hocking A.D. *Fungi and food spoilage*. 3rd Edition, Springer Dordrecht, Heidelberg, etc., 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Samson R.A., Houbraken A.M.P., Kuijpers A.F.A. et al. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 2004. V. 50 (1). P. 45–61.
- Samson R.A., Noonim P., Meijer M. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol.* 2007. V. 59. P. 129–145. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.13>
- Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 2014. V. 78. P. 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sardiñas N., Vázquez C., Gil-Serna J. et al. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 145 (1). P. 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.041>
- Sedova I.B., Chalyy Z.A., Efimochkina N.R. et al. Mycotoxin contamination of fresh berries and fruits marketed in the central region of Russia. *Health Risk Analysis*. 2022. V. 4. P. 87–99. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.08.eng>
- Serrano R., Gusmão, L., Amorim A. et al. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. Art. 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-82>
- Taniwaki M.H., Pitt J.I., Copetti M.V. et al. Understanding mycotoxin contamination across the food chain in Brazil: Challenges and opportunities. *Toxins*. 2019. V. 11 (7). P. 411. <https://doi.org/10.3390/toxins11070411>
- Visagie C.M., Varga J., Houbraken J. et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud. Mycol.* 2014. V. 78. P. 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>
- White T.J., Bruns T., Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis etc. (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. N.Y., Academic Press Inc., 1990, pp. 315–322.
- Yu Ji., Nierman W.C., Fedorova N.D. et al. What can the *Aspergillus flavus* genome offer to mycotoxin research? *Mycology*. 2011. V. 2 (3). P. 218–236. <https://doi.org/10.1080/21501203.2011.605180>
- Гагкаяева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М. и др. (Gagkaeva et al.) Фузариоз зерновых культур // Приложение к журналу “Защита и карантин растений”. 2011. № 5. С. 69–120.
- Ипатова А.А. (Ipatova) Обзор российского рынка кофе в 2017–2019 году // Российский продовольственный рынок. 2020. № 1.
- Минаева Л.П., Полянина А.С., Киселева М.Г. и др. (Minaeva et al.) Изучение контаминации сухофруктов токсигенными плесневыми грибами // Гигиена и санитария. 2021. Т. 100. № 7. С. 717–723.
- Чалый З.А., Киселева М.Г., Седова И.Б. и др. (Chalyy et al.) Изучение контаминации сухофруктов микотоксинами // Вопросы питания. 2021. Т. 90. № 1. С. 33–39.

Identification of Green Coffee Contaminated Microfungi of the Genus *Aspergillus* on the Basis of Polyphasic Approach

L. P. Minaeva^{a,#}, Yu. M. Markova^{a,##}, A. D. Evsyukova^{a,###}, I. B. Sedova^{a,####}, and Z. A. Chalyy^{a,#####}

^aFederal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 109240 Moscow, Russia

[#]e-mail: liuminaeva-ion@mail.ru

^{##}e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com

^{###}e-mail: st.shtolz@gmail.com

^{####}e-mail: isedova1977@mail.ru

^{#####}e-mail: tokka66@bk.ru

The *Aspergillus* species are widespread in the environment, able to grow at high temperatures and minimal humidity, including in regions with a hot tropical climate. Some species have the potential to produce toxins. This causes the risk of contamination by fungi of the genus *Aspergillus* and the mycotoxins (MT) produced by them of plant materials and food products, which is possible at any stage of production, transportation and storage. In the volume of coffee imported to the Russian Federation, 85% is accounted for by raw materials (green coffee), for which the risks of mold damage remain at all stages preceding the roasting stage. It is relevant to study the species composition and toxinogenic properties of *Aspergillus* spp., which contaminate food raw materials for the production of mass consumption foodstuffs. Contaminated products include coffee, which is one of the basic products of the consumer basket. Reliable data on species identification and toxigenic potential of *Aspergillus* spp. can be obtained only with an integrated approach based on polyphasic taxonomy. The purpose of this work is to study the species composition of fungi of the genus *Aspergillus* isolated from green coffee using an integrated approach based on polyphasic taxonomy. The species composition of fungi of the genus *Aspergillus* from the internal mycoflora of 16 samples of green coffee beans of Arabica and Robusta. The species belonging of the isolated 34 single-spore isolates of *Aspergillus* spp. was determined by cultural and morphological methods and confirmed by molecular genetic analysis, i.e., RT-PCR with DNA markers of conservative sequences (*ITS*, *CaM*, β -*tub*), studied *in vitro* profile of produced secondary toxic metabolites. The dominance of species of the *Niger* section was established (*A. niger*, 90%, and *A. tubingensis*, *A. carbonarius*); then, in decreasing order, the species of section *Flavi* followed (*A. flavus*, 100%), sections *Circumdati* (*A. ochraceus*, 40% and *A. westerdijkiae*, 60%). In section *Fumigati* there was one strain of *A. fumigatus*. Analysis of the profile of toxic metabolites by HPLC-MS/MS in the multi-detection mode showed the production of mycotoxins by the following species: *A. niger* – fumonisin B2 and ochratoxin A, *A. flavus* – aflatoxins B1 and B2 together with sterigmatocystin, *A. westerdijkiae* – ochratoxin A and penicillic acid, *A. ochraceus* – penicillic acid. Amounts of produced MT show a high toxinogenic potential of *Aspergillus* spp. Thus, 20 out of 34 strains produced significant amounts of dangerous, regulated mycotoxins: AFL B1, OTA, FB2. Non-toxinogenic isolates were represented by the species *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus*, and *A. fumigatus*. A study of the species composition and toxinogenic properties of green coffee contaminants of the genus *Aspergillus* using a polyphasic approach was carried out in Russia for the first time.

Keywords: *Aspergillus*, coffee, HPLC-MS/MS, emerging mycotoxins, mycotoxins, PCR, toxinogenicity

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 575.2: 632.4 + 633.111

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИТОВ CAD-IM ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЗАРАЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕМ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ

© 2023 г. А. А. Коновалов^{1,*}, Е. А. Орлова^{2,**}, Е. В. Карпова^{3,***}, И. К. Шундрин^{3,****},
А. А. Нефедов^{3,*****}, Н. П. Гончаров^{1,*****}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
630090 Новосибирск, Россия

²Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН,
630501 Новосибирская обл., пос. Краснообск, Россия

³Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
630090 Новосибирск, Россия

*e-mail: konov@bionet.nsc.ru

**e-mail: orlova.lena10@yandex.ru

***e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru

****e-mail: ishund@nioch.nsc.ru

*****e-mail: nefyodov@nioch.nsc.ru

*****e-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 06.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Определение роли конкретных генов и их продуктов в устойчивости растений к стрессовым факторам, в том числе и биотической природы, является актуальной задачей фитопатологии и дает дополнительную информацию для практического использования. У яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* изучали генотипы CAD^{im} (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, дегидрогеназа коричневого спирта; КФ 1.1.1.195), влияющие на устойчивость к бурой ржавчине. Устойчивый и восприимчивый генотипы выращивали на инфекционном фоне и при его отсутствии. Ткани растений изучали по ряду показателей, в том числе по содержанию фенилпропаноидных метаболитов, а также стерина и сапонинов. По фенилпропаноидам наблюдается увеличение относительного содержания ряда метаболитов под действием инфекции, особенно кониферилацетата и синапового альдегида. Обнаружено уменьшение относительного содержания некоторых стерина у устойчивого генотипа CAD^{im+} под влиянием инфекции. Предполагается, что у устойчивого генотипа CAD^{im+} под влиянием инфекции происходит переключение ацетатно-мевалонатного пути метаболизма с синтеза стерина на синтез защитных веществ – фитоалексинов.

Ключевые слова: грибная инфекция, дегидрогеназа коричневого спирта, пшеница, сапонины, стерин, химический состав тканей, фенилпропаноиды

DOI: 10.31857/S0026364823030066, **EDN:** VCOYPRQ

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость растений к патогенам бывает двух типов: конститутивная и индуцибельная (Efroimson, 1971; Rubin et al., 1975; Dyakov et al., 2001; Chesnokov, 2007). Первая обусловлена свойствами тканей растений, существующими изначально, вторая обеспечивается метаболическими изменениями в ответ на влияние инфицирующего агента.

Полиморфизм по генам, кодирующим CAD (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, дегидрогеназа коричневого спирта; КФ 1.1.1.195), описанный у ряда видов растений, во многих случаях приводит к

существенным изменениям свойств и признаков растения, в том числе влияет на устойчивость к патогенам (Kononov et al., 2015). Защитный белок ELI3, выделенный из петрушки и контролирующей устойчивость к паразитическому грибу *Phytophthora sojae*, оказался ферментом CAD (Somssich et al., 1996), субстратами для которого служат ароматические альдегиды. Попадание гриба *Botrytis cinerea* на поврежденные ткани пшеницы вызывает увеличение активности ароматических дегидрогеназ, в том числе CAD (Mitchell et al., 1994). Гены CAD-C и CAD-D арабидопсиса вовлечены в устойчивость к патогену *Pseudomonas*

syringae (Tronchet et al., 2010). Ген CAD1A показал достоверные различия в экспрессии в ответ на заражение у устойчивых и восприимчивых генотипов льна к *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (фузариозное увядание льна) (Novakovskiy et al., 2019). Устойчивый к *F. graminearum* генотип пшеницы Fhb1 имел утолщенную клеточную стенку за счет отложения флавоноидов и амидов гидроксикоричной кислоты, что в свою очередь было вызвано повышением активности ферментов фенилпропаноидного пути метаболизма, в том числе CAD (Gunnaiah et al., 2012). Влияние генотипов CAD на устойчивость к грибным инфекциям обнаружено на китайских сортах пшеницы (Rong et al., 2016).

Полиморфизм CAD (ранее называемый ароматическая алкогольдегидрогеназа) был описан у видов рода *Triticum* (Jaaska, 1978; Hart, 1987). В нашей предыдущей работе был выявлен внутривидовой полиморфизм CAD и было установлено (Kononov et al., 2020; 2021a), что генотипы по трем локусам CAD мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) различаются по устойчивости к мучнистой росе (возбудитель *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) и бурой ржавчине (возбудитель *Puccinia triticina*). Наибольший вклад в устойчивость или восприимчивость растений к мучнистой росе и бурой ржавчине вносят аллельные варианты по локусу CAD-im (Kononov et al., 2021a).

Цель работы заключалась в изучении состава метаболитов устойчивого и восприимчивого к бурой ржавчине CAD-im генотипов мягкой пшеницы, выращенных на инфекционном фоне и при его отсутствии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полиморфные варианты CAD были получены от скрещивания устойчивого к мучнистой росе и бурой ржавчине ярового сорта Новосибирская 61 с восприимчивым яровым сортом Скала и использовали для анализа расщепления в потомствах F₂ (Kononov et al., 2021b). В последующем были получены потомства F₅, из которых два контрастных образца, 9-1 (восприимчивый, генотип CAD^{im-}/CAD^{im-}) и 9-65 (устойчивый, генотип CAD^{im+}/CAD^{im+}) выращивали на инфекционном поле СибНИИРС (координаты 54°52'48.4"N 82°59'48.2"E) и в гидропонной теплице ИЦИГ. На инфекционном поле присутствуют популяции возбудителей грибных инфекций, в частности бурой ржавчины и мучнистой росы. Болезни сначала проявлялись на озимых посевах, затем переходили на яровые. Сначала проявлялась мучнистая роса, заражение происходило естественным путем, фенотипы по устойчивости/восприимчивости регистрировали 03.07. Заражение проростков спорами возбудителя бурой ржавчины проводили искусственно, опрыскиванием растений суспензией спор в 0.1%-м р-ре агара для прилипания,

фенотипы регистрировали в середине июля. Лабораторную оценку проводили только по бурой ржавчине, через 7 дней после искусственного заражения спорами. По распространенности других болезней (пыльная головня, септориоз) использованные образцы не различались.

Растения, выращенные в теплице, не подвергались воздействию грибной инфекции в отличие от растений, выращенных в поле. Все растения для проведения анализов были собраны после созревания зерна и высушены на воздухе.

Изоферментные спектры CAD определяли методом гель-электрофореза, с последующей окраской на CAD-активность тетразолиевым методом, с использованием НАДФ в качестве кофактора и коричневого спирта в качестве субстрата (Jaaska, 1978; Hart, 1987).

Определение содержания лигнина Комарова и кислоторастворимого лигнина (КРЛ), целлюлозы Кюршнера–Хоффера и экстрактивных веществ в стеблях растений проводили по стандартным методикам (Obolenskaya et al., 1965). Экстракцию проводили в аппарате Сокслета. Для этого точную навеску воздушно-сухого измельченного сырья (около 2 г) помещали в гильзу из фильтровальной бумаги, гильзу устанавливали в насадку аппарата Сокслета. В колбу аппарата наливали 300 мл спиртотолуольной смеси (1 : 2 по объему). Экстрагирование продолжали в течение 6–7 ч при энергичном кипении растворителя. Полученный экстракт помещали в высушенную до постоянной массы колбу, и отгоняли растворитель на ротационном испарителе. Колбу с экстрактивными веществами сушили в сушильном шкафу при температуре 103 ± 2°C до постоянной массы и взвешивали. Массовую долю экстрактивных веществ рассчитывали в % к абсолютно сухому сырью с учетом влажности, полученный экстракт использовали для определения содержания флавоноидов, и относительного содержания фенилпропаноидов и стероидов. Содержание золы определяли как остаток после нагревания измельченных стеблей при 575°C в течение 6 ч. Для каждого образца использовали две повторности.

Соотношение гидроксифенильных (H), гваяцильных (G) и сирингильных (S) звеньев в структуре лигнина определялось по содержанию продуктов нитробензольного окисления (Tarabanko et al., 2017). Разделение велось на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-анализатором Agilent 5973N (капиллярная колонка HP-5MS, диаметр колонки 0.25 мм, толщина слоя фазы 0.25 мкм, длина колонки 30 м; газ-носитель — гелий, скорость потока — 1 мл/мин; температура инжектора 280°C, температурный режим — 2 мин при 50°C, далее нагрев со скоростью 2°C/мин до 280°C, далее выдерживание при температуре 280°C в течение 20 мин). Пики хроматограмм идентифициро-

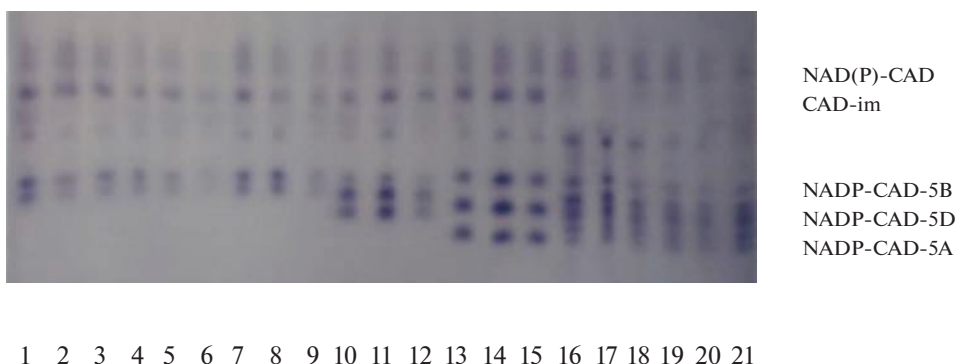


Рис. 1. Полиморфизм CAD у мягкой пшеницы: 1–9 – CAD-5A: –/–, CAD-5D: –/–, CAD^{im}: +/+; 10–12 – CAD-5A: –/–, CAD-5D: +/+, CAD^{im}: +/+; 13–15 – CAD-5A: +/+, CAD-5D: –/–, CAD^{im}: +/+; 16–21 – CAD-5A: +/+, CAD-5D: +/+, CAD^{im}: –/–.

вались по базам данных NIST17. Количество гваяцильных звеньев принимали за единицу.

Поверхности листьев и стеблей, а также срезы третьих междоузлий стеблей растений были исследованы с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) ТМ-1000 (Hitachi, Япония). Параметры работы СЭМ – ускоряющее напряжение 15 кэВ, режим низкого вакуума. Образцы фрагментов стеблей, листьев и поперечных срезов стеблей без предварительной обработки фиксировались на предметной столике с помощью токопроводящего скотча.

Для определения содержания флавоноидов навеску высушенного спирто-толуольного экстракта стеблей и листьев растений растворяли в этаноле в ультразвуковой ванне (УЗВ), р-р центрифугировали, аликвоту р-ра смешивали с раствором хлорида алюминия в этаноле, фотометрировали на спектрофотометре Cary-5000 (Varian, США), в 1 см кювете. Содержание флавоноидов определяли по калибровочному графику в эквиваленте апигенина на грамм сырья (мгАп/г).

Те же высушенные спирто-толуольные экстракты обрабатывали 10 мл хлороформа для извлечения фенольных соединений и стериннов. Полученные р-ры отделяли от осадка фильтрованием через мембранный фильтр. Фильтраты упаривали до 0.5 мл и использовали для хроматографического анализа. Хроматограммы полученных хлороформных растворов регистрировали на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent 7890В с масс-анализатором Agilent 5977В (капиллярная колонка HP-5MS, диаметр колонки 0.25 мм, толщина слоя фазы 0.25 мкм, длина колонки 30 м; газ-носитель – гелий, скорость потока – 1 мл/мин; температура инжектора 280°C, температурный режим – 2 мин при 50°C, далее нагрев со скоростью 10°C/мин до 280°C, далее выдерживание при температуре 280°C в течение 45 мин). Пики хроматограмм идентифицировали по базе данных NIST17. Со-

держание компонентов нормировали к содержанию кониферилового спирта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типы спектров CAD приведены на рис. 1. В нижней “быстрой” части зимограммы присутствуют изоферменты НАДФ-CAD (фермент, использующий в качестве кофактора НАДФ). Этот набор изоферментов контролируется локусами, локализованными в хромосомах 5-й гомеологической группы пшеницы (Jaaska, 1978; Hart, 1987). Самый быстрый изофермент – продукт локуса CAD-5A хромосомы 5A. По нему наблюдается полиморфизм: присутствие/отсутствие окрашенной зоны, аллельные варианты обозначаются соответственно + и –. В середине “быстрого” набора изоферментов локализованы продукты локуса CAD-5D хромосомы 5D. По этому локусу также есть полиморфизм, аллельные варианты + и –. Самый медленный изофермент “быстрого” набора изоферментов – продукт локуса CAD-5B хромосомы 5B, по этому локусу полиморфизм не обнаружен. Локализация генов основана на анализе нулли-тетрасомных и дителосомных линий (Jaaska, 1978).

Вверху, в “медленной” зоне зимограммы, локализованы изоферменты НАД(Ф)-CAD (это неспецифический фермент, проявляющий активность как с НАД, так и с НАДФ). Гены НАД(Ф)-CAD локализованы в хромосомах 6-й гомеологической группы (Jaaska, 1978). В этой зоне полиморфизм не обнаружен.

Изофермент CAD^{im} на зимограмме располагался между спектрами НАДФ-CAD (в “быстрой” зоне) и НАД(Ф)-CAD (в “медленной” зоне) (рис. 1), аллельные варианты выглядят как присутствие или отсутствие окрашенной зоны, соответственно. Аллельные варианты были обозначены как CAD^{im+} (наличие изофермента) и CAD^{im–} (отсутствие изофермента), генотипы соответственно +/+ или –/–. Хромосомная локализация данного гена не-

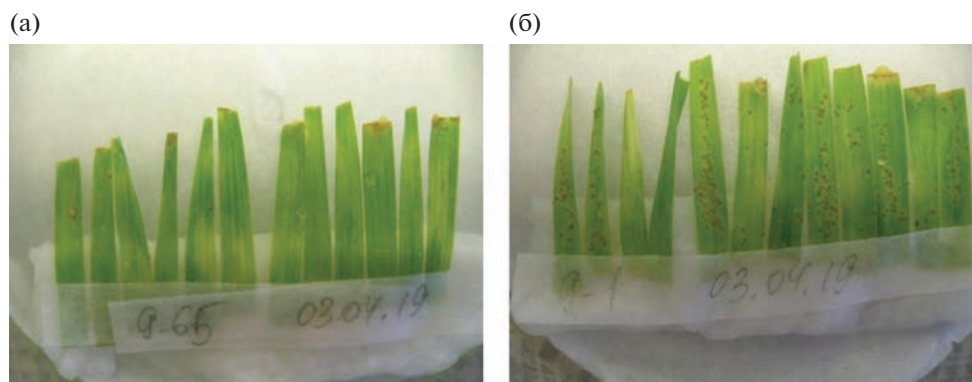


Рис. 2. Лабораторная оценка генотипов CAD на устойчивость к возбудителю бурой ржавчины: (а) потомство 9–65, оценка 0 баллов (устойчив); (б) потомство 9–1, оценка 3 балла (восприимчив).

известна, по анализу родословной сорта Новосибирская 61, возможно, это продукт пырейного замещения. Устойчивость сорта Новосибирская 61 к листовым инфекциям может быть унаследована от замещенной пшенично-пырейной линии АГИС 1 (через тулайковские сорта, см. родословная в статье Kopovarov et al., 2021b), несущей хромосомное замещение в 6D хромосоме 6Agi2 от пырея (пырей промежуточный – *Thinopyrum intermedium*) (Sibikeev et al., 2017; Ivanova et al., 2021). Поэтому можно предположить, что ген CAD^{im} представляет собой результат пырейного замещения по хромосоме 6D. CAD^{im} проявляет активность только с НАДФ, т.е. является НАДФ-CAD. Ранее было установлено, что именно генотипы по этому локусу вносят наибольший вклад в устойчивость или восприимчивость растений к мучнистой росе и бурой ржавчине (Kopovarov et al., 2021a). Гомозигота $CAD^{im} +/+$ (присутствует изофермент im

с промежуточной подвижностью) является устойчивой, гомозигота $CAD^{im} -/-$ (изофермент отсутствует) восприимчива к обеим болезням.

Согласно принципу единственного различия, были использованы гомозиготные генотипы $CAD^{im} +/+$ и $CAD^{im} -/-$.

На рис. 2 показаны результаты лабораторной оценки образцов на устойчивость к возбудителю бурой ржавчины. На рис. 3 приведены фенотипы растений выращенных на инфекционном поле летом 2019 г. По обоим результатам образец 9–1 сильно поражается мучнистой росой и бурой ржавчиной, образец 9–65 – устойчивый.

Надземную часть растений использовали для сравнительного химического анализа генотипов пшеницы, имеющих разную устойчивость к грибным инфекциям (табл. 1). Содержание целлюлозы в клеточной стенке изучаемых генотипов различается незначительно. Оно несколько выше у восприимчивого генотипа, однако, не отличается у растений, выращенных в отсутствие и присутствии возбудителя инфекции. По содержанию лигнина образцы 9–1 и 9–65 существенно не различались. Содержание золы выше в тепличных образцах, что может быть связано со спецификой выращивания растений в гидропонной теплице. Зола лигнина отражает содержание биогенного оксида кремния в растении. В растениях устойчивого генотипа содержание золы лигнина практически одинаково для тепличных и полевых образцов. В полевых растениях восприимчивого генотипа золы лигнина в два раза больше, чем в тепличных растениях.

Наблюдаются некоторые различия по мономерному составу лигнина. У растений обоих образцов, выращенных в теплице, доля гидроксифенильных и сиригильных звеньев увеличивается, доля гваяцильных звеньев уменьшается, видимо, это связано с различиями полевых и тепличных условий. У растений восприимчивого генотипа (и тепличных, и полевых) выше содержание гид-



Рис. 3. Фенотипы растений по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины, лето 2019, инфекционное поле СибНИИРС: 1–4 – 9–65 (поражение 0%); 5–8 – 9–1 (поражение 65%).

Таблица 1. Содержание основных компонентов стеблей различных генотипов пшеницы, % сухой массы

Компонент	восприимчивый генотип, 9–1		устойчивый генотип, 9–65	
	теплица	поле	теплица	поле
Целлюлоза	46.6	46.6	44.2	44.1
Лигнин по Комарову	20.7	21.5	18.3	19.1
Зола лигнина	0.034	0.068	0.057	0.053
Лигнин без золы	20.03	20.02	17.21	18.07
КРЛ (кислоторастворимый лигнин)	0.019	0.015	0.016	0.022
Зола	9.3	5.6	10.0	4.4
Экстрактивные вещества	12.1	6.7	15.3	15.9
Содержание флавоноидов в сырье, мгАп/г				
Стебли	7.03	6.58	6.06	6.69
Листья	9.50	7.01	6.24	5.70
Компонентный состав лигнина (гидроксифенильные, гваяцильные и сирингильные звенья), %				
H	13.4 ± 0.3	8.8 ± 0.6	11.0 ± 0.4	6.6 ± 0.2
G	31.7 ± 0.5	44.5 ± 0.4	31.1 ± 0.8	41.4 ± 0.4
S	54.9 ± 0.4	46.7 ± 0.7	57.8 ± 0.4	52.0 ± 0.4
H : G : S	0.42 : 1.00 : 1.73	0.20 : 1.00 : 1.05	0.35 : 1.00 : 1.86	0.16 : 1.00 : 1.26

роксифенильных звеньев, у растений устойчивого генотипа выше содержание сирингильных звеньев. Поскольку генотипы 9–1 и 9–65 различаются по спектру CAD, различия по содержанию мономеров могут быть вызваны различиями по субстратной специфичности отдельных изоферментов NADP-CAD, которые обнаружены при очистке этого фермента у пшеницы и ее сородицей (Pillonel et al., 1992). По влиянию инфекции заметных различий не обнаружено, различия в поле и теплице у обоих образцов носят однонаправленный характер.

Содержание экстрактивных веществ у тепличных растений обоих генотипов близко. Однако, в тканях восприимчивых растений, выращенных на инфекционном поле, содержание экстрактивных веществ более чем в два раза ниже, чем в растениях устойчивого генотипа. Суммарное содержание флавоноидов в стеблях и листьях растений устойчивого генотипа не сильно расходятся в зависимости от места произрастания. У восприимчивого генотипа содержание флавоноидов заметно ниже в листьях растений, подвергшихся заражению.

Для тепличных и полевых растений определяли толщину клеточной стенки склеренхимных клеток, изучали поверхности стеблей и листьев (рис. 4, 5). Листья полевых растений взяты в середине вегетации, во время четкого развития болезни.

Толщина стенок клеток склеренхимы стеблей тепличных образцов составила 1.19 ± 0.07 мкм для устойчивого генотипа и 0.95 ± 0.05 для восприимчивого. Толщина клеток склеренхимы стеблей растений, выращенных на инфекционном поле,

составила 2.56 ± 0.11 мкм для устойчивого генотипа и 1.79 ± 0.04 для восприимчивого.

Поверхность стебля устойчивого генотипа покрыта папиллами в виде бляшек овальной формы и трихом, на стебле неустойчивого генотипа папиллы находятся преимущественно в виде бляшек овальной формы с единичными трихомами. На поверхностях зараженных листьев присутствуют папиллы обоих видов, но на поверхности листа растения устойчивого генотипа трихомы большего размера.

В составе фракции экстрактивных веществ, растворимой в хлороформе, методом ГХ-МС обнаружены насыщенные и ненасыщенные углеводороды, жирные кислоты, фенольные соединения и стерин. На рис. 6 приведены диаграммы относительного содержания этих соединений в хлороформной фракции экстрактивных веществ. Содержание компонентов нормировано к содержанию кониферилового спирта (№ 10, принят за 100%).

Как видно из данных ГХ-МС анализа в экстрактах растений, выращенных в различных по зараженности условиях, существенно различаются соотношения содержания одних и тех же веществ. В экстракте растений устойчивого генотипа, выращенных в теплице, относительное содержание практически всех стеринов (за исключением соединений 21, 32 и 33) и обоих сапонинов (β-амирин, № 25 и лупеол, № 28) выше, чем в экстракте неустойчивых растений. Относительное содержание большинства фенольных соединений также выше в тепличных растениях устойчивого генотипа, исключая 4-гидроксibenзальдегид, 3,4,5-три-

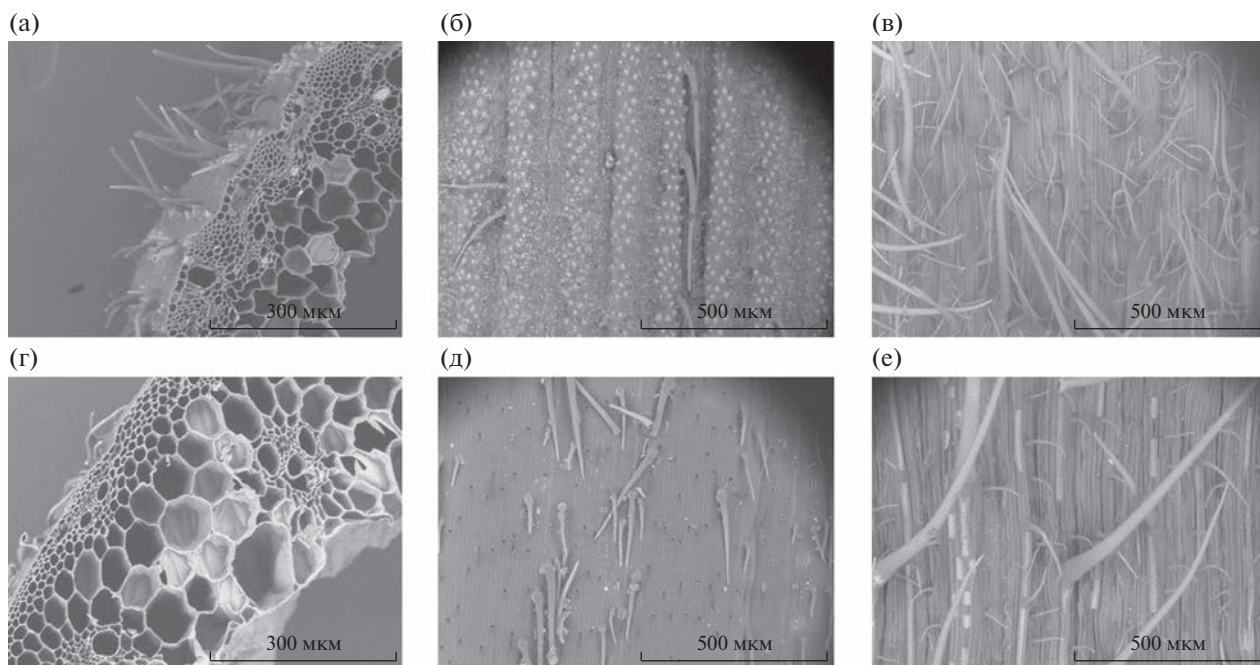


Рис. 4. СЭМ-изображения срезов стеблей (а, г), поверхностей стеблей (б, д), поверхностей листа (в, е) тепличных растений генотипов 9–65 (а, б, в) и 9–1 (г, д, е).

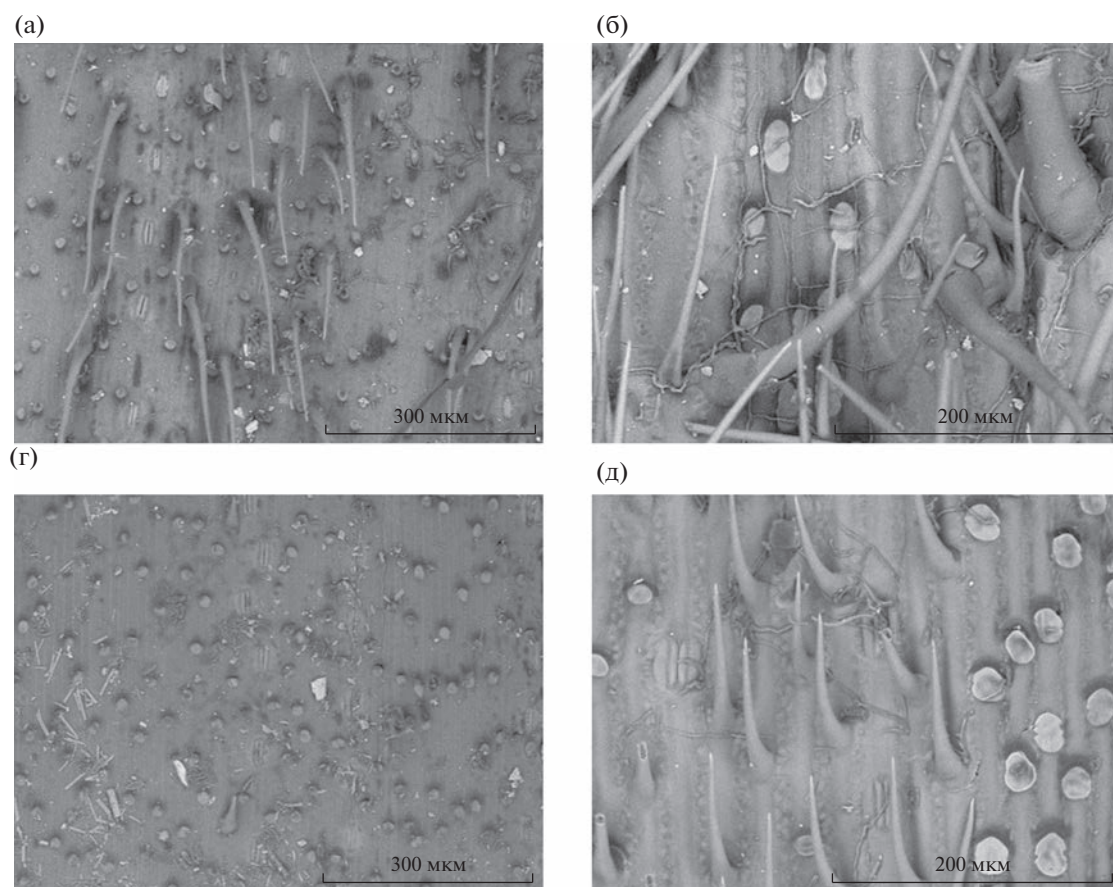


Рис. 5. СЭМ-изображения поверхностей стеблей (а, в), поверхностей листьев (б, г) полевых растений генотипов 9–65 (а, б) и 9–1 (в, г).

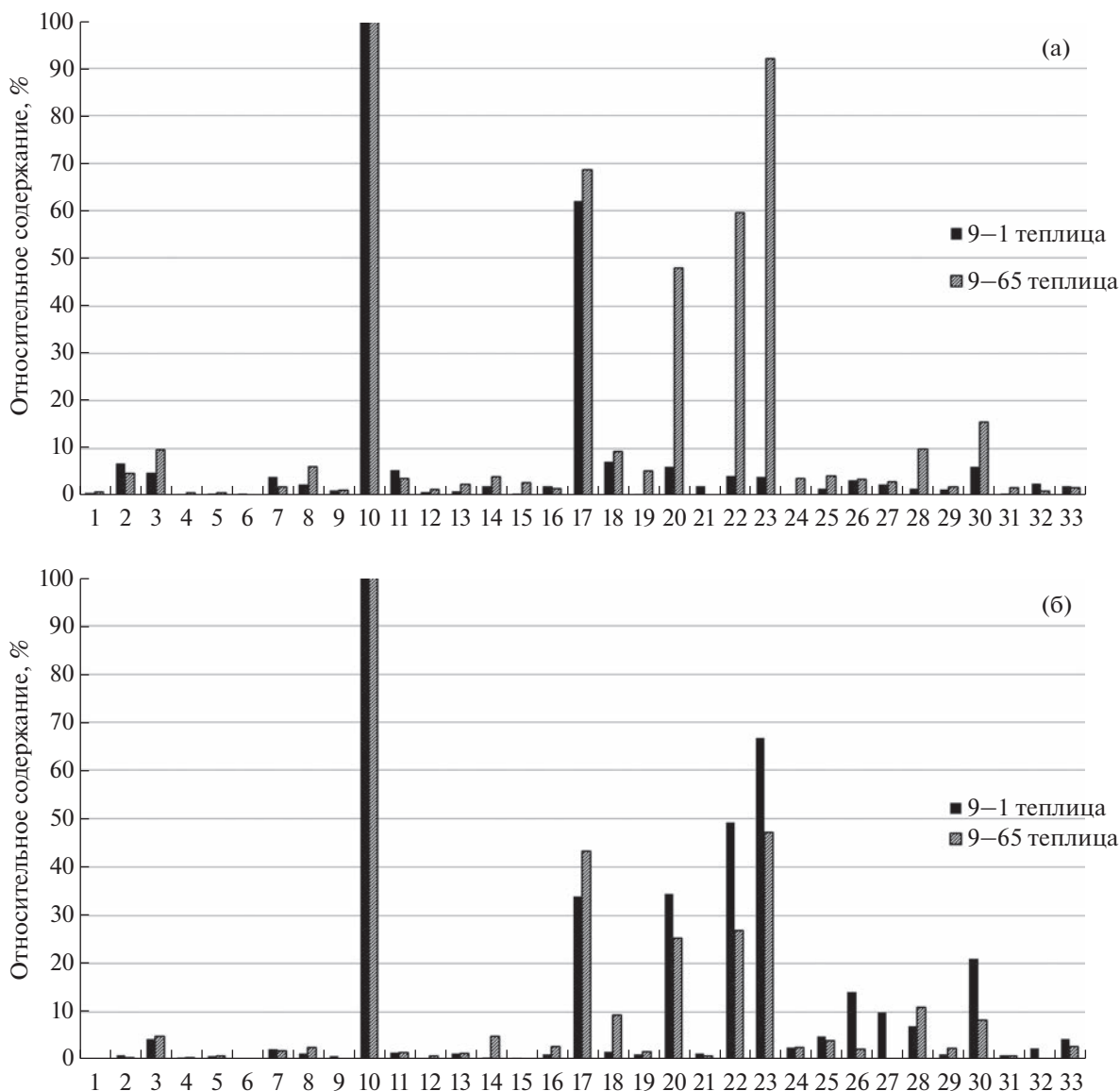


Рис. 6. Относительное содержание веществ фенольного типа и стероидов в стеблях растений генотипов 9–1 и 9–65, выращенных в теплице (а) и в условиях инфекционного поля (б): 1 – 2,6-диметоксифенол; 2 – 4-гидроксibenзальдегид; 3 – ванилин; 4 – ацетованиллон; 5 – бутированиллон; 6 – 3,4,5-триметоксифенол; 7 – *p*-кумаровый спирт; 8 – сиреневый альдегид; 9 – метиловый эфир гомованилиновой кислоты; 10 – кониферилловый спирт; 11 – *p*-гидроксикоричная кислота; 12 – сиреневая кислота; 13 – β -гидроксипропиованиллон; 14 – конифериллацетат; 15 – метил-2-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)ацетат; 16 – синаповый альдегид; 17 – синаповый спирт; 18 – трицин; 19 – холестерин; 20 – кампестерин; 21 – 4-кампестен-3-он; 22 – стигмастерин; 23 – β -ситостерин; 24 – стигмастанол; 25 – β -амирин; 26 – (24R)-эргост-4-ен-3-он; 27 – спинастерон; 28 – лупеол; 29 – стигмаста-3,5-диен-7-он; 30 – ситостенон; 31 – аборенон; 32 – 4,4-диметил-холестан-3-он; 33 – (3 β)-3-гидроксигидростигмаст-5-ен-7-он.

метоксифенол, *p*-кумаровый спирт, *p*-гидроксикоричную кислоту и синаповый альдегид.

В условиях инфекционного поля относительное содержание большинства фенольных соединений также выше в растениях устойчивого генотипа. Относительное содержание стероидов в этих растениях ниже, чем в тепличных. В растениях восприимчивого генотипа, выращенных на поле, относительное содержание стероидов резко воз-

росло по сравнению с тепличными растениями и для многих веществ превысило их содержание в растениях устойчивого генотипа.

Содержание сапонинов в экстракте растений устойчивого генотипа, выращенных на инфекционном поле, осталось на том же уровне, что и для тепличных растений. Однако в растениях восприимчивого генотипа их относительное содержание значительно увеличилось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генотипы CAD^{im} влияли на толщину клеточных стенок, устойчивый генотип CAD^{im+} имеет более толстую стенку. Устойчивый к *Fusarium graminearum* генотип пшеницы *Fhb1* имел утолщенную клеточную стенку за счет отложения флавоноидов и амидов гидроксикоричной кислоты, что в свою очередь было вызвано повышением активности ферментов фенилпропаноидного пути метаболизма, в том числе CAD (Gunnaiah et al., 2012). Эти авторы предположили, что утолщение клеточной стенки является механизмом потенциальной устойчивости. Вероятно, утолщение клеточных стенок может являться дополнительным механизмом устойчивости, который не всегда присутствует. В нашем предыдущем исследовании на других образцах генотипы CAD^{im} по толщине клеточных стенок стебля не различались, а по некоторым микроморфологическим параметрам восприимчивый генотип даже превосходил устойчивый (Konovalov et al., 2021a). Папиллы и трихомы представляют собой динамические защитные структуры, которые могут сильно влиять на исход многих взаимодействий растения с окружающей средой. Было показано (Gupt et al., 2021), что генотипы мягкой пшеницы с высоким содержанием трихом на листе имели высокую устойчивость к поражению темно-бурой пятнистостью. Устойчивый генотип 9–65 также показал высокую опушенность листьев, которая может служить дополнительным барьером к заражению.

Согласно литературным данным в механизме защиты растений от грибных инфекций могут быть задействованы фенольные соединения и стерины (Rubin et al., 1975; Dyakov et al., 2001). Как показал ГХ-МС анализ экстрактов растений изучаемых генотипов, под действием грибной инфекции содержание некоторых фенилпропаноидов повышается, особенно кониферилацетата и синапового альдегида (№№ 14 и 16, рис. 6). Из всех фенилпропаноидов альдегиды наиболее токсичны для паразитических микроорганизмов (Barber et al., 2000), и вероятно оказывают защитное действие против инфекции. Фенилпропаноидные фитоалексины (защитные вещества) характерны для злаков (Dyakov et al., 2001).

У устойчивого образца 9–65 под действием грибной инфекции концентрация некоторых стериннов не увеличивается, а уменьшается (№№ 20, 22, 23, 25, 26, 30, рис. 6). В литературе описан этот феномен как защитная реакция против грибных инфекций, наиболее изученная на примере фитофторы картофеля (Metlitsky et al., 1980). Известно, что стерины необходимы паразитическим грибам для размножения, причем как для полового (спороношения), так и бесполого, а также ветвления мицелия (Metlitsky, Ozeretskoyanskaya, 1985). Уменьшение концентрации некоторых стериннов является защитной реакцией растений от грибных

инфекций. Паразитические грибы используют стерину растения для собственного роста и развития. Стерины оказывают активирующее действие на гены грибов, контролирующих спороношение, а также участвуют в формировании мембран грибов. При выращивании на искусственной среде в отсутствие фитостериннов возбудитель фитофторы картофеля становится значительно более чувствительным к фитоалексинам и более для них уязвимым (Vasyukova et al., 1977a). Фитостерины синтезируются в ацетатно-мевалонатном пути биосинтеза, в этом же пути синтезируются фитоалексины — вещества защитного действия (Dadali, Tutelyan, 2007). Под воздействием инфекции происходит переключение биосинтеза стериннов на синтез фитоалексина, таких как ришитин, любимин, фитубурин и др. (Metlitsky et al., 1980). Можно предположить, что у пшеницы происходит сходный процесс — блокировка синтеза стериннов, необходимых для развития самого гриба, и переключения метаболизма на синтез фитоалексина.

Одним из наиболее значимых стериннов является β-ситостерин (Vasyukova et al., 1977b; Metlitsky et al., 1980), по нашим данным, именно по этому метаболиту наблюдаются наибольшие различия между восприимчивым и устойчивым образцами в условиях инфекционного поля по сравнению с тепличным посевом (№ 23, рис. 6). Выявление стериннов с подобным действием предлагается использовать в практических целях (Metlitsky et al., 1980). Химические вещества, блокирующие синтез таких стериннов, можно использовать в качестве фунгицидов. Другое направление — создание сортов с генетически детерминированной модификацией метаболизма, ограничивающей развитие гриба.

Обнаруженные сапонины β-амирин и лупеол обладают сильным противогрибковым эффектом. Сапонины ядовиты для грибов, так как связываются со стеринами самих грибов в мембранах и блокируют дальнейший рост (имеют высокий гемолитический индекс) (Rubin et al., 1975; Morrissey, Osbourn, 1999; Dyakov et al., 2001; Pavlovskaya et al., 2012; Pane et al., 2020). У устойчивого образца в тепличных условиях концентрация этих сапонинов выше, чем у восприимчивого; однако в полевых условиях концентрация этих метаболитов у восприимчивого образца заметно повышается. Возможно, это реакция на воздействие патогена, которой, однако, не хватает для защиты растений.

У злаков долгое время не удавалось обнаружить фитоалексины, однако в последние годы такие работы появились. У пшеницы обнаружено индуцированное инфекцией *Bipolaris sorokiniana* накопление двух групп фитоалексина, представляющих собой амиды коричной кислоты, т.е. производные фенилпропаноидного пути (Ube et al., 2019).

В настоящее время для “полевой” устойчивости (т.е. той, которая непосредственно используется в селекции) вместо поиска основного гена исследователи перешли к мнению, что резистентность более перспективно рассматривать как многофакторный признак (Mosquera et al., 2016; Frolova et al., 2021). Еще Эфроимсон (Efroimson, 1971), проанализировав большое количество данных, пришел к выводу, что устойчивость растений к болезням, нельзя свести к какой-либо одной схеме (ген-на-ген, теория неполной среды, и т.д.). Этим растения отличаются от животных и человека, у которых основной механизм защиты от патогенов обусловлен функцией костного мозга и кровеносной системы. Задача исследований в этой области сводится к определению круга факторов — морфологических и метаболических — способствующих устойчивости.

В данном исследовании обнаружены два механизма устойчивости, один из которых связан с повышением содержания фенолпропаноидных метаболитов, второй связан с понижением содержания стероидов, необходимых самому возбудителю для роста и развития. Можно предположить, что один из этих факторов придает устойчивость к одной из двух листовых инфекций (мучнистая роса или листовая ржавчина), а другой — соответственно к другой инфекции. В ходе дальнейших исследований, возможно, удастся выяснить соответствие механизмов устойчивости и инфекционных агентов.

Работа поддержана бюджетными проектами FWN-2022-0017 (ИЦИГ СО РАН), FWN-2022-0018 (СибНИИРС) и FWUE-2022-0005 (НИОХ СО РАН). Спектральные и аналитические измерения проведены в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barber M.S., McConnell V.S. et al. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochemistry*. 2000. V. 54 (1). P. 53–56. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00038-8)
- Chemical Tissue Indices in the Spring Bread Wheat *Triticum aestivum* L. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021a. V. 57 (4). P. 402–414 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0003683821040086>
- Dadali V.A., Tutelyan V.A. Phytosterins — biological activity and prospects for practical application. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2007. V. 127 (5). P. 458–470 (in Russ.).
- Dyakov Yu.T., Ozeretskoyevskaya O.L., Javakhia V.G. et al. General and molecular phytopathology. Society of Phytopathologists, Moscow, 2001 (in Russ.).
- Efroimson V.P. Immunogenetics. Medicine, Moscow, 1971 (in Russ.).
- Frolova T.S., Cherenko V.A., Sinitsyna O.I. et al. Genetic aspects of potato resistance to phytophthora. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2021. V. 25 (2). P. 164–170 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ21.020>
- Gunnaiah R., Kushalappa A.C., Duggavathi R. et al. Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat *QTL (Fhb1)* contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS One* 2012. V. 7. P. e40695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040695>
- Gupt S.K., Chand R., Mishra V.K. et al. Spot blotch disease of wheat as influenced by foliar trichome and stomata density. *J. Agric. Food Res.* 2021. V. 6. P. 100227. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100227>
- Hart G.E. Genetic control of NADH dehydrogenase-1 and aromatic alcohol dehydrogenase-2 in hexaploid wheat. *Biochem Genet.* 1987. V. 25 (11–12). P. 837–846.
- Ivanova Yu.N., Rosenfread K.K., Stasyuk A.I. et al. Raise and characterization of a bread wheat hybrid line (Tulaykovskaya 10 × Saratovskaya 29) with chromosome 6Agi2 introgressed from *Thinopyrum intermedium*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2021. V. 25 (7). P. 701–712 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ21.080>
- Jaaska V. NADP-dependent aromatic alcohol dehydrogenase in polyploid wheats and their relatives. On the origin and phylogeny of polyploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 1978. V. 53 (3). P. 209–217.
- Karpova E.V., Shundrina I.K., Orlova E.A. et al. Aromatic and mineral substances in the tissues of the samples of spring common wheat *Triticum aestivum* L., differing in resistance to brown rust (pathogen *Puccinia triticea* Erikss.) *Khimiya rastitel'nogo syrya*. 2019. V. 4. P. 87–95 (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019045238>
- Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V. Polymorphism of lignification enzymes at plants: functional value and applied aspects. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2015. V. 135 (5). P. 496–513 (in Russ.).
- Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V. et al. Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance to a brown rust in common wheat plants. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2017. V. 21 (6). P. 686–693 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ17.286>
- Konovalov A.A., Orlova E.A., Karpova E.V. et al. Effect of polymorphic variants of *CAD* (EC 1.1.1.195) on wheat resistance to fungal infections. Gene pool and plant selection. V International Conference. 11–13 November 2020 Reports and communications. Novosibirsk, 2020. P. 147–150 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/GPB2020-00>
- Konovalov A.A., Karpova E.V., Shundrina I.K. et al. Effect of allelic variants of aromatic alcohol dehydrogenase CAD im on micromorphological and chemical parameters of tissues in spring common wheat *Triticum aestivum* L. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021a. V. 57 (4). P. 402–414. <https://doi.org/10.31857/S0555109921040085>
- Konovalov A.A., Orlova E.A., Nemtsev B.F. et al. Effect of leaf pubescence and direction of crossbreeding on spring bread wheat resistance to powdery mildew and brown rust. *Pisma v Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2021b. V. 7 (3). 130–137 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/LettersVJ2021-7-15>
- Metlitsky L.V., Ozeretskoyevskaya O.L., Vasyukova N.I. Phytosterins and their role in the relationship of plants with parasitic fungi (using the example of fungi of the *Pythia*-

- ceae family). *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1980. V. 89 (1). P. 28–41 (in Russ.).
- Metlitsky L.V., Ozeretskoyevskaya O.L. How plants protect themselves from diseases. Nauka, Moscow, 1985 (in Russ.).
- Mitchell H.J., Hall J.L., Barber M.S. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol*. 1994. V. 104 (2). P. 551–556.
- Morrissey J.P., Osbourn A.E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1999. V. 63 (3). P. 708–724.
- Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M. et al. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease. *PLOS One*. 2016. V. 11(6). P. e0156254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156254>
- Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Krasnov G.S. et al. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family is involved in the response to *Fusarium oxysporum* in resistant and susceptible flax genotypes. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2019. V. 23 (7). P. 896–901. <https://doi.org/10.18699/VJ19.564>
- Obolenskaya A.V., Shchegolev V.P., Akim G.L. et al. Practical work on the chemistry of wood and cellulose. *Lesnaya Promyshlennost*, Moscow, 1965 (in Russ.).
- Pane C., Caputo M., Francese G. et al. Managing *Rhizoctonia* damping-off of rocket (*Eruca sativa*) seedlings by drench application of bioactive potato leaf phytochemical extracts. *Biology (Basel)*. 2020. V. 9 (9). P. 270. <https://doi.org/10.3390/biology9090270>
- Pavlovskaya N.E., Solokhina I.Yu., Gneusheva I.A. Study of triterpene saponins obtained from the roots of *Avena sativa* sowing oats. *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2012. № 2. P. 48–50 (in Russ.).
- Pillonel C., Hunziker P., Binder A. Multiple forms of the constitutive wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase. *J. Exp. Bot*. 1992. V. 43 (248). P. 299–305.
- Rong W., Luo M., Shan T. et al. A wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase TaCAD12 contributes to host resistance to the sharp eyespot disease. *Front. Plant. Sci*. 2016. V. 7. Arti. 1723. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01723>
- Rubin B.A., Artsikhovskaya E.V., Aksenova V.A. Biochemistry and physiology of plant immunity. Ed. 3rd, reworked and additional Vysshaya Shkola, Moscow, 1975 (in Russ.).
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D. et al. Comparative Analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Agi and 6Agi2 chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat–wheatgrass substitutions. *Russian Journal of Genetics*. 2017. V. 53 (3). P. 314–324 (in Russ.). <https://doi.org/10.7868/S0016675817030110>
- Somssich I.E., Wernert P., Kiedrowski S. et al. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein *ELI3* is an aromatic alcohol:NADP⁺ oxidoreductase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 14199–14203. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14199>
- Tarabanko V.E., Tarabanko N.V. Catalytic oxidation of lignins into the aromatic aldehydes: General process trends and development prospects. *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18 (11). P. 2421. <https://doi.org/10.3390/ijms18112421>
- Tronchet M., Balagué C., Kroj T. et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Ara-bidopsis*. *Molec. Plant Pathol*. 2010. V. 11. P. 83–92. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00578.X>
- Ube N., Harada D., Katsuyama Y. et al. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*. 2019. V. 167. 112098. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112098>
- Vasyukova N.I., Davydova N.A., Ozeretskoyevskaya O.L. et al. The nutrient-inhibiting hypothesis of phytoimmunity on the example of mutual relations between potatoes and the fungus *Phytophthora infestans* (Mont.) De By. *Mikologiya i fitopatologiya*. 1977a. V. 11 (6). P. 480–487 (in Russ.).
- Vasyukova N.I., Davydova N.A., Shcherbakova L.A. et al. Phytosterins as a factor protecting the pathogen of potato blight from the action of phytoalexins. *Doklady Akademii nauk USSR*. 1977b. V. 235 (1). P. 216–219 (in Russ.).
- Васюкова Н.И., Давыдова Н.А., Озерецковская О.Л. и др. (Vasyukova et al.) Питательно-тормозящая гипотеза фитоиммунитета на примере взаимоотношений картофеля и гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de By // Микология и фитопатология. 1977. Т. 11. № 6. С. 480–487.
- Васюкова Н.И., Давыдова Н.А., Щербакова Л.А. и др. (Vasyukova et al.) Фитостерины как фактор, предохраняющий возбудитель фитофтороза картофеля от действия фитоалексинов // ДАН СССР. 1977. Т. 235. № 1. С. 216–219.
- Дадали В.А., Тутельян В.А. (Dadali, Tutelyan) Фитостерины – биологическая активность и перспективы практического применения // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. № 5. С. 458–470.
- Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г. и др. (Dyakov et al.) Общая и молекулярная фитопатология. М.: Из-во Общество фитопатологов, 2001. 302 с.
- Иванова Ю.Н., Розенфрид К.К., Стасюк А.И. и др. (Ivanova et al.) Получение и характеристика линии мягкой пшеницы (Тулайковская 10 × Саратовская 29) с интрогрессией хромосомы пырея *Thinopyrum intermedium* 6Agi2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. № 7. С. 701–712.
- Карпова Е.В., Шадрина И.К., Орлова Е.А. и др. (Karпова et al.) Ароматические и минеральные вещества в тканях образцов яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., различающихся по устойчивости к бурой ржавчине (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) // Химия растительного сырья. 2019. № 4. С. 87–95.
- Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В. (Konovvalov et al.) Полиморфизм ферментов лигнификации у растений: функциональное значение и прикладные аспекты // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 5. С. 496–513.
- Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В. (Konovvalov et al.) Влияние лигнификации и минерализации тканей листа на устойчивость к бурой ржавчине

- растений мягкой пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 686–693.
- Коновалов А.А., Карпова Е.В., Шундрин И.К. (Konovalev et al.) Влияние аллельных вариантов ароматической алкогольдегидрогеназы CAD im на морфологические и химические показатели тканей у яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 4. С. 402–414.
- Коновалов А.А., Орлова Е.А., Карпова Е.В. и др. (Konovalev et al.) Влияние полиморфных вариантов CAD (EC 1.1.1.195) на устойчивость пшеницы к грибным инфекциям // Генофонд и селекция растений. V международная конференция. 11–13 ноября 2020 г. Доклады и сообщения. Новосибирск: ИГиГ СО РАН, 2020. С. 147–150.
- Коновалов А.А., Орлова Е.А., Немцев Б.Ф. и др. (Konovalev et al.) Влияние опушения листьев и направления скрещиваний на устойчивость яровой мягкой пшеницы к мучнистой росе и бурой ржавчине // Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 7. № 3. С. 130–137.
- Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. (Metlitskiy, Ozeretskorskaya) Как растения защищаются от болезней. М.: Наука, 1985. 189 с.
- Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. и др. (Metlitskiy et al.) Фитостерины и их роль во взаимоотношениях растений с паразитарными грибами (на примере грибов семейства Pythiaceae) // Успехи современной биологии. 1980. Т. 89. Вып. 1. С. 28–41.
- Методы оценки и отбора исходного материала при создании сортов пшеницы устойчивых к бурой ржавчине: монография (Methods) М.: ООО “РС дизайн”, 2012. 93 с.
- Павловская Н.Е., Солохина И.Ю., Гнеушева И.А. (Pavlovskaya et al.) Исследование тритерпеновых сапонинов, полученных из корней овса посевного *Avena sativa* // Вестник ОрлГАУ. 2012. № 2. С. 48–50.
- Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. (Rubin et al.) Биохимия и физиология иммунитета растений. Изд. 3-е, перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1975. 320 с.
- Сибикеев С.Н., Бадаева Е.Д., Гуляева Е.И. и др. (Sibikeev et al.) Сравнительный анализ 6Agi и 6Agi2 хромосом *Agropyron intermedium* (Host) Beauv у сортов и линий мягкой пшеницы с пшенично-пырейными замещениями // Генетика. 2017. Т. 53. № 3. С. 298–309.
- Фролова Т.С., Черенко В.А., Синицына О.И. и др. (Frolova et al.) Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. № 2. С. 164–170.
- Эфроимсон В.П. (Efroimson) Иммуногенетика. М.: Медицина, 1971. 336 с.

Comparative Analysis of Metabolites of CAD-im Genotypes of Spring Bread Wheat under Brown Rust Infection

A. A. Konovalev^{a, #}, E. A. Orlova^{b, ##}, E. V. Karpova^{c, ###}, I. K. Shundrina^{c, ####},
A. A. Nefedov^{c, #####}, and N. P. Goncharov^{a, #####}

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^bSiberian Research Institute of Plant Cultivation and Breeding – Branch of Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia

^cVorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

[#]e-mail: konov@bionet.nsc.ru

^{##}e-mail: orlova.lena10@yandex.ru

^{###}e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru

^{####}e-mail: ishund@nioch.nsc.ru

^{#####}e-mail: nefyodov@nioch.nsc.ru

^{#####}e-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Determination of the role of specific genes and their products in plant resistance to stress factors, including those of a biotic nature, is an urgent task of phytopathology and provides additional information for practical use. For spring bread wheat *Triticum aestivum*, CAD-im genotypes (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, cinnamyl alcohol dehydrogenase; EC 1.1.1.195) affecting leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance were studied. Resistant and susceptible genotypes were grown on an infectious background and in its absence. Plant tissues were studied for a number of indicators, including the content of phenylpropanoid metabolites, as well as sterols and saponins. Phenylpropanoids show an increase in a number of metabolites due to infection, especially coniferyl acetate and synapic aldehyde. A decrease in the content of some sterols under the influence of infection in the resistant CAD^{im+} genotype was found. It is assumed that the acetate-mevalonate pathway of metabolism in the resistant genotype CAD^{im+} changes under the influence of infection from the synthesis of sterols to the synthesis of protective substances, phytoalexins.

Keywords: bread wheat, chemical composition of tissues, cinnamyl alcohol dehydrogenase, leaf rust, phenylpropanoids, saponins, sterols

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

УДК 582.284

Большаков С.Ю., Волобуев С.В., Ежов О.Н., Паломожных Е.А., Потапов К.О.
Афиллофороидные грибы европейской части России: аннотированный список видов /
Отв. ред. С.Ю. Большаков, С.В. Волобуев. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ “ЛЭТИ”, 2022.
578 с. ISBN 978-5-7629-3121-2

© 2023 г. И. В. Змитрович^{1,*}

¹Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197022 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: iv_zmitrovich@mail.ru

Поступила в редакцию 19.12.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

DOI: 10.31857/S0026364823030121, EDN: VDANVM

Монография представляет собой итог более чем десятилетней кропотливой библиографической, микофлористической, гербарной и таксономической работы коллектива авторов и содержит конкретные данные об известных находениях видов афиллофороидных грибов в регионах европейской части России. На основе критической проработки литературы, публиковавшейся в период 1842–2021 гг. (всего 930 источников), а также обширных гербарных данных в книге приводится указание на распространение 1315 видов, принадлежащих к 387 родам, относящихся к классам *Agaricomycetes*, *Dacrymycetes*, *Tremellomycetes*, *Agaricostilbomycetes*, *Atractiellomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Pucciniomycetes* и *Spiculogloeomycetes* отдела *Basidiomycota* по 51 региону ЕЧР. Монография выходит за рамки собственно чеклиста, поскольку материал обобщается и анализируется, а родовые и видовые концепции авторами осмыслены, часть видов сопровождается таксономическими примечаниями, а из основного списка выделен список сомнительных таксонов. Все это приближает работу к классической “флоре” и лежит в русле традиционного для Ботанического института направления.

Тема актуальна. Афиллофороидные грибы, представляющие важнейший компонент природных экосистем, активно изучаются как в рамках фундаментальных, так и прикладных научных направлений, а оценка их разнообразия и ресурсного потенциала как на федеральном, так и региональном уровне является важной задачей (необходимость создания подобного чеклиста была обоснована В.М. Котковой более 10 лет назад).

Новизна исследования несомненна: систематический список афиллофороидных грибов, основанный на изучении такого количества источников, опубликованных за период 1842–2021 гг., и

тематически покрывающий всю территорию ЕЧР, приводится впервые.

Первые шаги к решению столь сложной задачи авторы монографии предприняли еще 10 лет назад, начав собирать литературу по афиллофороидным грибам различных ООПТ вначале по средней полосе России, а в дальнейшем и по другим регионам ЕЧР. Часть работ была поддержана отечественными грантами, в результате чего членам авторского коллектива удалось поработать в различных и порой малоизученных регионах, найти все новые литературные источники и ознакомиться, наряду с микологическим гербарием БИН РАН, материалами некоторых других хранилищ. В результате получилась наиболее информационная за рассмотренный авторами период сводка, востребованная многими специалистами. Прежде всего, к кругу читателей этой книги относятся микологи — специалисты по различным группам афиллофороидных грибов и аматеры, но также она будет востребована экологами, работающими в области биоиндикации и охраны природы, краеведами, студентами, аспирантами и преподавателями биологических специальностей вузов.

Вероятно, для многих читателей (конечно, помимо основного содержания работы) будет интересно познакомиться с небольшими и малоизвестными научными школами — такую возможность открывает поднятый авторами богатейший библиографический материал. Авторы работы — известные в стране и мире специалисты по афиллофороидным грибам и имеют обработки как все-российского, так и регионального масштаба.

Книга в объеме 578 страниц, изданная в твердом шитом переплете, содержит следующие разделы: “Введение” (дается краткая характеристика группы, перечисляются базовые сводки и форму-

лируется задача обобщающей монографии), “Характеристика европейской части России” (очерчиваются границы территории и даются базовые отсылки к природному и административному делению ЕЧР), “Номенклатура” (обосновываются границы группы и обозначаются таксономические концепции авторов), “Источники данных” (объясняются подходы к отбору литературных источников), “Таксономическая структура” (описывается таксономический состав афиллофороидных грибов ЕЧР, вошедших в чеклист, перечисляются ведущие роды), “Распространение” (анализируется распределение видов афиллофороидных грибов по регионам ЕЧР и даются списки уникальных для регионов видов), “Структура аннотированных списков” (дается пояснение особенностей записи в аннотированном списке), “Принимаемые названия” (основной аннотированный список), “Неясные и сомнительные указания” (список соответствующих таксонов с таксономической дискуссией), “Литература” (список, содержащий 1058 источников) и “Указатель латинских названий таксонов”. Каждая запись аннотированного списка включает видовое название с приведением авторов таксонов (предлог *et* заменен амперсандом, что делает запись полностью совпадающей с таковой в базе данных “Index Fungorum”), синонимы, под которыми вид встречался в проанализированных источниках, данные о субстратах и распространение по регионам ЕЧР (с надстрочными отсылками к тому или иному названию вида в разных — первичных и вторичных — источниках). На последней странице рукописи приводится “Содержание”. Блок качественных фотографий отдельных представителей афиллофороидных грибов вынесен на обложку.

Непривычный и дискуссионный аспект работы — включение в группу афиллофороидных грибов гетеробазидиомицетов — как тех, которые рассматриваются сегодня в классе *Agaricomycetes*, так и из классов *Dacrymycetes*, *Tremellomycetes*, *Agaricostilbomycetes*, *Atractiellomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Pucciniomycetes* и *Spiculogloeomycetes*. Авторы приводят свое обоснование этого шага, но станет ли такая трактовка мейнстримом, сказать сейчас сложно.

После апробации (обсуждения представленной монографии отечественным сообществом афиллофорологов), поднятия пласта публикаций фитопатологических станций (проводящих мониторинг, в частности, ризоктониоподобных грибов), публикаций до 1842 г., способных дать интересный флористический материал, представленная монография может периодически переиздаваться и уточняться — базовый задел теперь имеется и нельзя переоценить ту огромную работу, которую авторы провели на сегодняшний день.

В совокупности с изданным годом ранее чеклистом “*Agaricoid and boletoid fungi of Russia...*”¹ монография “Афиллофороидные грибы европейской части России: аннотированный список видов” составляет фундаментальную сводку по агарикомицетам европейской части России, более чем актуальную для всех специалистов, занимающихся изучением этой группы грибов.

¹ Bolshakov S., Kalinina L., Palomozhnykh E., Potapov K., Ageyev D., Arslanov S., Filippova N., Palamarchuk M., Tomchin D., Voronina E. Agaricoid and boletoid fungi of Russia: the modern country-scale checklist of scientific names based on literature data. *Biol. Communications*. 2021. V. 66 (4). <https://biocomm.spbu.ru/article/view/7362/8648>

Bolshakov S.Yu., Volobuev S.V., Ezhov O.N., Palomozhnykh E.A., Potapov K.O.
Aphylophoroid fungi of the European part of Russia: A checklist / Eds. S.Yu. Bolshakov,
S.V. Volobuev. Saint Petersburg: ETU Publishing house, 2022. 578 p.
ISBN 978-5-7629-3121-2

I. V. Zmitrovich^{a, #}

^a *Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: iv_zmitrovich@mail.ru*

УДК 582.28 (092)

ПАМЯТИ СВЕТЛАНЫ МИХАЙЛОВНЫ ОЗЕРСКОЙ (1953–2022) Ad memoriam. Svetlana Mikhailovna Ozerskaya (1953–2022)

DOI: 10.31857/S002636482303008X, EDN: VCRMHC



3 октября 2022 г. после тяжелой и продолжительной болезни на 69 году ушла из жизни Светлана Михайловна Озерская.

Светлана Михайловна родилась 27 октября 1953 г. в Чите в семье первых выпускников факультета журналистики МГУ им. М.В. Ломоносова. Свое детство она провела в Москве, и вся ее жизнь была неразрывно связана с Московским университетом. С ранних лет она мечтала стать микологом, поскольку грибы, как объект изучения, всегда вызывали ее живой интерес. Для осуществления задуманного в 1971 г. она поступила на факультет почвоведения МГУ, где училась на кафедре биологии почв у миколога Татьяны Георгиевны Мирчинк как студентка, а позднее и как аспирантка. Ее кандидатская диссертация, защита которой состоялась в 1980 г., была посвящена структуре комплексов почвенных микромицетов лесных биогеоценозов зоны смешанных лесов. В этой работе впервые было введено в микологическую практику понятие комплекса типичных видов на основе расчета пространственной и временной

частоты встречаемости таксонов. Для сравнения степени сходства и различия комплексов микромицетов различных почв в количественном выражении Светлана Михайловна предложила использовать коэффициент Сёрнсена–Чекановского, который активно применяется в микологии по сей день.

Всю свою жизнь Светлане Михайловне хотелось быть ближе к живым микроскопическим грибам, которые она очень любила за разнообразие, красоту форм и уникальные свойства. А во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) этих организмов великое множество. Именно сюда по приглашению Льва Владимировича Калакуцкого она пришла в 1985 г. в качестве заведующей лабораторией мицелиальных грибов, которую возглавляла более 37 лет, вплоть до своего ухода из жизни. Под руководством Светланы Михайловны в лаборатории были проведены новаторские работы по изучению биоразнообразия жизнеспособных микромицетов в “вечной мерзлоте” возраста до 3 млн лет, сформулированы основные принципы, обеспечивающие существование грибов в этих суровых условиях. Она в течение многих лет была руководителем работ по программам фундаментальных исследований Президиума РАН и Министерства науки и образования РФ.

Высочайший авторитет Светланы Михайловны как миколога привлекал к работе специалистов разных отраслей. В результате лаборатория сотрудничала со многими организациями, в том числе, с относящимися к Министерству культуры РФ, Министерству обороны РФ, Министерству юстиции РФ, Федеральному агентству по культуре и кинематографии, Государственной корпорации Росатом. В возглавляемой ею лаборатории выполнялись разнообразные исследования, связанные с изучением музейных предметов с целью их защиты от микробиологического поражения, проводилась оценка эффективности применения ионизирующего излучения для сохранения от микологических повреждений промышленных материалов, закладываемых на длительное хранение, анализировались различные природные субстраты и промышленные материалы на загрязнение грибами, проводился анализ практики микологических исследований в государственных учреждениях. В ходе выполнения этих работ коллекционный фонд ВКМ пополнялся уникальными изолятами мицелиальных грибов.

Но главной миссией Светланы Михайловны было развитие коллекционного дела в России и в мире. Она считала, что коллекционное дело — это наука ничуть не меньшая, чем изучение полезных свойств грибов. И доказала это, блестяще защитив в 2012 г. докторскую диссертацию на тему “Грибы в коллекциях культур: фундаментальные и прикладные аспекты”.

Помимо увеличения разнообразия коллекционного фонда, разработки методов хранения и оценки сроков хранения штаммов грибов разными методами, целью Светланы Михайловны было создание глобальной информационной системы по культивируемым грибам, позволяющей обеспечить оперативную деятельность коллекций для развития научных исследований, связанных с использованием чистых культур грибов. Она проделала огромную работу и совершила прорыв в этом направлении, способствовав интеграции созданных ею баз данных, имеющих отношение к штаммам микроорганизмов VKM, с мировыми базами данных по микроорганизмам. Она разработала и официально зарегистрировала уникальную информационно-справочную систему FungalDC, связанную с важнейшими информационными ресурсами по грибам (MycBank, IndexFungorum, GenBank, WDCM), где для каждого таксона была проведена сверка наименования с известными номенклатурными базами данных по грибам.

Светлана Михайловна была человеком глубокой научной компетентности, автором множества работ, ученым, которого знали и уважали в нашей стране и далеко за ее пределами. Ее энергия, энтузиазм и профессионализм во многом способствовали развитию VKM и других российских коллекций, их информационному обеспечению и вовлечению в международные организации, такие как European Culture Collections' Organisation (ECCO) и World Federation for Culture Collections (WFCC). В последние годы она активно поддерживала важнейшие инициативы по сохранению биоресурсных коллекций России, по переводу работы с коллекциями на новый современный уровень, в том числе, работу по созданию Сводного каталога микробных культур в российских немедицинских коллекциях, активно взаимодействуя по этому вопросу с другими институтами, поддерживающими грибные коллекции.

Само имя Светланы Михайловны говорило о том, что она была очень светлым, дружелюбным и отзывчивым человеком, человеком высокого духа и высокой морали. А ее постоянная вовлеченность в работу, постоянное движение вверх создали тот масштаб личности, который вызывал неизменное восхищение у всех, кто с ней соприкасался по работе и в жизни. Светлана Михайловна оставила после себя не только добрую память, но и солидный научный архив, который будет использоваться многими нашими коллегами еще долгое время, а также сплоченный коллектив единомышленников, который и дальше будет развивать это научное направление по поддержанию, сохранению и изучению разнообразия микроорганизмов в России.

Некоторые наиболее важные работы С.М. Озерской

Ozerskaya S.M., Vasilenko A.N., Verslyppe B., Dawyndt P. FungalDC: a database on fungal diversity in culture collections of the world. *Inoculum. Supplement to Mycologia* (Newsletter of the Mycological Society of America). 2010. V. 61 (3). P. 1–5.

Ozerskaya S.M., Kochkina G.A., Ivanushkina N.E. Fungal diversity in GenBank: problems and possible solutions. *Inoculum. Supplement to Mycologia* (Newsletter of the Mycological Society of America). 2010. V. 61 (4). P. 1–4.

Vasilenko A., Ozerskaya S., Stupar O. Current WFCC CC catalogues as a starting ground for networking efforts. *WFCC Newsletter*. 2011. № 50. P. 5–15.

Ozerskaya S.M. Fungal diversity in Genbank. *McGraw-Hill yearbook of science and technology* 2012. McGraw-Hill Professional, N.Y., 2012. P. 99–103.

Ozerskaya S.M., Kirillova N.P., Vasilenko A.N. FungalDC: a database on fungal diversity in genetic resource collections. *IMA Fungus*. 2012. V. 3 (1). P. 9.

Евтушенко Л.И., Голубев В.И., Озерская С.М., Соколов А.П., Калакуцкий Л.В. Всероссийская коллекция микроорганизмов: путь к биологическому ресурсному центру // *История науки и техники*. 2015. № 5. С. 19–36.

Wu L., Sun Q., Desmeth Ph., Sugawara H., McCluskey K., Smith D., Vasilenko A., Lima N., Ohkuma M., Robert V., Zhou Y., Li J., Fan G., Ingsriswang S., Ozerskaya S., Ma J. World data centre for microorganisms: an information infrastructure for the exploration and utilization of microbial strains preserved worldwide. *Nucleic Acids Research*. 2017. V. 45. Is. D1. P. D611–D618.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkw903>

Kochkina G., Ivanushkina N., Ozerskaya S. Collection of VKM Paleofungi. *Diversity*. 2021. V. 13 (9). P. 402. <https://doi.org/10.3390/d13090402>

ГОСТ 9.050-2021. Единая система защиты от коррозии и старения. Покрyтия лакокрасочные. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов (ISO 846:2019, NEQ). Издание официальное. Москва, Российский институт стандартизации, 2021. Разработали: Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А.

Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Danilogorskaya A.A., Pinchuk I.P., Vasilenko A.N. Various methods of long-term preservation of fungal cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM). In: *V.K. Gupta, M. Tuohy* (eds.) *Laboratory protocols in fungal biology*. Chapter 1. 2nd Edition. *Fundal Biology*. Springer, Cham., 2022, pp. 1–67. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83749-5_1

Vasilenko A., Ivanushkina N., Kochkina G., Ozerskaya S. Fungi in microbial Culture Collections and their metabolites. *Diversity*. 2022. V. 14 (7). P. 507. <https://doi.org/10.3390/d14070507>

Vasilenko A., Kochkina G., Ivanushkina N., Ozerskaya S. Life Science – microbial Culture Collections data integration tasks. *Diversity*. 2023. V. 15 (1). P. 17. <https://doi.org/10.3390/d15010017>

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина. Всероссийская коллекция микроорганизмов. 142290, Московская обл., Пушкино, Россия

G.K. Scryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. All-Russian collection of microorganisms. Moscow Region, Pushchino, Russia

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0026364823030108, EDN: VCUOUM

I. Общая информация

Журнал “Микология и фитопатология” (ISSN 0026-3648) — ведущее в России рецензируемое научное периодическое издание, публикующее результаты научных исследований в области микологии и фитопатологии. Журнал индексируется библиометрической системой Scopus, публикуемые в нем материалы учитываются ВАК. Интернет-сайт редколлегии журнала имеет адрес: <http://www.binran.ru/journals/mif/>.

Журнал выходит 6 раз в год. Языки публикации: русский, английский. Плата за публикацию не взимается. Цветные иллюстрации сохраняются в электронных авторских оттисках, в печатной версии журнала число цветных иллюстраций ограничено.

Журнал публикует статьи по всем основным разделам науки о грибах: оригинальные работы, обзорные статьи, дискуссионные статьи, хронику и информацию, рецензии, сообщения о новых методах исследования, новых находках, исправления и дополнения.

Для рассмотрения редколлегией рукописи статьи авторам необходимо предоставить в редакцию следующие материалы:

1) электронный вариант текста статьи, включающий на последних страницах также таблицы и внедренные рисунки (рисунки, содержащие фотоматериалы высокого разрешения, прилагаются отдельными jpeg-файлами);

2) электронный вариант сведений об авторах с внедренной подписью автора-корреспондента и декларацией отсутствия/наличия конфликта интересов.

После принятия статьи автором к печати авторам по электронной почте направляется форма лицензионного договора с соответствующими текущему моменту реквизитами.

Все материалы присылаются по электронной почте на адрес редколлегии: journal.mif@mail.ru

При подготовке и направлении рукописей статей в журнал редакция просит авторов руководствоваться изложенными ниже правилами. Рукописи, оформленные без соблюдения этих правил, редакционной коллегией не рассматриваются.

II. Тематика публикации

В журнале “Микология и фитопатология” печатаются статьи по всем основным разделам науки о грибах и грибных болезнях растений:

— ранее не опубликованные работы (результаты наблюдений, экспериментальные и теоретические работы, таксономические ревизии, разработки новых методов исследования);

— обзорные статьи с критическим анализом литературных данных;

— краткие сообщения, флористические находки;

— хроника и информация;
— критика и библиография;
— дополнения и коррективы к ранее опубликованным работам.

III. Требования к содержанию

При оформлении систематических обзоров и описании новых таксонов необходимо пользоваться правилами Международного кодекса номенклатуры водорослей, грибов и растений (ICN). Описания новых таксонов публикуются только после их регистрации в базе данных MycoBank (<http://www.mycobank.org>) и присвоения им учетного номера, который обязательно указывается в рукописи.

В рукописях статей по систематике и биоразнообразию грибов крайне желательно (при описании новых видов — обязательно) указывать акронимы гербариев и коллекций культур, а также названия учреждений, где хранятся образцы. При этом при цитируемых образцах должны быть приведены их номера (если есть), под которыми они хранятся в гербариях. Для флористических находок необходимо возможно точнее обозначать местонахождения (в идеале — точным указанием географических координат).

Полученные авторами и упоминаемые в рукописи нуклеотидные последовательности должны быть предварительно депонированы в любой из следующих баз данных: DDBJ/EMBL/GenBank. В тексте следует ссылаться на учетный номер последовательности.

Статьи на английском языке редакцией приветствуются. Для статей на русском языке рекомендуется приведение обширного англоязычного резюме — реферата (см. раздел IV).

IV. Объем и структура публикации

Рекомендуемый размер рукописи — не более 20 страниц формата A4, включая список литературы, таблицы и рисунки. Текст набирается 12-м кеглем шрифтом Times New Roman¹ через 1.5 интервала (но без интервалов между параграфами) с полями слева, сверху и снизу 2 см, справа — 1.5 см. Все страницы рукописи нумеруются. Рисунки подготавливаются в оригинальном размере для размещения по ширине полосы (17.5 см) или колонки (8.5 см). Объем рисунков подсчитывается исходя из их количества, которое можно разместить на странице формата A4 (в объеме статьи подсчитывается количество страниц, заполненных рисунками).

Текст рукописи начинается с индекса УДК (руководства по индексации имеются в научных библиотеках), затем следует название, набранное в основе

¹ Вместо литеры “ё” используется литера “е”.

строчными буквами (затем переводятся в прописные автоматически), на следующей строке — знак копирайта, и.о. и фамилия авторов с надстрочными отсылками к учреждениям и указанием звездочкой автора-корреспондента, на следующих строках — указание учреждения, почтового индекса, города и страны, отдельной строчкой — электронный адрес автора-корреспондента. После пустой строки петитом набирается русскоязычное резюме, через строку — ключевые слова, упорядоченные по алфавиту без точки в конце. Ключевые слова не должны повторять слова, встречающиеся в заголовке статьи.

Размещая материалы на титульной странице, следует сверяться с дизайном титульной страницы статьи в последних выпусках журнала.

Статья должна быть ясно изложена и четко структурирована. При этом необходимо придерживаться следующей структуры текста:

- резюме на русском языке;
- ключевые слова (не менее четырех) на русском и английском языках;
- краткое введение с постановкой задачи (начинается всегда с новой страницы);
- материалы и методы;
- результаты;
- обсуждение и заключение;
- благодарности, ссылки на поддержку фондов;
- список литературы;
- английское название (строчными буквами, но каждое слово с прописной буквы), авторские данные и резюме;
- таблицы (каждая на отдельной странице);
- подписи к рисункам (на отдельной странице);
- рисунки, внедренные в текст над соответствующей подписью (фотографии с высоким разрешением можно приложить как отдельные jpeg-файлы).

При изложении оригинальных данных рекомендуется использовать подзаголовки: “Введение”, “Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение” и “Список литературы”.

Заглавие статьи должно быть максимально кратким и четко отражать ее содержание. При включении названия таксона(ов) в заглавие, автора(ов) таксона указывать в нем не следует.

Информация об авторах. Необходимо корректное и качественное представление названий организаций и места работы авторов — **как на русском (в начале рукописи), так и на английском (в конце рукописи) языках.** Единственно верный вариант такого представления — полное (и полное переводное) официально принятое название организации с указанием ведомства, а также города и страны. При этом следует указывать только ту часть названия организации, которая относится к понятию юридического лица, т.е. не указывать названий кафедры, лаборатории, другого структурного подразделения внутри организации. Аббревиатуру допускается применять только вместе с полным названием организации. Не следует переводить на английский язык преамбулы к названиям, определяющие тип, статус организации (ФГБУН, ФГОУ, ФГУП и т.п.). Например: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376 Санкт-Петербург, Россия; Komarov Botanical Institute RAS, 197376 St. Petersburg, Russia.

Резюме (без подзаголовка “Резюме”) необходимо представить в достаточно развернутом виде — в особен-

ности это относится к его англоязычному варианту, поскольку для международного сообщества он будет являться чаще всего основным источником данных. Именно поэтому допускается расширение английского реферата до необходимого объема для охвата всех основных результатов. В нем должны быть четко и конкретно перечислены основные результаты, выводы, при необходимости — методы и объекты. Не рекомендуется использование формулировок типа “в статье рассмотрены вопросы... и обсуждается проблема..”. Написание реферата — важная составляющая цитируемости работы в мировой научной периодике.

Во Введении необходимо четко определить круг рассматриваемых в статье вопросов и лаконично описать суть исследуемой проблемы. Завершается введение постановкой цели исследовательской работы (обзора литературы).

Материалы и методы. В данном разделе необходимо привести список и характеристики (происхождение образцов, даты сбора и т.п.) использованного материала, последовательно перечислить все использованные в работе методы. Для общераспространенных методов достаточно привести ссылки на источники данных. Для менее популярных методов необходимо изложить их суть и/или особенности использованных модификаций. Новые, малораспространенные и оригинальные методы должны быть описаны достаточно подробно для воспроизведения их другими научными коллективами. При необходимости приводятся схемы экспериментов, маршруты экспедиций и т. п.

Результаты. В данном разделе должны быть развернуто представлены полученные данные. Важным является выбор наиболее простой и доступной для читателя формы представления данных (текстовая, графическая или табличная). Включение в данный раздел фрагментов текста, описывающих методы, не рекомендуется.

Обсуждение. В данном разделе дается интерпретация, сравнение и обсуждение полученных данных. Включение в данный раздел фрагментов текста, описывающих методы, также не рекомендуется.

Заключение. В некоторых случаях полезно изложение в тезисной форме основных результатов исследования и выводов, которые целесообразно представить в данном разделе работы.

V. Правила оформления текста

1. Файлы

Текст присылается в редакцию в виде отдельного файла. При подготовке текста для журнала на компьютере рекомендуется использовать текстовый редактор Microsoft Word (расширение *.doc, для рисунков — *.jpeg). Файлы с другими расширениями и zip-архивы редакцией не рассматриваются.

Для растровых изображений (в т.ч. фотографий) желательно использовать формат JPEG (показатель качества не ниже 10), но для векторных рисунков и диаграмм допускаются форматы EPS или CDR.

2. Текст

Текст набирается через 1.5 интервала без дополнительных интервалов между параграфами с абзачным отступом в 1 см. Цвет текста — черный (“авто”), без подчеркивания. Не допускается копирование частей текста из интернета и пометка текстовых фрагментов

как гиперссылки (за исключением гиперссылок у номеров DOI в списке литературы).

Написание фамилий авторов названий таксонов должно быть выверено в соответствии с рекомендациями работы “Авторы названий грибов” (Kirk, Ansell, 1992 — см., например, сайт <http://www.indexfungorum.org/Names/AuthorsOfFungalNames.asp>). Автор вида указывается только при первом упоминании или в списках видов.

Актуальность всех видовых названий грибов и правильность их написания должны быть выверены с помощью номенклатурных баз данных MycoBank (<http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx>) или Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>). При использовании синонимов, отличных от приведенных в базах данных, автор должен быть готов предоставить рецензенту ссылки на соответствующие таксономические публикации.

В тексте рукописи сокращения необходимы в следующих случаях: а) единицы измерения; б) географические и физико-географические термины; в) латинское название рода при повторном упоминании латинского названия вида или перечислении видов одного рода. Например: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, г) названия учреждений при первом упоминании в тексте даются полностью, и сразу же в скобках указываются их общепринятые сокращения, которыми пользуются в дальнейшем тексте. Например: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН), повторно: БИНа, в лаборатории БИНа и т.д., наиболее общепринятые аббревиатуры даются без расшифровки. Например: РФФИ, РАН, ДНК, ПЦР, КОЕ и т.п.

Все величины должны быть выражены в единицах измерения, утвержденных ГОСТами или в Международной системе единиц (СИ).

В качестве разделителя в десятичных дробях используется точка, а не запятая.

Видовое название набирается светлым курсивом. Полужирный шрифт используется только при описании нового вида или номенклатурном оформлении новой комбинации.

Цитирование авторов таксонов осуществляется по стандартам, принятым в “Определителе грибов России”, например:

Perichaena minor (G. Lister) Hagelst., Mycologia 35: 130, 1943.

В случае использования в ходе выполнения исследования приборов, выбор которых мог повлиять на результаты работы, а также новых и уникальных приборов, в рукописи должны быть указаны их марки и в скобках фирма и страна-производитель.

3. Таблицы

Таблицы, если их больше одной, должны иметь порядковые номера (например: Таблица 2), на которые следует ссылаться в тексте (например: табл. 2). Каждая таблица и все графы в ней должны иметь заголовки. Сокращения слов (кроме общепринятых) в таблицах не допускаются. Содержание таблиц не должно дублировать текст. Все таблицы должны быть напечатаны на отдельных страницах. Шапка таблицы дается в один параграф, начинающийся словом “Таблица”, приводится ее номер. Далее, после точки, но на той же строке дается название таблицы. Название таблицы дается

светлым прямым шрифтом, а ее номер — прямым полужирным.

Не следует включать в таблицы столбцы и строки, состоящие из одинаковых значений (т.е. из значений, не меняющихся от строки к строке). Эти случаи следует особо оговорить в примечании к таблице или в тексте. Если в таблице имеется в виду отсутствие данных, ставится прочерк, а если принципиально невозможно их получить, остается пустое место.

Содержимое таблицы должно быть оптимизировано опциями автоподбора ширины столбцов. Внутри таблицы не должно быть знака “Enter” (возврат каретки) — информация упорядочивается только строками и столбцами.

4. Рисунки

Рисунок должен обеспечивать ясность передачи всех деталей. Следует иметь в виду, что фотографии используются для набора без ретуширования, поэтому автор должен позаботиться об их хорошем качестве. Фотографии плохого качества и ксерокопии фотографий не принимаются.

Желательная ширина изображений 8.5 или 17.5 см. Максимальный размер — 17.5 × 20 см. Фотографии должны иметь прямоугольные контуры.

Рисунки, если их больше одного, должны иметь порядковые номера, на которые следует ссылаться в тексте. На микрофотографиях и рисунках с изображением микроструктур грибов обязательно должен присутствовать масштаб. Надписи на рисунках следует, по возможности, заменять цифрами или буквами, значение которых раскрывается в подписях к рисунку.

5. Цитирование литературы

В связи с необходимостью размещения информации о журнале “Микология и фитопатология” на научных информационных платформах, с 1 января 2014 г. всю библиографическую информацию следует давать на латинице. Названия работ, набранных в оригинале кириллицей, следует давать в английском переводе, а фамилии авторов и названия изданий — транслитерировать (стандарт транслитерации — см. <http://transliteration.ru/gosdep/>). В конце библиографической записи следует указывать язык оригинала, если в нем используется кириллический набор [например, (in Russ.)].

Ссылки на работы в тексте располагаются в хронологическом порядке опубликования работ, причем **фамилии авторов русскоязычных работ (или работ на кириллице) даются в транслитерации**. Например: “Многие авторы (Zavarzin, 1927; Ries, 1938; Nasonova, Suzdalskaya, 1948, и др.) описали...”. Для рукописей на русском языке в тексте при ссылке на работу иностранных авторов фамилии авторов даются латиницей с указанием года опубликования работы, например: “M. Moser (1978) приводил...”.

Цитируемая литература дается списком в конце рукописи. Этот раздел должен иметь название “Список литературы”. Все упомянутые в тексте работы должны быть приведены в списке в алфавитном (латиница) порядке. В списке литературы надлежит использовать общепринятые сокращения названий журналов (кроме транслитерированных названий, которые даются полностью).

Не допускается цитирование электронных публикаций, не имеющих постоянного адреса в сети Интернет (например, новостных лент).

DOI необходимо указывать для всех источников, у которых этот идентификатор имеется в настоящее время. Ссылки с DOI должны начинаться с <https://doi.org/> и обязательно быть валидными — при переходе по ссылкам должны открываться страницы соответствующих публикаций на сайтах изданий. При включении их в список литературы (позиция — после основной библиографической записи) следует сохранять работающую гиперссылку, но менять цвет записи с синего на “авто” и убирать подчеркивание.

Оформление списка литературы

а) статьи в журналах:

Malysheva E.F., Kovalenko A.E. Fungi of the Russian Far East. IV. *Amanita* sect. *Vaginatae* in the Central Sikhotealin. Mikologiya i fitopatologiya. 2015. V. 49 (3). P. 151–163 (in Russ.).

Balandaykin M.E., Zmitrovich I.V. Review on Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes): realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential. Int. J. Med. Mushrooms. 2015. V. 17 (2). P. 95–104.

<https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i2.10>

б) препринты статей DOI:

Slifka M.K., Whitton J.L. Clinical implications of dysregulated cytokine production. J. Mol. Med. 2000.

<https://doi.org/10.1007/s001090000086>

в) монографии:

South J., Blass B. The future of modern genomics. Blackwell, London, 2001.

Raghukumar S. Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems. Marine fungi. Springer, Cham, 2017.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8>

г) главы монографий, труды конференций:

Brown B., Aaron M. The politics of nature. In: *J. Smith* (ed.). The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, N.Y., 2001. P. 230–257.

Sidorenko L.P., Klenus V.G. Ability of the fungi to extract strontium-90 and caesium-137. In: I Vsesoyuznyy radiobiologicheskii syezd, vol. 4: Tezisy докладов. Pushchino, 1989. P. 986 (in Russ.).

д) диссертации:

Stepanova N.T. Ecological and geographical characteristics of the Ural *Aphyllophorales* fungi. Dr. Sci. Thesis. Sverdlovsk, 1971 (in Russ.).

Sell I. Systematics and ecology of selected taxa of wood-decaying basidiomycetes. PhD Thesis. Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Tartu, 2012.

е) патенты:

Dean T.R., Kohan M.J. Method for identification of medically relevant fungi. US Patent. 2010. N 7659067.

ж) государственные стандарты, инструкции:

SP 1.2.036-95. The order of account, save, transmission and transport of microorganisms of the I–IV pathogenicity groups. 1995 (in Russ.).

В случае цитирования работ на кириллице, эти работы приводятся также отдельным списком, набранном на кириллице (стандарты цитирования по ГОСТ Р 7.0.5.-2008 “Библиографическая ссылка”).

VI. Редакционная подготовка

Все рукописи направляются двум независимым экспертам для рецензирования. В случае возникновения спорных ситуаций и неоднозначных результатов рецензирования, рукопись может быть отправлена еще одному или двум рецензентам. По рекомендации рецензентов рукопись может быть одобрена, отклонена или направлена авторам на доработку. Возвращение рукописи автору на доработку не означает, что она принята к печати. Авторы должны вернуть исправленный вариант статьи вместе с первоначальным текстом и ответом на все замечания рецензентов.

Редакция оставляет за собой право сокращать текст и вносить редакционную правку, в т.ч. в название работы.

Издательство направляет автору по электронной почте на проверку корректуру статьи в виде pdf-файла. В корректуре допускается внесение лишь незначительных изменений в тексте и таблицах.