

АНОТАЦІЯ

Регада Л. В. Біологічні особливості видів роду *Pholiota* (Fr.)P.Kumm. у культурі – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню морфолого-культуральних, фізіологічних та біосинтетичних характеристик 18 штамів 8 видів роду *Pholiota* з Колекції культур шапинкових грибів (IBK), зокрема 6 штамів 3 видів роду *Pholiota*, виділених здобувачем з карпофорів, зібраних на території України.

В результаті проведених молекулярно-генетичних досліджень для 5 видів роду *Pholiota* – *P. adiposa*, *P. aurivella*, *P. limonella*, *P. nameko* та *P. squarrosa* було підтверджено видову приналежність культур.

Дослідження морфолого-культуральних характеристик роду *Pholiota* (8 видів 18 штамів) дозволило виявити, що морфологічні особливості колоній були видоспецифічними, проте у всіх досліджених видів ця ознака змінювалась в залежності від складу живильного середовища. За результатами дослідження встановлено характеристики, які необхідно враховувати для підтвердження таксономічної приналежності культур видів роду *Pholiota* – морфологія та забарвлення вегетативного міцелію. Наявність додаткових ознак було відмічено лише для деяких видів – тяжі вегетативного міцелію формувалися під час росту культур *P. aurivella* (глюкозо-пептон-дріжджовий агар) та *P. limonella* (глюкозо-пептон-дріжджовий агар, мальц-екстракт агар), виділення крапель ексудату на мальц-екстракт агарі спостерігалось для *P. aurivella*, *P. squarrosa* та *P. subochracea*, забарвлення реверзumu колоній змінювалось на обох середовищах у штамів видів *P. alnicola*, *P. nameko*, *P. squarrosa* та на мальц-екстракт агарі – у *P. populnea*.

Штамових особливостей досліджених нами культур за ознакою морфології колоній не було виявлено.

Встановлена різниця у швидкості радіального росту для культур різних видів роду *Pholiota* та штамів одного виду залежно від складу живильного середовища. Відмічено, що за показниками швидкості росту кращим середовищем для більшості штамів є глюкозо-пептон-дріжджовий агар, на якому цей параметр становив від $0,72 \pm 0,13$ до $2,24 \pm 0,18$ мм/добу. За даними радіальної швидкості росту досліджені нами штами видів роду *Pholiota* можна віднести до повільнозростаючих.

Досліджено мікроморфологічні особливості вегетативного міцелію 8 видів роду *Pholiota* з Колекції культур (ІБК). За допомогою сканувальної електронної мікроскопії вперше проведено детальне дослідження мікроструктур штамів *P. alnicola*, *P. limonella*, *P. nameko* та *P. subochracea* для встановлення морфологічної характеристики та ідентифікації цих таксонів у чистій культурі. Вперше виявлено існування таких структур вегетативного міцелію як анастомози для *P. limonella*, *P. nameko*, *P. squarrosa*, *P. subochracea*; кондіальне спороношення – для *P. alnicola*, *P. nameko*, *P. populnea*, *P. squarrosa*, *P. subochracea*; кристали – для *P. alnicola*, *P. limonella*, *P. populnea*, *P. nameko*, *P. subochracea*; міцеліальні плівки – для *P. nameko*, *P. subochracea*; хламідоспори – для *P. alnicola*, *P. limonella*, *P. nameko*, *P. subochracea*. Для *P. populnea* вперше було відмічено існування секреторних гіф та вакуолізованого міцелію у чистій культурі, а для *P. subochracea* – орнаментацию гіф вегетативного міцелію. Отримано нову інформацію про наявність гіфальних кілець для трьох видів роду *Pholiota* – *P. alnicola*, *P. limonella* та *P. subochracea*.

Встановлено, що представники роду *Pholiota* не здатні до росту в умовах підвищених температурних значень – жоден із штамів досліджених видів не ріс за температури 36 °С. Граничні температури, після впливу яких не відбувається відновлення росту вегетативного міцелію досліджених штамів видів роду *Pholiota*, варіювали від 36°C (*P. squarrosa* 2606) до 41°C (*P. aurivella*).

Виявлено вплив кислотності живильного середовища на накопичення біомаси. З'ясовано, що рН 5,5-6,5 (залежно від виду роду *Pholiota*) є оптимальними для продукції біомаси досліджених штамів на глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі порівняно із більш високими та низькими значеннями кислотності середовища – вихід біомаси становив від 2,70 г/л (*P. alnicola*) до 6,26 г/л (*P. limonella*, *P. aurivella*).

Вперше отримано дані щодо накопичення та продуктивності синтезу ендополісахаридів у вегетативному міцелії 7 видів роду *Pholiota*. Показники вмісту ендополісахаридів варіювали від $1,44 \pm 0,10$ до $2,85 \pm 0,16\%$ сухої біомаси для *P. subochracea* та *P. adiposa* відповідно. Найнижчі показники продуктивності накопичення ендополісахаридів становили 50 ± 3 мг/л для *P. alnicola*, найвищі спостерігали для *P. nameko*, а саме, 120 ± 10 мг/л.

Вперше встановлено наявність та кількісні показники вмісту та продуктивності синтезу тритерпенових кислот ланостанового типу у міцелії представників роду *Pholiota*. Досліджені штами значною мірою відрізнялись за вмістом тритерпенових кислот – від $2,31 \pm 0,12$ мг/г (*P. limonella*) до $13,24 \pm 0,57$ мг/г (*P. subochracea*). Максимальна продуктивність синтезу тритерпенових кислот ланостанового типу була отримана для *P. aurivella* та *P. subochracea* – $29,87 \pm 1,08$ мг/л і $50,58 \pm 2,20$ мг/л відповідно. Мінімальне значення цього показника було зафіксовано для видів *P. limonella* ($14,45 \pm 0,75$ мг/л), *P. nameko* ($15,41 \pm 1,25$ мг/л) та *P. squarrosa* ($15,86 \pm 2,37$ мг/л).

Вперше встановлено вміст та продуктивність синтезу фенольних речовин представниками роду *Pholiota* в біомасі та культуральній рідині. Найбільший вміст цих речовин у вегетативному міцелії зафіксовано для штамів *P. alnicola*, *P. squarrosa*, найменший – для *P. nameko* та *P. aurivella*. Для культуральної рідини отримані дані варіювали від $0,48 \pm 0,01$ мг/г (*P. aurivella*) до $10,83 \pm 0,78$ мг/г (*P. limonella*). Максимальний показник продуктивності синтезу фенольних сполук у міцелії фіксували для *P. limonella* ($222,92 \pm 6,0$ мг/л), мінімальний становив $103,54 \pm 3,43$ мг/л для *P. alnicola*. Для екстрактів культуральної рідини ці показники варіювали від $1,19 \pm 0,17$ мг/л до $27,08 \pm 2,40$ мг/л для *P. aurivella* і *P. limonella* відповідно.

У результаті проведеного антимікробного скринінгу досліджених штамів виявлено антифунгальну активність екстрактів культуральної рідини *P.adiposa* 2169 відносно *Aspergillus niger* (зона інгібування становила 44 мм), *Penicillium pollonicum* (зона інгібування 35 мм) та *Mucor globosus* (зона інгібування 57 мм).

Вперше досліджено вплив біомаси видів роду *Pholiota* на проростання насіння та ріст проростків *Lepidium sativum* та *Cucumis sativus* (концентрація біомаси складала 0,625 мкг/мл). Біомаса представників роду *Pholiota* не впливала на процес проростання насіння *L. sativum* та *C. sativus*. Алелопатичний ефект біомаси вегетативного міцелію всіх досліджених видів роду *Pholiota* спостерігали для різних частин проростка – як кореня, так і пагону. Значні алелопатичні властивості були виявлені для трьох видів роду *Pholiota* – *P. adiposa*, *P. nameko* та *P. subochracea*, де пригнічувальний ефект на обидва види насінних проростків становив понад 50%. Зафіксовано зміни в опушенні, кількості і розмірах бічних коренів рослин залежно від біомаси дослідженого виду роду *Pholiota*.

Вперше визначено величину та межі варіювання антиоксидантної активності біомаси та культуральної рідини для штамів семи видів роду, а саме *P. adiposa*, *P. alnicola*, *P. aurivella*, *P. limonella*, *P. nameko*, *P. squarrosa*, *P. subochracea*. Порівнюючи отримані дані, можна зробити висновок про значно вищу ефективність антиоксидантної дії у випадку метанольних екстрактів біомаси – показники варіювали від $65,98 \pm 0,98\%$ (*P.nameko*) до $83,6 \pm 1,4\%$ (*P.alnicola*). Для екстрактів культуральної рідини максимальні значення були зафіксовані у випадку *P. limonella* ($38,3 \pm 1,14\%$), а мінімальні відмічали для *P.subochracea* ($7,37 \pm 0,46\%$)

Ключові слова: мікологія, *Pholiota*, штам, вегетативний міцелій, мікроструктура, рН, алелопатія, антиоксидантна активність, полісахариди, фенольні сполуки.

SUMMARY

Reheda L.V. Biological features of *Pholiota* (Fr.) P. Kumm. species in culture – Qualifying scientific work, manuscript.

Thesis for a PhD, Program Subject Area 091 Biology. – M. G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to studying cultural and morphological, physiological, and biosynthetic characteristics of 18 strains of 8 *Pholiota* species from the IBK Mushroom Culture Collection, particularly six strains of 3 *Pholiota* species, isolated by the applicant from carpophores collected in Ukraine.

As a result of molecular and genetic studies for 5 strains of *Pholiota* species – *P.adiposa*, *P. aurivella*, *P. limonella*, *P. nameko*, and *P. squarrosa* confirmed the species affiliation of cultures.

Study of morphological and cultural characteristics of 8 species of 18 strains of *Pholiota* genus revealed that the morphological features of the colonies were species-specific, but in all studied species, this feature varied depending on the nutrient medium composition. According to the results of the study, the characteristics that must be taken into account to confirm the taxonomic affiliation of *Pholiota* species cultures – colony morphology and color of the vegetative mycelium. The presence of additional features was noted only for some species – strands of vegetative mycelium were formed during the growth of *P.aurivella* (glucose-peptone-yeast agar) and *P. limonella* (glucose-peptone-yeast agar, malt extract agar) cultures, the release of exudate droplets on malt extract agar was observed for *P. aurivella*, *P. squarrosa* and *P.subochracea*, the color of the reverse changed on both media in the strains of *P.alnicola*, *P. nameko*, *P.squarrosa* and on the malt extract agar in *P. populnea*. Strain features of the studied cultures on the basis of the colonies morphology were not detected.

The difference in the radial growth rate for cultures of different *Pholiota* species and strains of the same species depending on the nutrient medium composition. It was noted that in terms of growth rate, the best medium for most strains is glucose-peptone-yeast agar, on which this parameter ranged from

0,72±0,13 to 2,24 ± 0,18 mm / day. According to the radial growth rate, the studied strains of *Pholiota* species can be attributed to slow-growing.

The micromorphological features of the vegetative mycelium of *Pholiota* genus (8 species and 18 strains) from the *IBK Culture Collection* were studied. For the first time, a detailed study of the microstructures of *P. alnicola*, *P. limonella*, *P.nameko* and *P.subochracea* was performed to establish the morphological characteristics and identification of these taxa in pure culture using scanning electron microscopy. For the first time the existence of such vegetative mycelium structures as anastomoses for *P. limonella*, *P. nameko*, *P. squarrosa*, *P.subochracea* was revealed; conidial sporulation – for *P. alnicola*, *P. nameko*, *P.populnea*, *P. squarrosa*, *P.subochracea*; crystals – for *P. alnicola*, *P. limonella*, *P. populnea*, *P. nameko*, *P.subochracea*; mycelial spots – for *P.nameko*, *P.subochracea*; chlamydospores – for *P.alnicola*, *P. limonella*, *P.nameko*, *P.subochracea*. For *P. populnea*, the existence of secretory hyphae and vacuolated mycelium was observed for the first time in pure culture, and for *P.subochracea*, ornamentation of vegetative mycelial hyphae was noted. New information on the presence of hyphal rings for three species of the genus *Pholiota* – *P. alnicola*, *P.limonella* and *P.subochracea*.

Limit temperatures have been established, after the influence of which the growth of vegetative mycelia of the studied strains of *Pholiota* species is not restored. These values ranged from 36 °C (*P. squarrosa* 2606) to 41 °C (*P.aurivella*).

The influence of nutrient acidity on biomass accumulation is revealed. It was found that pH 5,5-6,5 (depending on the *Pholiota* species) are optimal for biomass production of the studied strains on glucose-peptone-yeast medium, compared with higher and lower values of acidity of the medium – the biomass yield was from 2,70 g / l (*P. alnicola*) to 6,26 g / l (*P. limonella*, *P. aurivella*).

Data on the accumulation and productivity of endopolysaccharide synthesis in the vegetative mycelia of seven *Pholiota* species were obtained. Endopolysaccharide content ranged from 1,44 ± 0,10 to 2,85 ± 0,16% of dry biomass for *P. subochracea* and *P. adiposa*, respectively. The lowest

endopolysaccharide accumulation rate was 50 ± 3 mg/l for *P. alnicola*; the highest was observed for *P. nameko*, namely 120 ± 10 mg/l.

The presence and quantitative indicators of the lanostane type triterpene acids content and synthesis productivity in *Pholiota* genus have been established. The study found triterpene acids in the vegetative mycelia of all strains in various amounts – from $2,31 \pm 0,12$ mg/g (*P. limonella*) to $13,24 \pm 0,57$ mg/g (*P.subochracea*). The maximum lanostane type triterpene acids productivity of synthesis was obtained for *P. aurivella* and *P. subochracea* – $29,87 \pm 1,08$ mg/l and $50,58 \pm 2,20$ mg/l, respectively. The minimum value of this indicator was recorded for *P. limonella* ($14,45 \pm 0,75$ mg/l), *P. nameko* ($15,41 \pm 1,25$ mg/l) and *P.squarrosa* ($15,86 \pm 2,37$ mg/l).

The phenolic compounds content and productivity of synthesis in *Pholiota* genus in biomass and culture fluid were established. The highest content of these compounds in the vegetative mycelia was recorded for *P. alnicola* and *P.squarrosa* strains, the lowest – for *P. nameko* and *P. aurivella*. For culture fluid, the obtained data ranged from $0,48 \pm 0,01$ mg/g (*P. aurivella*) to $10,83 \pm 0,78$ mg/g (*P.limonella*). The maximum productivity of phenolic compounds synthesis in mycelia was observed for *P. limonella* ($222,92 \pm 6,0$ mg/l); the minimum was $103,54 \pm 3,43$ mg/l for *P. alnicola*. For culture fluid, these values ranged from $1,19 \pm 0,17$ mg/l to $27,08 \pm 2,40$ mg/l for *P. aurivella* and *P. limonella*, respectively.

Antimicrobial screening of the studied species extracts was performed. The antifungal activity of *Pholiota adiposa* 2169 culture fluid methanolic extracts against *Aspergillus niger* (inhibition zone was 44 mm), *Penicillium pollonicum* (35 mm inhibition zone) and *Mucor globosus* (57 mm inhibition zone) was detected.

The influence of *Pholiota* species biomass on seed germination and seedling growth of *Lepidium sativum* and *Cucumis sativus* was studied for the first time (the biomass concentration was $0,625$ µg/ml). The presence of *Pholiota* biomass did not affect the seeds germination of *L.sativum* and *C. sativus*. Vegetative mycelial biomass allelopathic effect of all studied *Pholiota* species was observed on

different parts of the seedling – both root and shoot. Significant allelopathic properties were found for 3 *Pholiota* species – *P.adiposa*, *P. nameko*, and *P. subochracea*, where the inhibitory effect on both types of seedlings was more than 50%. Changes in pubescence, number and size of lateral roots of plants are recorded depending on the *Pholiota* species biomass.

For the first time the magnitude and limits of antioxidant activity variation of biomass and culture fluid extracts were determined for seven species of the genus, namely *P.adiposa*, *P. alnicola*, *P. aurivella*, *P. limonella*, *P. nameko*, *P. squarrosa*, *P. subochracea*. Comparing the obtained data, we can conclude that the efficiency of antioxidant activity is much higher in the case of biomass methanol extracts – the indicators ranged from $65,98 \pm 0,98\%$ (*P.nameko*) to $83,6 \pm 1,4\%$ (*P.alnicola*). For culture fluid extracts, the maximum values were recorded in the case of *P.limonella* ($38,3 \pm 1,14\%$), and the minimum was observed for *P.subochracea* ($7,37 \pm 0,46\%$).

Keywords: mycology, *Pholiota*, strain, vegetative mycelium, microstructure, pH, allelopathy, antioxidant activity, polysaccharides, phenolic compounds

**Статті у періодичних наукових виданнях держав, які входять до
Організації Економічного Співробітництва**

1. Regeda L.V., Bisko N.A. (2020). The effect of initial pH on production mycelial biomass of *Pholiota* (*Strophariaceae*, *Basidiomycota*) species in liquid static culture. *International Journal of Applied Biology and Environmental Science*, 2(1), 1-3.

(*Особистий внесок здобувача*: ізольовано деякі культури грибів, виконано усі експериментальні роботи з культивування об'єктів дисертації за різних умов, проаналізовано отримані результати, написано текст статті у співпраці з науковим керівником)

**Статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових видань
України**

1. Regeda L. V., Bisko N. A. (2019). Micromorphological characteristics of the species of *Pholiota* (*Strophariaceae*, *Basidiomycota*) in pure culture. *Ukrainian Botanical Journal*, 76(2), 114-20.
(*Особистий внесок здобувача*: здобувачем були ізольовані культури грибів, проведені усі дослід з культивування культур базидієвих грибів та підготовки зразків для сканувальної електронної мікроскопії, написано основну частину тексту статті)
2. Регада Л. В., Бісько Н.А. (2020). Культурально-морфологічні характеристики видів роду *Pholiota* (*Strophariaceae*, *Basidiomycota*) на агаризованих живильних середовищах. *Український ботанічний журнал*, 77(1), 56-63.
(*Особистий внесок здобувача*: виконання досліджень щодо культивування об'єктів дисертації на агаризованих середовищах різного складу, аналіз отриманих результатів, написання тексту роботи разом з науковим керівником)
3. Regeda L. V., Bisko N. A., Al-Maali G. (2021). Influence of *Pholiota* spp. (*Strophariaceae*, *Basidiomycota*) mycelial biomass on seed germination and

seedlings growth of *Lepidium sativum* L. and *Cucumis sativus* L. Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv: Biology, 84(1), 53-60.

(*Особистий внесок здобувача*: здобувачем було проведено усі досліді щодо алелопатичних властивостей культур роду *Pholiota*, проаналізовано отримані дані, написано основну частину тексту статті)

Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. Regeda L. V. (2018). *Morphological features of species of genus Pholiota (Fr.) P. Kumm. in pure culture*. “Біотехнологія: звершення та надії”: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (с.126-127), Київ.
2. Регада Л. В. (2019). *Мікроморфологічні особливості вегетативного міцелію видів роду Pholiota (Fr.) P. Kumm. у чистій культурі*. “Актуальні проблеми ботаніки та екології”: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (с. 66), Харків.
3. Regeda L. (2019). *Variation in cultural and morphological properties of Pholiota species in pure culture*. “Сьогодення біологічної науки”: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (с. 137-139), Суми.
4. Regeda L. (2021). *The phenolic substances content in methanol extracts of Pholiota species (Strophariaceae, Basidiomycota)*. “Planta+. Наука, практика та освіта”: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (с. 36-38), Київ.