

УДК 632.3:635.82

Діагностика мікоплазмових інфекцій на грибах печериці двоспорової у штучних агроекосистемах

Іванова Т. В., кандидат сільськогосподарських наук

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

Мета. Провести скринінг і діагностику печериці двоспорової (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) на предмет інфікування мікоплазмами для отримання грибного міцелію на безінфекційній основі. **Методи.** Візуальні, мікробіологічні (отримання чистої культури гриба, вивчення культуральних властивостей колоній, визначення чутливості до антибіотиків), електронна мікроскопія, статистичні. Дослідження проводили впродовж 2015–2019 рр. на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України. Досліджували міцелій (штам Sylvan A-15, внесений до Держреєстру України), покрівельний ґрунт, субстрат і плодові тіла печериці двоспорової (40 зразків), відібрані у грибних господарствах Васильківського і Києво-Святошинського районів Київської області. **Результати.** У 17 зразків із 40 виявлено симптоми, характерні для мікоплазмових хвороб. Діагностовано притаманні їм симптоми: набуття молодими плодовими тілами сіруватого забарвлення, передчасне розкриття шапинок. Про мікоплазмову природу свідчить і наявність ексудатів у зразках, які спостерігали у 36 % досліджених зразків. У випадку інфікування покрівельного ґрунту симптоми збігалися із даними щодо виділення та ідентифікації хвороби. Електроннограма підтверджує присутність конгломерату мікоплазми у глибинному міцелії печериці двоспорової. Високочутливими до антибіотиків виявилися зразки мікогону і муміфікації (стерильна зона навколо індикаторного диска з антибіотиком становить 29 мм), чутливими – копринус і бактеріальна іржа (19 мм), малочутливими – бактеріальне ураження субстрату (12 мм). Удосконалено методику діагностики мікоплазм на грибах виду *A. bisporus* за специфічними симптомами – некрозом та ексудатом. **Висновки.** Проведено первинний скринінг зразків печериці в умовах закритого ґрунту за використання візуального методу та електронної мікроскопії для діагностики інфікування мікоплазмою плодових тіл і міцелію. Оптимізовано мікробіологічні методи детекції мікоплазмових інфекцій на культурі грибів.

Ключові слова: *Agaricus bisporus*, діагностування, мікоплазмові інфекції, міцелій, плодові тіла, джерела інфікування

Вступ. Мікоплазми – специфічна група фітопатогенів, що займають проміжне положення між бактеріями та вірусами і є поліморфними організмами.

Мікоплазми не мають справжньої клітинної стінки, оточені тришаровою елементарною мембраною, чим і відрізняються від бактерій. На відміну від вірусів для них характерні клітинна будова і здатність розмножуватися на штучних живильних середовищах. На щільних середовищах вони утворюють дрібні специфічні колонії, що за виглядом нагадують «яєчню». На відміну від вірусних частинок у клітинах мікоплазми присутні два типи нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) і рибосоми, що за розмірами близькі до рибосом бактерій. У порівнянні з бактеріями мікоплазми стійкі до пеніциліну, але порівняно з вірусами чутливі до тетрацикліну [1].

Мікоплазми (особливо після виявлення вільноживучих видів) є надзвичайно різноманітними за фізіолого-біохімічними особливостями. Ці прокаріоти можуть рости на штучних середовищах різного ступеня складності (від простих мінеральних до складних органічних) або тільки всередині організму-господаря, що свідчить про досить широкий діапазон їхньої здатності до біосинтезу. Якщо раніше вважали, що мікоплазми в основному є формами, що паразитують на людині і вищих тваринах, то тепер уявлення про способи існування і поширення цієї групи прокаріотів у природі значно розширено. Мікоплазми знаходять у ґрунті і стічних водах, їх виділено з кам'яного вугілля та гарячих джерел. Крім вільноживучих форм, здатних рости як на чисто мінеральних середовищах, так і сапрофітно, описано також мікоплазми, що існують у різних симбіотичних асоціаціях з бактеріями, нижчими грибами, рослинами, птахами, тваринами і людиною.

Діагностуючи фіто- і мікоплазмози, враховують не лише візуальні симптоми хвороби, але й дані електронно-мікроскопічного аналізу хворих тканин (як рослин, так і грибів). Для ідентифікації мікоплазми використовують індикаторні організми. Зокрема, рослини-індикатори у відповідь на зараження мікоплазмою дають чіткіші прояви симптомів. Загальновідомо, що мікоплазми не передаються з клітинним соком, тому для аналізу проводять щеплення верхівки ураженої рослини на так звану рослину-індикатор.

У більшості випадків мікоплазмоподібні організми виявляють за допомогою мікроскопії. Найбільш чіткі докази присутності мікоплазм дає електронна мікроскопія, за допомогою якої виявлено понад 100 їх видів. На відміну від мікоплазм тварин, які зазвичай виявляються поза клітинами, фітоплазми виявлено всередині клітин. Встановлено, що збудниками великої групи хвороб (типу «відьмина мітла» і жовтяниці) є не

віруси, як вважали раніше, а мікоплазми. Усього описано понад 50 мікоплазмозів, які раніше вважали вірусними хворобами

Мікоплазми дуже шкідливі. Уражені біологічні об'єкти часто взагалі не дають врожаю або він різко знижується. Це пояснюється тим, що при мікоплазмозах порушується ріст і розвиток, спостерігається карликовість. Інший характерний симптом мікоплазмозів хвороб – патологічні зміни генеративних органів. При мікоплазмозах з'являються й такі симптоми, які притаманні вірусним інфекціям: неспецифічні деформації різних органів, в'янення, некроз тощо.

Аналіз літературних джерел, постановка проблеми. В Україні практично немає діагностикумів для детекції та ідентифікації мікоплазм, які уражують печериці. На особливу увагу заслугоує питання створення тест-системи для ідентифікації мікоплазм печериці двоспорової, які не діагностуються традиційними способами. Саме тому актуальним є впровадження нових методів прикладної біотехнології.

Встановити мікоплазмову природу захворювання допомагає метод індикаторних організмів, а також мікробіологічний метод [2, 3], за якого збудника хвороби виділяють у чисту культуру; заражають ним рослину; після появи симптомів, схожих з початковими, знову ізолюють збудника в чисту культуру (метод тріади Коха).

До більшості анілінових барвників мікоплазми малочутливі, але добре забарвлюються за методикою Романовського-Гімза.

Непрямым доказом мікоплазмової природи хвороби є реакція збудника на антибіотики групи тетрацикліну.

Природна чутливість мікроорганізмів до антибіотиків пов'язана з наявністю у їхньому складі мішеней (структур, які пошкоджуються антибіотиками) та етапів метаболізму, які блокуються антибіотиками. Природна стійкість пов'язана з відсутністю у мікроорганізмів таких мішеней або їх слабкою спорідненістю з антибіотиком. Найчастіше мішенями для дії антибіотиків є клітинна стінка (пептидоглікан), цитоплазматична мембрана або ферменти, локалізовані у ній (пермеази), рибосоми, генетичні структури чи окремі етапи синтезу білка, нуклеїнових кислот, ліпідів.

Зміна мішеней для дії певного антибіотика призводить до розвитку стійкості мікроорганізмів до нього, що може поширюватися й на інші антибіотики з аналогічним механізмом дії (перехресна стійкість). Набута стійкість до антибіотиків може бути зумовлена синтезом ферментів, які руйнують їх (лактамаза руйнує β -лактамне кільце пеніцилінів), обмеженням доступу антибіотика до мішені, зниженням метаболічної цінності мішені, винесенням молекул антибіотика з бактеріальної клітини спеціалізованою системою, гіперпродукцією молекул мішені. Набута стійкість може бути пов'язана зі зміною фенотипу або генотипу мікроорганізму [4].

За фенотипової стійкості підвищується стійкість до антибіотика більшості особин популяції, яка в цьому випадку має адаптивний тимчасовий характер і є результатом репресії-дерепресії генів хромосоми або плазмід. Генотипова стійкість виникає внаслідок одно- чи багатоступеневої мутації у хромосомі або R-плазмідах, а також унаслідок передачі шляхом кон'югації, трансдукції, трансформації або транслокації генів стійкості транспозонами R-плазмиди чи ділянки хромосоми, яка відповідає за стійкість [5].

Спільний вплив двох або трьох антибіотиків залежно від механізмів їхньої дії може справити сумарний (адитивний), нижче сумарного (антагоністичний) або вищий від сумарного (синергетичний) ефект [6, 7].

Антибіотики мікробного походження мають широке застосування в медичній практиці. Для вибору антибіотика, необхідного для лікування певного захворювання, використовують метод індикаторних дисків [8–10], принцип якого полягає в тому, що паперові диски, насичені розчинами різних антибіотиків, поміщають на поживне агаризоване середовище, засіяне досліджуваною культурою. Антибіотик на вологій поверхні дифундує в агар і припиняє ріст мікроорганізмів, якщо вони чутливі до нього, в результаті чого навколо диска утворюється «стерильна зона». Ступінь чутливості прокариот до антибіотика визначається розміром стерильної зони (чим вона більша, тим чутливіші бактерії до досліджуваного антибіотика) [11, 12].

При аналізі мікоплазмозних інфекцій використовують реакцію пригнічення їх росту в умовах культивування на штучних середовищах з додаванням специфічних флюоресцентних антисироваток [13].

Поширення мікоплазм у природі свідчить, що вони є дуже пристосованими мікроорганізмами, які швидко еволюціонують. Не виключено, що процеси видоутворення у мікоплазм можуть проходити за дуже короткий час. Через швидкість власної еволюції мікоплазми можуть бути важливим чинником еволюції біосфери. Персистенція мікоплазм може призводити до помітних зрушень у генетичній структурі популяції організмів. Генетично опосередковані сприйнятливість і чутливість до мікоплазмозних інфекцій важко діагностуються та викликають патології організму, що ми спостерігаємо на їстівних грибах.

Важливою і необхідною передумовою запобігання поширенню мікоплазмозної інфекції та подальшим втратам урожаю є своєчасна ідентифікація і діагностика цих збудників.

Мета досліджень – провести скринінг і діагностику печериці дво-спорової (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) на предмет інфікування мікоплазмами для отримання грибного міцелю на безінфекційній основі.

Матеріал і методика. Дослідження проводили на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів

і природокористування України впродовж 2015–2019 рр. Матеріал для досліджень відбирали у грибних господарствах Васильківського і Києво-Святошинського районів Київської області (40 зразків).

Досліджували міцелій, покрівельний ґрунт, субстрат та плодові тіла печериці двоспорової. Для експерименту відбирали плодові тіла із вираженими симптомами захворювання і без них. За інфікованими грибами спостерігали впродовж хвиль плодоношення. Контролем були плодові тіла печериці двоспорової, які добирали за результатами візуальної оцінки на ураження та електронно-мікроскопічного аналізу в лабораторних умовах. Із основних зразків відбирали проби, на яких проводили дослідження.

Зерновий міцелій печериці двоспорової представлений штамом *Sylvan A-15*, внесеним до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні. Штам *Sylvan A-15* належить до групи «Middle range», яка утворює гриби середнього і великого розміру, чисто білі, гладенькі, іноді трохи шорсткі, що добре зберігаються. Коротший, порівняно із середньостатистичним, період появи плодових тіл (на 2–3 доби) дає можливість збільшити число культурооборотів протягом року. Вимогливість до якості субстрату помірна. Примордії зав'язуються легко і одночасно. Штам користується великою популярністю у грибоводів усього світу. Норма засіву штаму Сілван А-15 – 0,8 кг/м², вихід товарної продукції – 25–26 кг/м².

Візуальна діагностика мікоплазмових інфекцій. Специфічні симптоми мікоплазмозів: деформація плодових тіл, витягнутість ніжок і відмирання шапинок, утворення енацій на плодових тілах, побуріння міцелію, різка зміна морфології та текстури плодових тіл тощо (рис. 1).



Рис. 1. Витягнутість ніжок – симптом зміни морфології плодових тіл печериці двоспорової

На мікоплазмову природу некрозів часто вказує наявність ексудату (рис. 2).

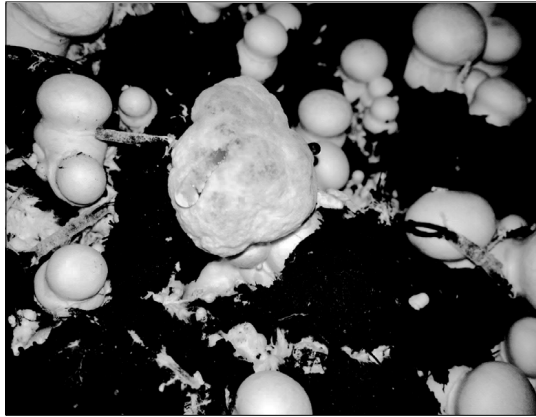


Рис. 2. Виділення ексудату при ураженні мікогеном – один з головних симптомів мікоплазмозів (Національне грибне агенство UMDIS) [14]

Одним із симптомів мікоплазмозу є муміфікація (збудник – бактерії з роду *Pseudomonas*).

Мікробіологічний метод виявлення мікоплазмозу. Збудника хвороби виділяли у чисту культуру і заражали гриби; після появи симптомів, схожих з початковими, знову ізолювали збудника в чисту культуру.

Мікроскопічні дослідження мікоплазм. Препарат для мікроскопічного аналізу готували з тканини, взятої з ділянки між ураженою і здоровою тканиною. Використовували забарвлення препарату (наприклад, за Грамом), яке полегшує розпізнавання бактеріальних клітин у тканинах господаря.

Електронно-мікроскопічне дослідження виділених патогенів проводили методом негативного контрастування. Як контрастуючі речовини використовували 2 % розчин фосфорновольфрамислової кислоти (ФВК) з рН 7,0 та 2 % розчин ураніацетату (УА). Їх застосовують при контрастуванні біологічних об'єктів у вигляді суспензії. Для виявлення мікоплазм ефективними є методи занурення та розбавленої суспензії. Краї шапинок і ніжок зрізали і занурювали місце зрізу на 1–2 с у краплину дистильованої води, попередньо нанесену на сітку-підкладку. Після висихання краплі отриманий препарат контрастували 2 % ФВК за експозиції 1–3 хв. За методу розбавленої суспензії краплину досліджуваного матеріалу (у буфері або воді) наносили на сітку і контрастували подібно до методу занурення. Після фіксації сітки-підкладки із мікоплазмозміс-

ним матеріалом проводили його аналіз під електронним трансмісійним мікроскопом ЕМВ-3А.

Паралельно проводили також детекцію патогена методом електронної мікроскопії за іншою методикою. Сік досліджуваного плодового тіла печериць розводили 0,02 М калій-фосфатним буфером (КФБ, рН 6,8) у співвідношенні 1:10, додавали 10 мкл Tween 20 у розрахунку на кожну сітку-підкладку і перемішували компоненти протягом 30 с. Отриману суспензію наносили на сітку за температури 21 °С. Контакт 15 хв. Надлишок препарату відбирали фільтрувальним папером і контрастували 5 % розчином УА протягом 2 хв. Після цього сітки відмивали у 0,02 М КФБ тричі по 10 мкл протягом 30 с.

Визначення чутливості мікоплазм до антибіотиків. Для визначення чутливості мікоплазм до антибіотиків проводили наступні маніпуляції. Розплавлене поживне середовище розливали у стерильні чашки Петрі і охолоджували. Кілька крапель суспензії досліджуваної бактеріальної культури переносили стерильною піпеткою на поверхню твердого середовища.

Для одержання рівномірного росту розтирали суспензію бактерій по поверхні середовища в чашці стерильним шпателем (посів газоном); профламбованим пінцетом індикаторні диски розміщували на поверхні м'ясо-пептонного агару; на кожну чашку поміщали не більше 5–6 різних індикаторних дисків; чашки підписували і залишали на ніч у термостаті за температури 30 °С. Далі в чашках визначали наявність стерильних зон навколо індикаторних дисків. Лінійкою вимірювали їх діаметр і занесли результати до таблиці. Високочутливими до досліджуваного антибіотика вважають мікроорганізми, зона затримки росту яких навколо індикаторного диска перевищує 25 мм, чутливими – 15–25 мм, малочутливими – 11–15 мм [13].

Статистичний аналіз. Аналіз даних проводили шляхом розподілу за найменшою суттєвою різницею Фішера (LSD). Кожен аналіз проводили у п'яти повтореннях. Статистичне значення було встановлено на $p \leq 0,05$ [6].

Обговорення результатів.

Візуальна діагностика мікоплазм печериці. У 17 зразків із 40 виявлено симптоми, характерні для мікоплазмозних хвороб.

Уражені мікоплазмозами гриби набували сіруватого кольору, передчасно розкривалися; під час другої хвилі плодоношення ніжка ставала зігнутою, а шапинка нахиленою; часто відбувалось потовщення підстави ніжки, яка покривалась пухнастим кільцем міцелію; гриби ставали жорсткими і губчастими або шкірясто-сухими (муміфікованими), колір змінювався з сірувато-білого на коричневий (рис. 3).



Рис. 3. Муміфікація плодових тіл печериці – один із симптомів мікоплазмозу

У 36 % досліджених зразків спостерігали наявність ексудату, що свідчить про мікоплазмову природу некрозів.

На присутність мікоплазми нами був протестований і покрівельний ґрунт (рис. 4). Обстеження проводили у третій хвилі плодоношення. З'ясовано, що мікоплазмові симптоми у випадку інфікування покрівельного ґрунту збігалися із даними щодо виділення та ідентифікації хвороби.

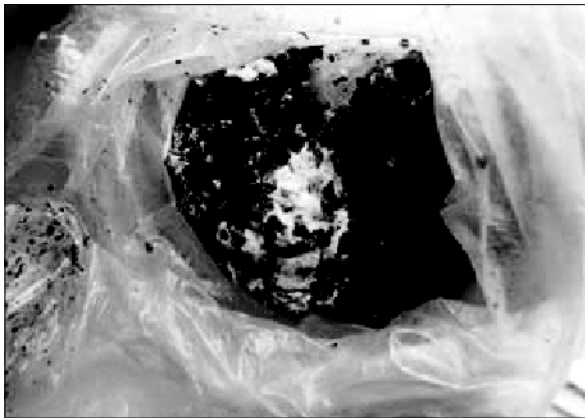


Рис. 4. Заражені триходермою плоді тіла печериці з інфікованим покрівельним ґрунтом

Мікроскопічні дослідження мікоплазм. За електронно-мікроскопічного дослідження після контрастування отриманого препарату 2 % ФВК

збільшили час експозиції до 5 хв. Нами виявлено амальгаму мікоплазми глибинного міцелію *Agaricus bisporus* штаму Сілван А-15 групи «Middle range». Досліджувана мікоплазма має схожі з фітоплазмами характеристики. Електроннограма підтверджує присутність конгломерату мікоплазми розміром від 50 до 60 нм за умов збільшення $\times 50000$ (рис. 5).

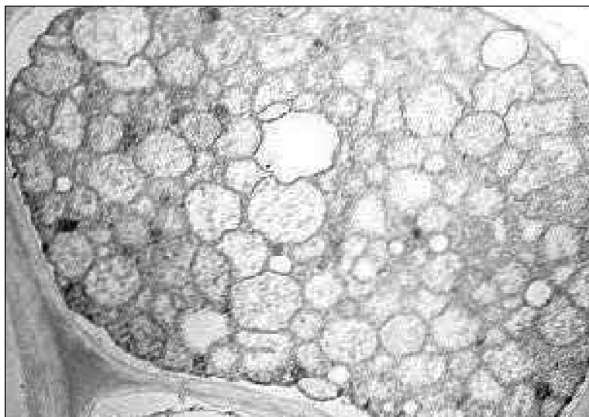


Рис. 5. Електроннограма конгломерату мікоплазм 50–60 нм *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach, $\times 50000$

Мікробіологічний метод виявлення мікоплазмозу. Нами встановлено, що виділені з уражених тканин на штучні живильні середовища збудники здатні викликати на штучно інфікованих грибах ті ж симптоми, які були на досліджуваному об'єкті за природного зараження.

Визначення чутливості мікоплазм до антибіотиків. Цей метод включає дослідження з чистою культурою патогенів (рис. 6).

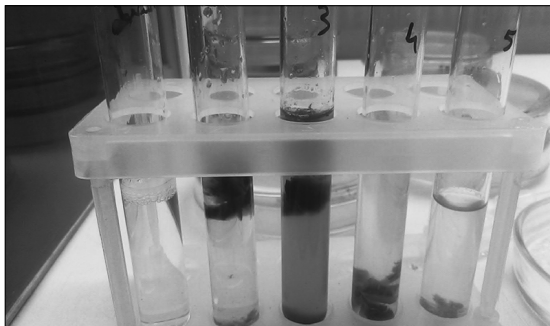


Рис. 6. Досліджувані суспензійні зразки (зліва направо): бактеріальна іржа, мікогон, муміфікація, копринус, бактеріальне ураження субстрату

Застосовували індикаторні диски з такими антибіотиками: 1) блакитні (Біц) – Біцилін; 2) жовті (Стр) – Стрептоміцин; рожеві (Амо) – Амоксил; сині (Цеф) – Цефтриаксон. У таблиці представлено результати визначення чутливості патогенів печериці двоспорової за допомогою індикаторних дисків з антибіотиками.

Таблиця. Чутливість збудників хвороб та мікоплазм печериці двоспорової до антибіотиків

Хвороба, збудник	Антибіотик	Діаметр стерильної зони, мм
Бактеріальна іржа	Біц, Амо	17
Мікогон	Біц, Стр, Амо, Цеф	29
Муміфікація	Біц, Стр, Амо, Цеф	27
Копринус	Біц, Амо	19
Бактеріальне ураження субстрату	Біц	12

Високочутливими до досліджуваних антибіотиків виявилися мікогон і збудник муміфікації (стерильна зона 29 мм), чутливими – копринус і збудник бактеріальної іржі (19 мм), малочутливими – збудник бактеріального ураження субстрату (12 мм).

Нами удосконалено методику діагностики мікоплазм на їстівних грибах виду *A. bisporus*, що полягає у визначенні симптомів специфічного характеру – некрозів та ексудату в грибах. За електронно-мікроскопічного дослідження після контрастування препарату 2 % ФВК час експозиції збільшили до 5 хв.

Боротьба з інфекцією включає такі лікувальні та профілактичні заходи, як отримання та використання здорового посівного матеріалу; знищення бур'янів – резерваторів мікоплазми у соломі, яку використовують у приготуванні субстратів для вирощування грибів; боротьба з комахами-переносниками; створення стійких штамів грибів; карантин і сертифікація посівного матеріалу; вирощування грибів на високому агрофоні.

Висновки. Здійснено первинний скринінг зразків печериці в умовах закритого ґрунту на предмет інфікування мікоплазмою з використанням методів візуальної діагностики та мікроскопії плодкових тіл і міцелію. Оптимізовано методи детекції мікоплазмозних інфекцій на культурі грибів. Високочутливими до досліджуваних антибіотиків виявилися збудники мікогону і муміфікації, чутливими – копринус і бактеріальна іржа, малочутливими – бактеріальне ураження субстрату.

Визначення чутливості мікоплазм до антибіотиків та розробка захисних механізмів при ураженні печериці мікоплазмами є перспективними методами для попередньої ідентифікації та діагностики фітопатогенних мікоплазм. Їх використання в епідеміологічних дослідженнях збудників мікоплазмозів грибів є початковим і необхідним кроком для запобігання поширенню мікоплазмозної інфекції як в Україні, так і за її межами.

Список використаних джерел

1. Марков І. Л., Башта О. В., Гентош Д. Т., Глим'язний В. А., Дерменко О. П., Черненко Є. П. Фітопатологія / за ред. І. Л. Маркова. Київ : Ліра-К, 2017. 548 с.
2. Дмитрик П. М. Фітопатологія. Івано-Франківськ : [б. в.], 2015. 127 с.
3. Чернов В. М., Мухаметшина Н. Е., Гоголев Ю. В., Нестерова Т. Н., Чернова О. А. Адаптація микоплазм к небагаторизним умовам росту: нанотрансформація і фітопатогенність *Acholeplasma laidlawii* PG8. Доклады Академии наук. 2007. Т. 413, № 2. С. 271–275.
4. Власов Ю. И., Геворкян З. Г. Микоплазменные болезни сельскохозяйственных растений. Ереван : Изд. АН Арм. ССР, 1981. 126 с.
5. Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. Санкт-Петербург : Наука, 2002. 319 с.
6. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Яковлева Л. М., Мороз С. М., Литвинчук О. О., Житкевич Н. В., Ходос С. Ф., Буценко Л. М., Данкевич Л. А., Гриник І. В., Патики В. П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / за ред. В. П. Патики. Київ : ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. Т. 1. 444 с.
7. Чернов В. М., Чернова О. А., Тарчевский И. А. Феноменология микоплазменных инфекций растений. Физиология растений. 1996. Т. 43, № 5. С. 721–728.
8. Methods in Mycoplasmaology. Vol. II : Diagnostic Mycoplasmaology / J. G. Tully, S. Razin (eds.). San Diego : Academic Press, 1983. 464 p. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-583802-3.X5001-0>
9. Wise K. S., Yogev D., Rosengarten R. Antigenic variation. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* / J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, J. B. Baseman (eds.). Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1992. P. 473–489.
10. Іванова Т. В. Біотехнологія їстівних грибів. Київ : ЦП «Компринт», 2018. Т. 2. 160 с.
11. Pereima I. V., Ivanova T. V. Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta*. 2017. Vol. 10, No. 6. P. 45–52. doi: 10.15407/biotech10.06.045
12. Choi I. Y., Joung G. T., Ryu J., Choi J. S., Choi Y. G. Physiological characteristics of green mold (*Trichoderma* spp.) isolated from oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Mycobiology*. 2003. Vol. 31, Iss. 3. P. 139–144. doi: 10.4489/myco.2003.31.3.139
13. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: 2-е вид., пер. і доп. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.
14. Національне грибне агентство UMDIS, 2017. URL: <https://cdn6.sellbe.com/p64/s-64301/file/mycogon/micogon4.jpg>

References

1. Markov, I. L., Bashta, O. V., Gentosh, D. T., Hlymiaznyi, V. A., Dermenko, O. P., & Chernenko, Ye. P. (2017). *Phytopathology*. I. L. Markov (Ed.). Kyiv: Lira-K. [in Ukrainian]
2. Dmytryk, P. M. (2015). *Phytopathology*. Ivano-Frankivsk: N.p. [in Ukrainian]
3. Chernov, V. M., Mukhametshina, N. E., Gogolev, Yu. V., Nesterova, T. N., & Chernova, O. A. (2007). Mycoplasma adaptation to adverse growth conditions: nanotransformation and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 413(1), 57–60. doi: 10.1134/S1607672907020056
4. Vlasov, Yu. I., & Gevorkyan, Z. G. (1981). *Mycoplasma Diseases of Agricultural Plants*. Yerevan: AS Armenian SSR Publ. [in Russian]
5. Borchsenius, S. N., Chernova, O. A., Chernov, V. M., & Vonskiy, M. S. (2002). *Mycoplasmas: Molecular and Cell Biology, Interaction with Mammalian Immune System, Pathogenicity, and Diagnostics*. St. Petersburg: Nauka. [in Russian]
6. Hvozdiak, R. I., Pasichnyk, L. A., Yakovleva, L. M., Moroz, S. M., Lytvynchuk, O. O., Zhytkevych, N. V., Khodos, S. F., Butsenko, L. M., Dankevych, L. A., Hrynyk, I. V., &

- Patyka, V. P. (2011). Phytopathogenic Bacteria. Bacterial Diseases of Plants. (Vol. 1). Kyiv: SPE "Interservis" Ltd. [in Ukrainian]
7. Chernov, V. M., Chernova, O. A., & Tarchevskiy, I. A. (1996). Phenomenology of mycoplasma infections of plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 43(5), 721–728. [in Russian]
 8. Tully, J. G., & Razin, S. (Eds.). (1983). *Methods in Mycoplasmaology*. Vol. II: Diagnostic Mycoplasmaology. San Diego: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-583802-3.X5001-0>
 9. Wise, K. S., Yogev, D., & Rosengarten, R. (1992). Antigenic variation. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, & J. B. Baseman (Eds.). *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (pp. 473–489). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
 10. Ivanova, T. V. (2018). *Biotechnology of Edible Mushrooms*. Vol. 2. Kyiv: CP "Komprint". [in Ukrainian]
 11. Pereima, I. V., & Ivanova, T. V. (2017). Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta*, 10(6), 45–52. doi: [org/10.15407/biotech10.06.045](https://doi.org/10.15407/biotech10.06.045)
 12. Choi, I. Y., Joung, G. T., Ryu, J., Choi, J. S., & Choi, Y. G. (2003). Physiological characteristics of green mold (*Trichoderma* spp.) isolated from oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Mycobiology*, 31(3), 139–144. doi: [10.4489/myco.2003.31.3.139](https://doi.org/10.4489/myco.2003.31.3.139)
 13. Pyroh, T. P. (2010). *General Microbiology*. Kyiv: National University of Food Technologies. [in Ukrainian]
 14. National Mushroom Agency UMDIS, 2017. Retrieved from <https://cdn6.sellbe.com/p64/s-64301/file/mycogon/micogon4.jpg>

Диагностика микоплазменных инфекций на грибах шампиньона двуспорового в искусственных агроэкосистемах

Иванова Т. В., кандидат сельскохозяйственных наук

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
Украина, 03041, г. Киев, ул. Героев Оборона, 15
e-mail: tivanova1@ukr.net

Цель. Провести скрининг и диагностику шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) на предмет инфицирования микоплазмами для получения грибного мицелия на безинфекционной основе. **Методы.** Визуальные, микробиологические (получение чистой культуры гриба, изучение культуральных свойств колоний, определение чувствительности к антибиотикам), электронная микроскопия, статистические. Исследования проводили в течение 2015–2019 гг. на кафедре экобиотехнологии и биоразнообразия Национального университета биоресурсов и природопользования Украины. Исследовали мицелий (штамм Sylvan A-15, внесенный в Госреестр Украины), покровную почву, субстрат и плодовые тела шампиньона двуспорового (40 образцов), отобранные в грибных хозяйствах Васильковского и Киево-Святошинского районов Киевской области. **Результаты.** У 17 образцов из 40 обнаружены симптомы, характерные для микоплазменных болезней. Диагностированы присущие им симптомы: приобретение молодыми плодовыми телами серой окраски, преждевременное раскрытие шляпок. О микоплазменной природе свидетельствует и наличие экссудатов в образцах, которые наблюдали у 36 % исследованных образцов. В случае инфицирования покровной почвы симптомы совпадали с данными относительно выделения и идентификации болезни. Электронограмма подтверждает присутствие конгломерата микоплазмы в глубинном мицелии шампиньона двуспорового. Высокочувствительными к антибиотикам оказались образцы микогона и мумификации (стерильная зона вокруг индикаторного диска с антибиотиком составляет 29 мм), чувствительными – копринус и бактериальная ржавчина (19 мм),

слабочувствительными – бактериальное поражение субстрата (12 мм). Усовершенствована методика диагностики микоплазм на грибах вида *A. bisporus* по специфическим симптомам – некрозу и экссудату. **Выводы.** Проведен первичный скрининг образцов шампиньона в условиях закрытого грунта с использованием визуального метода и электронной микроскопии для диагностики инфицирования микоплазмой плодовых тел и мицелия. Оптимизированы микробиологические методы детекции микоплазменных инфекций на культуре грибов.

Ключевые слова: *Agaricus bisporus*, диагностирование, микоплазменные инфекции, мицелий, плодовые тела, источники инфицирования

Diagnosis of mycoplasmal infections on common mushroom in artificial agroecosystems

Ivanova T. V., Candidate of Agricultural Sciences

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
1, Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine
e-mail: tivanova1@ukr.net

Purpose. To screen and diagnose common mushroom (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) for infection with mycoplasmas to obtain mushroom spawn free of infection. **Methods.** Visual, microbiological (obtaining pure fungus culture, studying cultural properties of colonies, determining sensitivity to antibiotics), electron microscopy, statistical. The studies were conducted during 2015–2019 at the Department of Ecobiotechnology and Biodiversity of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. There were studied spawn (strain Sylvan A-15, included in the State Register of Ukraine), casing material, substrate, and fruit bodies of common mushroom (40 samples) selected in mushroom farms in Vasylkiv and Kyiv-Sviatoshyn districts of Kiev region. **Results.** In 17 samples out of 40, symptoms of mycoplasma diseases were found. The symptoms inherent to them were diagnosed: acquisition of gray coloring by young fruit bodies, premature cap opening. Occurrence of exudates in the samples which was observed in 36% of the studied samples also indicates mycoplasmal nature. In the case of infection of casing material, the symptoms coincided with the data on the isolation and identification of the disease. The electron diffraction pattern confirms the presence of mycoplasma conglomerate in the deep spawn of common mushroom. Mycogone and mummification samples appeared to be highly sensitive to antibiotics (the sterile area around indicator disc with the antibiotic was 29 mm), Coprinus and bacterial rust pathogen were the sensitive ones (19 mm), and bacterial lesion of substrate was the sensitive one (12 mm). The method for diagnosing mycoplasmas on fungi of the species *A. bisporus* has been improved for specific symptoms: necrosis and exudate. **Conclusions.** Primary screening of common mushroom samples in greenhouse conditions was performed using visual method and electron microscopy to diagnose mycoplasma infection of fruit bodies and spawn. Microbiological methods for the detection of mycoplasma infections in mushroom culture have been optimized.

Key words: *Agaricus bisporus*, diagnosis, mycoplasmal infections, spawn, fruit bodies, sources of infection