

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АТАМАНЧУК АЛІСА РУСЛАНІВНА

УДК 582.282.162

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
ВИДІВ РОДУ *XYLARIA* HILL EX SCHRANK У КУЛЬТУРІ**

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



А.Р. Атаманчук

Науковий керівник Бісько Ніна Анатоліївна, доктор біологічних наук, професор, головний науковий співробітник відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Атаманчук А.Р. Біологічні особливості видів роду *Xylaria* Hill ex Schrank 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, 2024.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню 28 штамів 7 видів роду *Xylaria* у культурі. Встановлено їхні культурально-морфологічні характеристики, особливості росту за різних умов культивування, біосинтетичну активність, міжвидові взаємодії з іншими грибами у культурі. У роботі наведені експериментально отримані дані щодо вмісту у міцеліальній біомасі та культуральній рідині штамів видів роду *Xylaria* різних біологічно активних сполук: полісахаридів, поліфенолів, меланінів, а також антиоксидантної та антибактеріальної активності.

Описано морфолого-культуральні характеристики міцеліальних колоній штамів видів роду *Xylaria* та встановлено, що найбільша варіабельність морфологічних ознак характерна для штамів *X. polymorpha*. Значно менше варіювали пігментація, текстура та щільність міцеліальних колоній різних штамів *X. longipes* та *X. hypoxylon*. Незважаючи на значну фенотипову мінливість серед штамів, виокремлені певні морфологічні ознаки окремих видів. За швидкістю радіального росту досліджені штами видів роду *Xylaria* можна віднести до повільно зростаючих (швидкість росту не перевищує 4 мм/добу). Аналіз швидкості росту колоній на живильних середовищах різного складу не виявив статистично підтверженої достовірної різниці.

Проведено молекулярно-філогенетичний аналіз на основі отриманих нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера ядерної рДНК та генів, що кодують β -тубулін і другу субодиницю РНК-полімерази II 10 штамів 6 видів роду *Xylaria*. Побудовані дендрограми із залученням імпортованих

із бази даних GenBank консенсусних послідовностей зазначених локусів. В результаті було підтверджено видову приналежність 10 штамів.

Встановлено, що представники роду *Xylaria* не здатні до росту в умовах підвищених температур – для жодного із досліджених штамів ріст за температури $36,0 \pm 0,1$ °C не відмічався. Граничні температури, після впливу яких не відбувалось відновлення росту вегетативного міцелію, варіювали від $36 \pm 0,1$ °C для штамів *X. hypoxylon* до $41 \pm 0,1$ °C для *X. ellisii* IBK 2724.

Досліджено взаємодію штамів видів роду *Xylaria* з іншими грибами, в результаті чого виявлено антагоністичну дію цих грибів відносно *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium polonicum* та *Trichoderma viride*. Загалом антагоністична активність штамів видів роду *Xylaria* щодо перелічених видів грибів проявлялась у пригніченні росту їхніх колоній або на відстані, або у разі міцеліального контакту – у заміщенні колоній шляхом часткового або повного обростання. Найчастіше відмічалась здатність рости поверх колоній *F. solani*, *M. plumbeus* і *C. albicans*. Взаємодія деяких штамів з *A. niger* та *P. polonicum* відбувалась на відстані, з формуванням зони інгібування. Це явище становить особливий інтерес, адже антагонізм між грибами без фізичного міцеліального контакту може бути наслідком продукування ними летких або дифузних антифунгальних сполук. Розрахунок кількісних показників індексів антагонізму для позначення здатності досліджуваних штамів виду роду *Xylaria* конкурувати з тест-культурами виявив вищі значення для штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes* відносно інших видів. Найвищий індекс антагонізму по відношенню до всіх тест-культур грибів був зафіксований для штаму *X. polymorpha* IBK 2720 – 20 балів. Високий ступінь антагонізму штамів видів роду *Xylaria* щодо опортуністичних патогенів може свідчити про значний потенціал досліджуваних штамів як можливих агентів біологічного контролю.

Вперше отримано дані щодо динаміки синтезу ендо- та екзополісахаридів штамами *X. polymorpha* та *X. longipes* при глибинному культивуванні. Показники вмісту ендополісахаридів варіювали від $32,30 \pm 0,87$ мг/г до $120,00 \pm 0,67$ мг/г для

штамів *X. polymorpha* та $38,75 \pm 0,77$ мг/г до $98,33 \pm 1,55$ мг/г для штамів *X. longipes*, відповідно. Вміст екзополісахаридів також був нижчим для штамів *X. longipes* порівняно зі штамми *X. polymorpha* та варіював від $0,15 \pm 0,01$ мг/мл до $0,41 \pm 0,01$ мг/мл та від $0,47 \pm 0,02$ мг/мл до $1,00 \pm 0,02$ мг/мл, відповідно. Зіставлення динаміки накопичення біомаси, ендо- та екзополісахаридів культурами *X. polymorpha* та *X. longipes* виявило відмінності у синхронності цих процесів для різних штамів.

Проведено дослідження динаміки вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у різних екстрактах біомаси та культуральної рідини штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes*, вирощених методом глибинного культивування. Визначено, що склад розчинника мав значний вплив на кількість екстрагованих фенольних сполук із біомаси досліджених штамів видів роду *Xylaria*. Метанол виявився найбільш ефективним для екстракції поліфенолів у порівнянні з етанолом та етилацетатом. Загальний вміст фенольних сполук у біомасі вивчених штамів варіював від $0,33 \pm 0,07$ мг ГКЕ/г у етилацетатних екстрактах до $5,91 \pm 0,01$ мг ГКЕ/г у метанольних екстрактах (зазначені показники є мінімальним і максимальним значенням серед усіх досліджених штамів). У екстрактах культуральної рідини мінімальний та максимальний вміст фенольних сполук був значно нижчий – $0,07 \pm 0,01$ мг ГКЕ/мл та $0,45$ мг ГКЕ/мл, відповідно. Відстеження цих показників у динаміці дозволило виявити, що пік накопичення фенольних сполук відрізнявся в залежності від штаму. Аналогічна динаміка спостерігалась при дослідженні антиоксидантної активності екстрактів біомаси та культуральної рідини штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes*. Досліджені штами проявляли різну антиоксидантну активність. Найвищий показник був зафіксований у біомасі *X. longipes* ІВК 2718, екстрагованій метанолом на 9-ту добу глибинного культивування – $89,50 \pm 0,03\%$. Найнижчу антиоксидантну активність проявляв екстракт культуральної рідини *X. polymorpha* ІВК 2720 ($19,57 \pm 0,65\%$) на 5-ту добу культивування. Взаємозв'язок між вмістом фенольних сполук та антиоксидантною активністю як у біомасі, так і в культуральній рідині всіх досліджених штамів був підтверджений за допомогою кореляційного аналізу.

Здійснено комплексний аналіз пігменту, виділеного із біомаси штамів виду *X. polymorpha*. За допомогою фізико-хімічних аналітичних тестів та спектрометричних досліджень отриманий пігмент було охарактеризовано як меланін. Проведено порівняння вмісту меланінів у біомасі різних штамів *X. polymorpha*. Найнижча продуктивність синтезу цього пігменту спостерігалась для штаму *X. polymorpha* ІВК 2723 – $5,17 \pm 0,36$ мг/л, найвища – для штаму *X. polymorpha* ІВК 2737 зі значенням $180,32 \pm 4,16$ мг/мл.

Визначено антибактеріальну дію екстрактів біомаси та культуральної рідини штамів видів роду *Xylaria* проти *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* та *Pseudomonas aeruginosa*. Отримані результати вказали на вищу антибактеріальну активність екстрактів культуральної рідини у порівнянні з екстрактами біомаси, при цьому зафіксовані зони затримки росту бактеріальних колоній складали від 10 до 14 мм та від 10 до 17 мм, відповідно. За діаметром зон затримки росту та кількістю штамів видів роду *Xylaria*, що проявили антибактеріальну активність, найбільшу ефективність було відмічено проти *P. aeruginosa*. Отримані дані становлять особливий інтерес з огляду на належність цього мікроорганізму до таких, що мають високий рівень пріоритету щодо розробки нових ефективних і безпечних лікарських засобів антимікробної дії.

У підсумку для кожного виду (представленого окремими штамми) розроблено паспорти, що включають рекомендації зі збереження вегетативного міцелію *in vitro*, містять дані щодо видової ідентифікації, особливостей росту та морфології колоній на різних живильних середовищах, температурних режимів культивування та зберігання, критичних температур росту, антагоністичних властивостей відносно інших грибів, біосинтетичної активності.

Ключові слова: Ascomycota, *Xylaria*, антибактеріальна активність, антиоксидантна активність, гриби, ІВК, індекс антагонізму, культуральна рідина, меланін, міцеліальна біомаса, морфологія, поліфеноли, середня швидкість радіального росту міцелію, УФ-спектрофотометрія.

SUMMARY

Atamanchuk A.R. Biological characteristics of Xylaria Hill ex Schrank species in culture. – Qualifying scientific work, manuscript.

Thesis for a scientific degree of Doctor of Philosophy, Program Subject Area 091 Biology. – M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

This dissertation provides results of the thorough research of 28 strains of seven *Xylaria* species studied for their cultural and morphological features, growth characteristics under different cultivation conditions, biosynthetic activity and interspecific interactions with other fungi. The thesis presents experimentally obtained data on the content of various biologically active compounds in mycelial biomass and culture liquid of *Xylaria* strains: polysaccharides, polyphenols, melanins, antioxidant and antibacterial activity.

The morphological and cultural characteristics of mycelial colonies were described, with the greatest variability of morphological characters found for *X. polymorpha* strains, while strains of *X. longipes* and *X. hypoxylon* were shown to have significantly less variation in their pigmentation, texture and density. Despite the significant phenotypic variability among the strains, some of the morphological characteristics were distinguished for the species. Based on the radial growth rates, the studied strains of *Xylaria* species can be classified as slow-growing (growth rate less than 4 mm/day). The analysis of the mycelial growth of the studied strains of *Xylaria* species on nutrient media of different composition has not revealed a statistically significant difference.

There was no evidence of growth of *Xylaria* strains at elevated temperatures – none of the strains examined were capable of growing at 36.0 ± 0.1 °C. Depending on the species, the upper temperature limit above which the vegetative mycelium would no longer grow ranged from 36 ± 0.1 °C to 41 ± 0.1 °C.

Phylogenetic relationships inferred from the internal transcribed spacer (ITS), β -tubulin (TUB2) and RNA polymerase II (RPB2) regions sequences of 10 strains of 6 *Xylaria* species were investigated. The phylogenetic trees constructed by the Maximum Likelihood and Neighbor-joining methods were topologically identical except for branch-supporting values. Obtained trees indicated that strains of *Xylaria* species from the IBK Culture Collection merged in distinct clades, as the result species affiliation of cultures was confirmed.

Interspecific interactions of strains of *Xylaria* species with other fungi were evaluated in dual culture experiments. Antagonistic activity of the studied *Xylaria* strains against *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium polonicum* and *Trichoderma viride* was revealed. Generally, the inhibiting activity of *Xylaria* strains against the listed fungi comprised a deadlock, consisting in mutual inhibition at mycelial contact or at a distance, or replacement of colonies by partial or complete overgrowth. Most frequently, the ability to grow over *F. solani*, *M. plumbeus* and *C. albicans* colonies was noted. The interaction of some *Xylaria* species with *A. niger* and *P. polonicum* occurred at a distance, accompanied by formation of an inhibition zone between colonies. This is of particular interest, since the antagonism between fungi without mycelial contact may be the result of volatile or diffuse antifungal compounds production.

The calculation of quantitative indicators to assess the ability of the studied *Xylaria* strains to compete with test cultures (antagonism indexes) revealed higher values for *X. polymorpha* and *X. longipes* strains compared to other *Xylaria* species. The highest antagonism index among all the studied strains amounted 20 and was recorded for *X. polymorpha* IBK 2720. Considering high antagonistic activity against opportunistic pathogens, a significant potential of the studied *Xylaria* strains as biological control agents can be suggested.

The data on the dynamics of endo- and exopolysaccharide synthesis by *X. polymorpha* and *X. longipes* strains under deep cultivation conditions were obtained and compared. The endopolysaccharide content ranged from 32.30 ± 0.87 mg/g to 120.00 ± 0.67

mg/g for *X. polymorpha* strains and 38.75±0.77 mg/g to 98.33±1.55 mg/g for *X. longipes* strains, respectively. Strains of *X. longipes* also produced lower quantities of exopolysaccharides compared to *X. polymorpha* strains with amounts of 0.15±0.01 mg/ml to 0.41±0.01 mg/ml and from 0.47±0.02 mg/ml to 1.00±0.02 mg/ml, respectively. Comparison of the dynamics of biomass, endo- and exopolysaccharides accumulation by *X. polymorpha* and *X. longipes* cultures revealed differences in the synchrony of these processes for different strains.

The dynamics of phenolic compounds content and antioxidant activity in different extracts of biomass and culture liquid of *X. polymorpha* and *X. longipes* strains grown under deep cultivation conditions was studied. It was determined that the solvent had a significant effect on the amount of phenolic compounds extracted from the biomass of the studied strains of *Xylaria* species. Methanol was the most effective solvent for phenolic extraction compared to ethanol and ethyl acetate. The total content of phenolic compounds in the biomass of the studied strains ranged from 0.33±0.07 µg GAE/g in ethyl acetate extracts to 5.91±0.01 mg GAE/g in methanol extracts (the indicated values are the minimum and maximum among all the studied strains). In the culture liquid extracts, the content of phenolic compounds was significantly lower with minimum and maximum values of 0.07±0.01 mg GAE/ml and 0.45 mg GAE/ml, respectively.

Studying the parameters dynamically revealed that the peak of phenolic compounds accumulation differed depending on the strain. Similar dynamics were observed when investigating the antioxidant activity of biomass and culture liquid extracts of *X. polymorpha* and *X. longipes* strains. The highest value was recorded in the biomass of *X. longipes* IBK 2718, extracted with methanol after 9 days of deep cultivation (89.50±0.03%). The lowest antioxidant activity was observed in the culture liquid extract of *X. polymorpha* IBK 2720 (19.57±0.65%) on the 5th day of cultivation. The correlation between the content of phenolic compounds and antioxidant activity in both biomass and culture liquid was confirmed by the correlation analysis.

A comprehensive analysis of the pigment isolated from the biomass of *X. polymorpha* strains was conducted. Based on the analytical chemical tests and

spectroscopic studies the pigment was characterised as melanin. Melanin production by different *X. polymorpha* strains was investigated. The lowest productivity of the synthesis of this pigment was observed for the strain *X. polymorpha* IBK 2723 -5.17 ± 0.36 mg/l, the highest – for the strain *X. polymorpha* IBK 2737 with a value of 180.32 ± 4.16 mg/ml.

The antibacterial effect of biomass and culture liquid extracts of strains of the *Xylaria* species against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* was determined. The results indicated a higher antibacterial activity of culture liquid extracts compared to biomass extracts, with the recorded inhibition zones ranging from 10 to 14 mm and from 10 to 17 mm, respectively. In terms of the diameter of the inhibition zones and the number of strains of *Xylaria* species that showed antibacterial activity, the greatest antibacterial effect was observed against *P. aeruginosa*. The data obtained are of particular interest with regard to the fact that these test cultures are prioritized for the development of new effective and safe antimicrobial drugs according to the World Health Organization.

In summary, for each species (represented by certain strains), a passport has been developed. Strain passports include recommendations for the preservation of vegetative mycelium *in vitro* and contain data on culture origin, mycelial growth characteristics, morphology of colonies on different nutrient media, temperature regimes of cultivation and storage, critical growth temperatures, antagonistic properties towards other fungi, antibacterial and biosynthetic activity.

Keywords: Ascomycota, *Xylaria*, antagonism index, antibacterial activity, antioxidant activity, culture liquid, fungi, IBK, melanin, morphology, mycelial biomass, polyphenols, radial growth rate of mycelium, UV-spectrophotometry.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях, індексованих у базах даних Web of Science або Scopus

1. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2024). Isolation and characterisation of melanin pigment from mycelial cultures of *Xylaria polymorpha* (Ascomycota). *Ukrainian Botanical Journal*, 81(1), 8–15. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj81.01.008>

Внесок авторів: А.Р. Атаманчук – концептуалізація, методологія, експериментальні дослідження, формальний аналіз, написання оригінального рукопису; Н.А. Бісько – керівництво плануванням та виконанням дослідницької роботи, концептуалізація, редагування, фінальне затвердження рукопису.

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

2. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2023). Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant capacity in *Xylaria polymorpha* and *Xylaria longipes* strains. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology*, 94(3), 5–9. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.5-9>

Внесок авторів: А.Р. Атаманчук – концептуалізація, одержання експериментальних даних та їх аналіз, написання оригінального рукопису; Н.А. Бісько – концептуалізація, керівництво плануванням та виконанням дослідницької роботи, концептуалізація, методологія, редагування, фінальне затвердження рукопису.

3. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2023). Dynamics of the phenolic constituents and antioxidant activity in submerged cultures of *Xylaria* species. *Biotechnologia Acta*, 16(6), 82–87. <https://doi.org/10.15407/biotech16.06.082>

Внесок авторів: А.Р. Атаманчук – концептуалізація, методологія, одержання експериментальних даних та їх аналіз, написання оригінального рукопису; Н.А. Бісько – керівництво плануванням та виконанням дослідницької роботи, редагування, фінальне затвердження рукопису.

Статті у закордонних наукових фахових виданнях

1. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2022). Cultural and morphological characteristics of wood-inhabiting *Xylaria* species from Ukraine. *Plant & Fungal Research*, 5(2), 11–19. <https://doi.org/10.30546/2664-5297.2022.2.11>

Внесок авторів: А.Р. Атаманчук – концептуалізація, методологія, одержання експериментальних даних та їх аналіз, написання оригінального рукопису; Н.А. Бісько – керівництво плануванням та виконанням дослідницької роботи, редагування, фінальне затвердження рукопису.

Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. **Атаманчук, А.** (2021). Антагоністичні властивості *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. проти *Aspergillus niger* Tiegh., *Mucor racemosus* Fresen. та *Penicillium polonicum* K.W. Zaleski. «Актуальні проблеми ботаніки та екології»: матеріали міжнародної конференції молодих учених (с. 55). LAT & K.
2. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2022). Dynamics of biomass and exopolysaccharides production by *Xylaria polymorpha* in submerged culture. “Youth and modern problems of microbiology and virology”: materials of the IV young scientists conference (p.6). Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine.

Особистий внесок: одержання експериментальних даних та їх аналіз, підготовка тексту тез.

3. **Atamanchuk, A.** (2023). Antioxidant activity of biomass extracts of *Xylaria longipes* Nitschke strains under submerged conditions. *“Biotechnology of the 21st century”*: materials of the 17th International scientific and practical conference (pp. 32–34). Igor Sikorsky KPI.

4. **Atamanchuk A., & Bisko, N.** (2023). Growth of *Xylaria polymorpha* in submerged culture. on *“Modern approaches in the study of the plant kingdom”*: materials of the international scientific-practical conference dedicated to the *“Year of Heydar Aliyev”* (pp. 114–115). Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan Institute of Botany.

Особистий внесок: одержання експериментальних даних та їх аналіз, підготовка тексту тез.

5. **Атаманчук, А.** (2023). Культурально-морфологічна характеристика та антагоністичні властивості *Xylaria carpophila* (Pers.) Fr (Pers.) Fr. *«Актуальні проблеми ботаніки та екології»*: матеріали міжнародної конференції молодих учених (с. 47). Супрун В.П.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД СУЧАСНОГО СТАНУ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>XYLARIA</i> HILL EX SCHRANK.....	24
1.1. Таксономічні, філогенетичні та екологічні дослідження грибів роду <i>Xylaria</i>	25
1.2. Дослідження видів роду <i>Xylaria</i> у культурі.....	29
1.3. Біологічно активні сполуки видів роду <i>Xylaria</i> та їх функції.....	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	37
2.1. Об'єкти дослідження. Виділення чистих культур із природного матеріалу	37
2.2. Склад живильних середовищ, використаних у дослідженнях.....	39
2.3. Молекулярно-генетичні дослідження.....	40
2.3.1. Виділення ДНК та електрофорез в агарозному гелі.....	40
2.3.2. Ампліфікація фрагментів ДНК.....	40
2.3.3. Секвенування ДНК та філогенетичний аналіз.....	42
2.4. Умови культивування вегетативного міцелію на живильних середовищах	42
2.5. Морфолого-культуральні дослідження.....	43
2.5.1. Швидкість радіального росту міцеліальних колоній.....	43
2.5.2.Макроскопічні характеристики колоній.....	44
2.5.3. Вплив підвищених температур на життєздатність міцелію.....	44
2.6. Мікроскопічні дослідження.....	44
2.6.1. Світлова мікроскопія.....	44
2.6.2. Сканувальна електронна мікроскопія.....	45

2.7. Дослідження антагоністичної активності колоній у подвійній культурі	45
2.8. Методи екстракції біомаси та культуральної рідини	47
2.9. Біосинтетична активність культур	48
2.9.1. Аналіз вмісту ендopolісахаридів	48
2.9.2. Аналіз вмісту екзopolісахаридів	48
2.9.3. Аналіз вмісту меланінів	48
2.9.4. Аналіз вмісту фенольних сполук.....	50
2.9.5. Визначення антиоксидантної активності.....	50
2.9.6. Визначення антибактеріальної активності.....	51
2.10. Статистична обробка результатів.....	52
РОЗДІЛ 3. МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ	
ОСОБЛИВОСТІ ГРИБІВ РОДУ <i>XYLARIA</i>	53
3.1. Макроморфологічні особливості міцеліальних колоній	57
3.2. Мікроморфологічні особливості міцеліальних колоній.....	68
3.3. Швидкість радіального росту.	71
3.4. Вплив підвищених температур інкубації на життєздатність вегетативного міцелію	80
РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	86
РОЗДІЛ 5. АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ	
<i>XYLARIA</i> ЩОДО ІНШИХ ГРИБІВ.....	98
5.1. Взаємодія з <i>Fusarium solani</i>	105
5.2. Взаємодія з <i>Penicillium polonicum</i>	106
5.3. Взаємодія з <i>Aspergillus niger</i>	108
5.4. Взаємодія з <i>Mucor plumbeus</i>	109
5.5. Взаємодія з <i>Trichoderma viride</i>	110

5.6. Взаємодія з <i>Candida albicans</i>	112
5.7. Порівняння антагоністичної активності штамів <i>X. polymorpha</i> та <i>X. longipes</i>	114
РОЗДІЛ 6. БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУР.....	120
6.1. Динаміка накопичення біомаси, ендо- та екзополісахаридів при глибинному культивуванні.....	120
6.2. Динаміка вмісту фенолів та антиоксидантної активності у біомасі та культуральній рідині при глибинному культивуванні	126
6.3. Вплив розчинників для екстракції на вміст фенолів та антиоксидантну активність.....	135
6.4. Вміст меланінів у біомасі штамів <i>Xylaria polymorpha</i>	139
6.5. Антибактеріальна активність екстрактів біомаси та культуральної рідини штамів видів роду <i>Xylaria</i>	147
ВИСНОВКИ	154
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	158
ДОДАТОК А. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ.....	186
ДОДАТОК Б. ОСОБЛИВОСТІ ТА РЕКОМЕНДАЦІЇ ПО ЗБЕРЕЖЕННЮ ВЕГЕТАТИВНОГО МІЦЕЛЮ ШТАМІВ ВИДІВ РОДУ <i>XYLARIA IN VITRO</i>	188
ДОДАТОК В. НУКЛЕОТИДНІ ПОСЛІДОВНОСТІ ITS ШТАМІВ ВИДІВ РОДУ <i>XYLARIA</i> З КОЛЕКЦІЇ КУЛЬТУР ШАПИНКОВИХ ГРИБІВ (ІВК), ДЕПОНОВАНІ ДО БАЗИ ДАНИХ GENBANK	209

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГПД	–	глюкозо-пептон-дріжджове рідке середовище
ГПДА	–	глюкозо-пептон-дріжджовий агар
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДМСО	–	диметилсульфоксид
МЕА	–	мальц-екстракт агар
МХА	–	Мюллера-Хінтона агар
МХБ	–	Мюллера-Хінтона бульйон
СА	–	сусло пивне агаризоване
СЕМ	–	сканувальна електронна мікроскопія
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
L-ДОФА	–	L-діоксифенілаланін
ITS	–	internal transcribed spacer (внутрішній транскрибований спейсер)
NCBI	–	National Center for Biotechnology Information (Національний центр біотехнологічної інформації)
RPB2	–	ген, що кодує другу субодиницю РНК-полімерази II
TBE	–	трис-боратний буфер
TUB2	–	ген, що кодує β -тубулін

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. *Xylaria* Hill ex Schrank є найчисельнішим родом у родині Xylariaceae (Xylariales, Sordariomycetes, Ascomycota), який налічує близько 300 видів (Kirk et al., 2008). Це широко розповсюджений поліморфний рід піреноміцетів, більшість представників якого є сапротрофами та ендofітами (Rogers et al., 2005; Thomas et al., 2016; Cañón et al., 2019). Дослідження останніх десятиліть охоплюють систематику, філогенетичну реконструкцію, екологічне значення та взаємозв'язок між стадіями телеоморфи та анаморфи грибів родини Xylariaceae. Значну кількість напрацювань присвячено дослідженню біологічно активних речовин, виділених із плодових тіл і вегетативного міцелію окремих видів роду *Xylaria*. Виявлено, що сполуки, отримані з міцелію та плодових тіл цих грибів, а також культуральної рідини за різних умов культивування, проявляють ряд важливих медико-біологічних властивостей. Проте до початку наших досліджень відомості щодо біологічних особливостей вегетативного міцелію штамів видів роду *Xylaria*, отриманих із плодових тіл, зібраних на території України, були відсутні.

Представники роду *Xylaria* демонструють значну варіабельність у морфології, що ускладнює їх ідентифікацію та диференціацію близькоспоріднених видів. Молекулярні методи дослідження, зокрема послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера та генів, що кодують β -тубулін, α -актин, другу субодиницю ДНК-залежної РНК-полімерази тощо, полегшують видову диференціацію роду *Xylaria* (Hsieh et al., 2010). Проте іноді відомості про послідовності ДНК не можуть бути використані у таксономії, наприклад, коли ідентичність типових матеріалів або послідовностей, депонованих до бази даних є сумнівною. Тому точність ідентифікації забезпечується у комбінації молекулярних даних із детальним описом морфологічних ознак у природі та культурі. Враховуючи, що представники роду *Xylaria* часто залишаються стерильними в культурі, тобто за відсутності телеоморфних ознак, такі характеристики колоній як

швидкість росту, колір, морфологія поверхні колонії та інші набувають особливого значення для ідентифікації та підтримання стабільної культури.

Окрім того, існують літературні відомості, згідно з якими більшість морфологічних ознак і даних щодо молекулярної філогенії родини Xylariaceae, заснованих на аналізах послідовностей рибосомальних генів ДНК, узгоджуються з розподілом характерних вторинних метаболітів (Stadler & Hellwig, 2005; Stadler, 2011). Серед метаболітів, синтезованих представниками роду *Xylaria*, були виявлені різні класи сполук, такі як терпени та терпеноїди, стероїди, полісахариди, феноли тощо. Багато з цих сполук проявляють антибактеріальну, антифунгальну, цитотоксичну, антивірусну, антихолінестеразну та інші біологічні активності (Linh et al., 2014; Song et al., 2014; Elias et al., 2018; Kim et al., 2018). З огляду на це, інтерес до представників роду *Xylaria* як продуцентів біологічно активних речовин для фармакологічних цілей зростає.

Відомо, що на ріст і метаболічну активність грибів впливають такі фактори як рН, температура, концентрація іонів металів, джерела вуглецю та азоту, тривалість культивування тощо. Проте в літературі наведено порівняно мало відомостей щодо оптимізації умов культивування видів роду *Xylaria*. Здебільшого дослідження спрямовані на визначення структури, характеристик та медико-біологічних властивостей сполук, виділених з представників роду. Варто також зазначити, що переважна кількість штамів-продуцентів були визначені на рівні роду. До того ж для дослідження біології видів роду *Xylaria* переважно використовували штами, що були виділені зі зразків із країн Південно-Східної Азії, Південної та Північної Америки. До початку нашого дослідження були відсутні відомості щодо продукції біологічно активних речовин штамами видів роду *Xylaria* українського походження. Отже, вивчення впливу ряду чинників на біологічні властивості штамів видів роду *Xylaria*, що зберігаються у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (ІВК) та її поповнення новими штамами є доцільним.

Зважаючи на проблематичність таксономії роду *Xylaria*, а також на широкий спектр біологічної активності його представників та їх потенційне використання у

біотехнологічних цілях, дослідження біології нових штамів видів роду *Xylaria* у культурі є актуальним.

Мета роботи: дослідити біологічні особливості штамів видів роду *Xylaria* за різних умов культивування.

Для досягнення мети було визначено такі **завдання:**

1. Виділити нові штамів видів роду *Xylaria* із природного матеріалу з різних географічних зон України і поповнити ними Колекцію культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (ІВК).

2. Встановити особливості росту вегетативного міцелію виділених штамів, його морфологічні характеристики на живильних середовищах різного складу.

3. Із використанням методів молекулярної біології з'ясувати генетичну різноманітність штамів, виділених у культуру та підтвердити їхню видову приналежність.

4. Оцінити вплив підвищених температур на життєздатність міцелію штамів видів роду *Xylaria*.

5. Оцінити антагоністичну здатність штамів видів роду *Xylaria* щодо інших грибів.

6. Дослідити динаміку росту та синтезу ендо- та екзополісахаридів окремими штамми в умовах глибинного культивування.

7. Дослідити динаміку вмісту фенольних сполук у біомасі та культуральній рідині окремих штамів видів роду *Xylaria*.

8. Дослідити динаміку антиоксидантної активності біомаси та культуральної рідини окремих штамів видів роду *Xylaria*.

9. Встановити вміст і продуктивність синтезу меланінів окремими штамми видів роду *Xylaria*.

10. Оцінити антибактеріальну здатність біомаси та культуральної рідини окремих штамів видів роду *Xylaria*.

Об'єкт дослідження: чисті культури 28 штамів 7 видів роду *Xylaria*.

Предмет дослідження: біологічні особливості штамів видів роду *Xylaria* у культурі.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених завдань було використано загальновідомі мікологічні, мікробіологічні, фізіолого-біохімічні, молекулярно-генетичні, хіміко-аналітичні методи роботи, світлову та сканувальну електронну мікроскопію, спектрофотометрію, статистичні методи обробки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше проведено дослідження морфолого-культуральних характеристик 28 штамів 7 видів роду *Xylaria* з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. У результаті експериментальних досліджень на живильних середовищах різного складу з'ясовано комплекс культурально-морфологічних ознак вегетативного міцелію, що мають таксономічне значення. Вперше досліджено антагоністичну здатність усіх штамів видів роду *Xylaria* з Колекції культур ІВК щодо інших грибів, у тому числі опортуністичних патогенів та мікофілів. Уперше встановлено вміст та продуктивність синтезу пігменту меланіну для 10 штамів *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. та охарактеризовано його фізико-хімічні властивості. Вперше отримано відомості щодо динаміки синтезу ендо- та екзополісахаридів у вегетативному міцелії 4 штамів 2 видів *Xylaria*. Вперше встановлено динаміку вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності екстрактів біомаси та культуральної рідини представників роду *Xylaria*. Визначено вплив розчинників для екстракції на зазначені показники.

Проведено дослідження антимікробних властивостей екстрактів біомаси та культуральної рідини представників роду *Xylaria*, в результаті яких виявлено антибактеріальну активність екстрактів біомаси та культуральної рідини 10 штамів

5 видів роду *Xylaria* проти двох грам-позитивних та трьох грам-негативних мікроорганізмів.

Практичне значення отриманих результатів. Поповнено Колекцію культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України 26 штамами 7 видів роду *Xylaria*, які були виділені у чисті культури зі стром, зібраних на території України. За допомогою молекулярно-генетичних методів підтверджено видову приналежність 10 штамів 6 видів роду *Xylaria* з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) та депоновано відповідні нуклеотидні послідовності до міжнародної бази даних GenBank. Детально описано морфолого-культуральні характеристики вегетативного міцелію 7 видів роду *Xylaria*, які доповнюють критерії оцінки таксономічної приналежності штамів при зберіганні *in vitro*. Надано рекомендації щодо зберігання вегетативного міцелію культур видів *Xylaria in vitro*, вказано умови культивування та біологічні особливості штамів.

Була виявлена антибактеріальна активність екстрактів біомаси та культуральної рідини 10 штамів 5 видів роду *Xylaria* проти мікроорганізмів з критичної групи пріоритетних бактеріальних патогенів, для яких, згідно з ВООЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я), є актуальним пошук нових засобів антимікробної дії. Отримані результати щодо біосинтетичної активності досліджених штамів видів роду *Xylaria* можуть слугувати підґрунтям для відбору штамів-продуцентів та подальшого їх використання у біотехнології.

Особистий внесок. Робота є самостійним дослідженням дисертантки, якою було проаналізовано наукову літературу за темою дисертаційного дослідження, виконано основний обсяг експериментальної роботи, узагальнено, інтерпретовано та статистично оброблено одержані дані експериментів.

Планування дослідження та обговорення отриманих даних було проведено за участі наукового керівника д.б.н., проф. Н.А. Бісько, результати висвітлено у спільних публікаціях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відділі мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України відповідно до планів НДР за темою № 468 «Біологічна активність штамів Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ІВК» (№ державної реєстрації – 0120U101111).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені та обговорені на засіданнях відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Міжнародній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Київ, 2021; Івано-Франківськ, 2023), науково-практичній конференції «Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології» (Київ, 2022), Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2023) та Міжнародній науково-практичній конференції «Modern Approaches in the Study of the Plant Kingdom» (Баку, 2023).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 4 статті, з них 3 – у періодичних фахових виданнях України, 1 – у зарубіжному фаховому виданні, а також 5 тез доповідей у наукових збірниках вищезазначених конференцій.

Обсяг і структура роботи. Дисертація складається зі вступу та 6 розділів, висновків, списку використаних джерел, який містить 244 посилання (з яких 23 кирилицею, 221 латиницею), трьох додатків. Загальний обсяг роботи складає 209 сторінок. Основна частина дисертації викладена на 140 сторінках, містить 56 рисунків та 13 таблиць.

Авторка висловлює щирю вдячність науковому керівнику д-ру біологічних наук Н.А. Бісько, всім співробітникам відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, а також співробітникам відділу фітогормонології к.б.н. К.О. Романенко, В.В. Чуб, відділу мембранології та фітохімії к.б.н. О.В. Поліщуку, к.б.н. Н.Ф. Михайленко, відділу фікології, ліхенології та бріології д.б.н. Т.І. Михайлюк та к.б.н. С.О. Нипорко за допомогу у проведенні досліджень, зборі матеріалів та інших аспектах при виконанні цієї дисертаційної роботи. Подяка

співробітникам відділу оптики і спектроскопії Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України проф., д. ф.-м.н. В.В. Джаган та докт. філ. Н.В. Мазуру за допомогу у проведенні спектроскопічних досліджень. Велика вдячність Збройним Силам України за можливість жити та працювати в умовах воєнного стану.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД СУЧАСНОГО СТАНУ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *XYLARIA* HILL EX SCHRANK

Останніми роками розширилися можливості використання культур грибів для отримання різних біологічно активних речовин завдяки активним дослідженням у галузі експериментальної мікології. Серед представників відділу Ascomycota значна увага дослідників була приділена грибам порядку Xylariales, які є космополітами та порівняно легко виділяються з природного матеріалу в чисту культуру, характеризуються швидким ростом міцелію, не потребують складних живильних середовищ для культивування (Rogers, 1979a; Chen et al., 2013).

Згідно з даними, наведеними у 2011 році щодо стану досліджень окремих родів підродин Нурохулоїдеае та Хуларіоїдеае відносно усієї родини Хуларіацеае, рід *Xylaria* є чи не найбільш вивченим. Проте більшість даних стосовно представників цього роду стосуються їх морфології та хемотаксономії, в той час як молекулярно-генетичні та культурально-морфологічні аспекти менш досліджені (Stadler, 2011).

Багато видів роду *Xylaria* вважаються комплексними, адже за рахунок космополітизму та наявності багатьох описів телеоморфних та анаморфних ознак, наведених незалежними дослідниками, дані щодо них часто є суперечливими. Сучасні молекулярно-генетичні методи допомагають у вирішенні питань щодо таксономії цього роду, оскільки інформація про нуклеотидні послідовності надає можливість пов'язати анаморфні та телеоморфні таксони. Культурально-морфологічні ознаки також набувають особливого значення для таксономії цього роду, особливо тих представників, які є ендofітами.

Втім, оскільки даний рід є досить великим і надзвичайно різноманітним, у його складі є чимало сумнівних синонімічних назв, які потребують перевірки, і

навіть статус типового виду був визначений відносно нещодавно (Stadler et al., 2014).

1.1. Таксономічні, філогенетичні та екологічні дослідження грибів роду *Xylaria*

Традиційна таксономія грибів спиралася переважно на морфологічні ознаки, проте останніми десятиріччями методи молекулярної біології стали основою для сучасної класифікації та почали широко використовуватись для опису нових таксонів або для вивчення еволюційних відносин між різними групами грибів.

Типовий вид сучасного роду *Xylaria* був описаний Карлом Ліннеєм як *Clavaria hypoxylon* L. (Linné, 1753). Персон та Фріз наводили у своїх роботах родову назву *Sphaeria* (Persoon, 1801; Fries, 1821). Фріз був першим дослідником, який спробував систематизувати ці гриби, виокремивши 4 групи в залежності від наявності чи відсутності перитеціїв на верхівках стром та наявності чи відсутності волосків при основі стром (Fries, 1851). Появу сучасної назви роду пов'язують із роботою братів Тюлянь, у якій вони використали термін «*xylariei*» (Tulasne et al., 1861). Разом з видатним мікологом Нітшке вони зробили значний і вагомий внесок у таксономію роду *Xylaria* на ранніх етапах розвитку мікології (Nitschke, 1867). Ці дослідники, а також багато інших відомих мікологів, у тому числі Саккардо, Елліс і Еверхарт застосовували систему, запропоновану Фрізом (Saccardo et al., 1882; Ellis & Everhart, 1892).

Згідно з сучасною класифікацією, рід *Xylaria* належить до відділу Ascomycota, класу Sordariomycetes, підкласу Xylariomycetidae, порядку Xylariales, родини Xylariaceae. У попередніх класифікаціях ці гриби відносили до класу Pyrenomycetes на основі макро- та мікроморфологічних характеристик їхніх плодових тіл. Для представників роду *Xylaria* характерні темнозабарвлені поодинокі або згруповані строми різноманітної форми: від тонких нитчастих, циліндричних до кулясто-бульбовидних. Перитеції умбілікатні або папілятні, з численними парафізами та впорядкованим розташуванням асків у гіменії. Аски циліндричні або субциліндричні з апікальним амілоїдним кільцем (J+). Аскоспори від світло- до

темно-коричневого кольору, асиметричні, зазвичай одноклітинні або нерівномірно двоклітинні через наявність гіалінового клітинного придатка, з короткою або довгою та різної форми зародковою щілиною (Rogers & Samuels, 1986).

Найбільш численними, як за кількістю таксонів, так і за кількістю особин, представники роду є в тропічному поясі, а саме у тропічних лісах Америки та Азії. Це, можливо, спричинено значним видовим різноманіттям дерев і чагарників порівняно з лісами помірної поясу (Rogers, 2000), що й могло створити умови для видоутворення спеціалізованих сапротрофів, факультативних паразитів та ендофітів, якими є представники роду *Xylaria*.

Сапротрофні види цього роду зростають на деревині, опалих листках, плодах та насінні. Деякі з представників роду є специфічними до субстрату, як наприклад, *Xylaria magnoliae* J.D. Rogers на плодах *Magnolia* spp., *X. xanthinovelutina* Mont. на стручках представників родини *Fabaceae*, *X. carpophila* (Pers.) Fr. на плодах *Fagus* spp., *X. liquidambaris* J.D. Rogers, Y.M. Ju & F. San Martín на плодах *Liquidambar* spp., *X. axifera* Mont. на опалих черешках представників родини *Araliaceae* (Rogers, 1979b; Laessøe & Lodge, 1994; Rogers et al., 2002; Ju et al., 2018; Perera, 2020).

Однак деякі види не є приуроченими до специфічного субстрату, наприклад, *X. clusiae* K.F. Rodrigues, *X. duranii* San Martín & Vanoye та *X. heloidea* Penz. & Sacc., які трапляються як на опалих плодах, так і на листках (Ju et al., 2018) Велика частина представників є ендофітами, які колонізують живі тканини широкого кола рослинних господарів, включаючи хвойні, покритонасінні, папоротеподібні, мохи (Petrini & Petrini, 1985; Brunner & Petrini, 1992; Davis et al., 2003; Okane et al., 2012). Близько двох десятків представників роду *Xylaria* асоційовані з гніздами термітів (Rogers et al., 2005; Ju & Hsieh, 2007; Hsieh et al., 2010).

На території України види роду *Xylaria* трапляються повсюдно; зокрема, відомі знахідки *X. arbuscula* Sacc., *X. bulbosa* (Pers.) Berk. & Broome, *X. carpophila* (Pers.) Fr., *X. corniformis* var. *obovata* Sacc., *X. digitata* (L.) Grev., *X. hypoxylon* (L.) Grev., *X. filiformis* (Alb. & Schwein.) Fr., *X. longipes* Nitschke, *X. oxyacanthae* Tul. & C.

Tul., *X. polymorpha* (Pers.) Grev. (Смицкая и др., 1986; Minter & Dudka, 1996; Дудка, Гелюта та ін., 2009; Дудка, Придюк, та ін., 2009; Акулов & Гуков, 2015; Гуков, 2017).

За останні десятиліття види роду *Xylaria* були об'єктами молекулярно-філогенетичних досліджень грибів родини *Xylariaceae*. Більшість із цих досліджень були здійснені виключно або переважно з використанням послідовностей внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної рДНК (ITS) (Lee et al., 2000; Okane & Nakagiri, 2007; Peláez et al., 2008; Stadler et al., 2020). Деякі дослідники застосовували комплексний аналіз на основі ITS та ядерних рибосомальних та/або білок-кодуєчих локусів ДНК (Smith et al., 2003; Tang et al., 2009; Visser et al., 2009; Okane et al., 2012). Аналіз молекулярно-філогенетичних реконструкцій свідчить про те, що види роду *Xylaria* утворюють великий комплекс парафілетичного походження. На дендрограмах види роду *Xylaria* розміщувались у декількох кладах, зазвичай пов'язаних з іншими родами, наприклад *Kretzschmaria*, *Stilbohypoxylon*, *Rosellinia*, *Nemania* (Peláez et al., 2008).

Віссер зі співавторами (2009) здійснили аналіз нуклеотидних послідовностей великої субодиниці рибосомальної РНК (LSU) 16 анаморфних представників роду *Xylaria*, зібраних у Південній Африці. Результати виявили, що на філогенетичному дереві таксони *Xylaria* були змішані з трьома видами трьох різних родів підродини *Xylarioideae*, а саме *Astrocystis cocoes* (Henn.) Læssøe & Spooner, *Nemania maritima* Ju & J.D. Rogers і *Rosellinia corticium* (Schwein.) Sacc., тобто сформували парафілетичну групу (Visser et al., 2009). Згідно з іншими дослідженнями, представники підродини *Xylarioideae* групуються на філогенетичних реконструкціях у чотирьох основних кладах, види роду *Xylaria* розподілені серед трьох з них (Hsieh et al., 2010). Одна з цих клад включає виключно представників роду, які асоційовані з термітниками (TE), інша клада містить *X. hypoxylon* і близькоспоріднені види (HY), третя клада містить *X. polymorpha* і близькоспоріднені види (PO) (рис. 1.1.1).

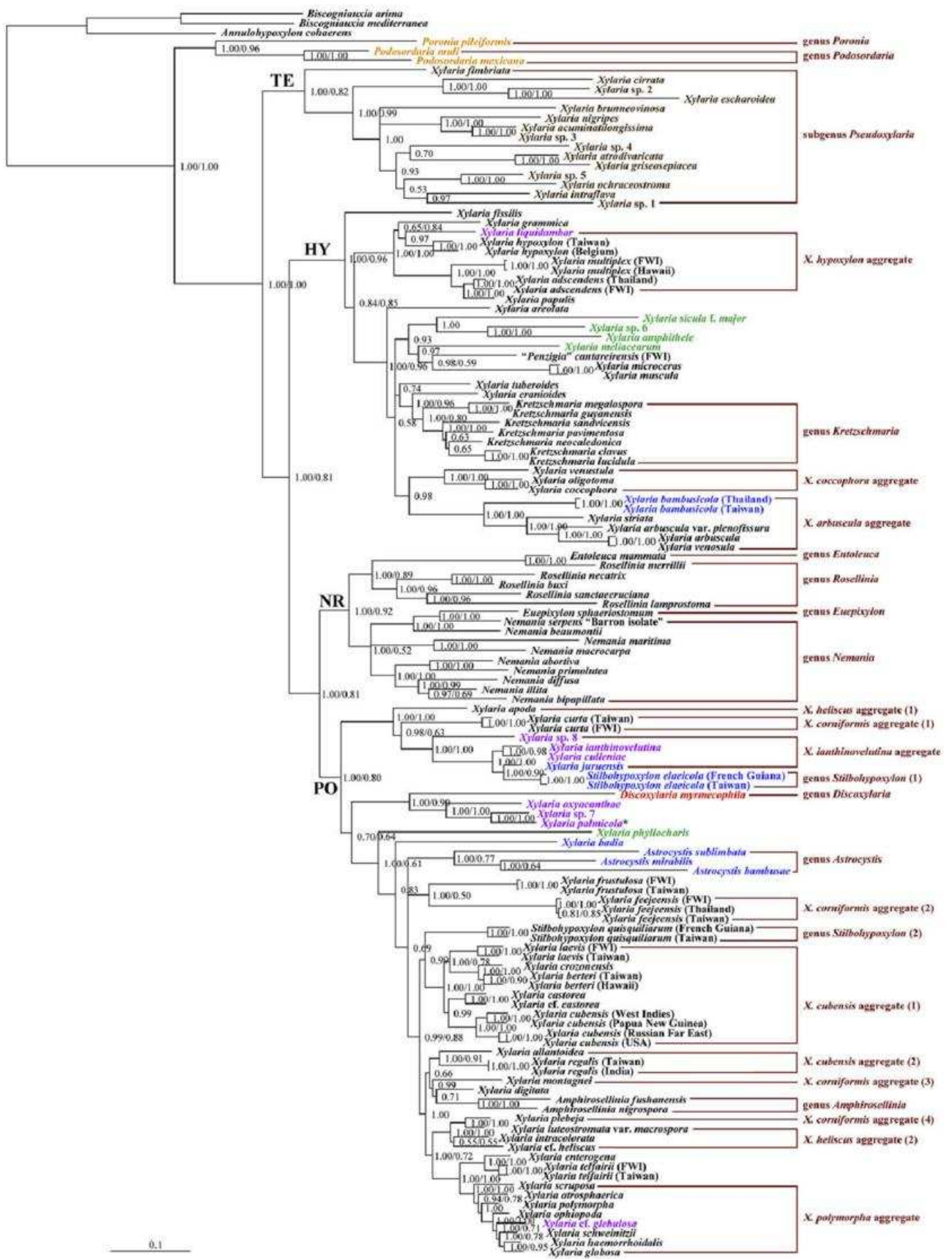


Рис.1.1.1. Філогенетичне дерево, згенероване за допомогою Байєсівського аналізу з набору даних щодо нуклеотидних послідовностей генів, що кодують β-тубулін, α-

актин та другу субодиницю РНК-полімерази II (RPB2). Кольорами автори зазначили приуроченість грибів до субстрату: чорним кольором позначена деревина, коричневим – термітники, зеленим – опале листя, рожевим – плоди та насіння (Hsieh et al., 2010).

Такий розподіл представників роду *Xylaria* був підтверджений іншими дослідниками із застосуванням мультилокусного аналізу на основі ITS, LSU, а також генів, що кодують β -тубулін, α -актин та RPB2. Дослідження охопило 1933 ізолятів, що аналізувались в контексті раніше опублікованих даних про нуклеотидні послідовності описаних видів і додаткового вибору таксонів типових зразків із колекцій культур. Результати продемонстрували аналогічні описаним раніше (Hsieh et al., 2010), тобто виділяються три основні клади, серед яких розміщуються види роду *Xylaria* (U'Ren et al., 2016).

Отже, результати різних філогенетичних досліджень свідчать, що рід *Xylaria* не є монофілетичним, втім таксони зазвичай об'єднуються в один рід *Xylaria sensu lato*. У цьому контексті та за відсутності монографічних зведень із ключами для визначення видів, ідентифікація представників роду *Xylaria* є ускладненою.

1.2. Дослідження видів роду *Xylaria* у культурі

Враховуючи складнощі ідентифікації, дослідження культурально-морфологічних характеристик грибів роду *Xylaria* набули вагомого таксономічного значення (Fournier et al., 2011; Hashemi et al., 2015; Srihanant et al., 2015; Wangsawat et al., 2021). Деякі дослідники зазначають, що такі характеристики, як швидкість росту міцеліальних колоній та їх морфологія, є відносно стабільними діагностичними ознаками (Petrini & Petrini, 1985).

Хоча достовірна ідентифікація передбачає наявність репродуктивних структур, гриби, що залишаються стерильними у культурі часто групують у морфотипи на основі культуральних характеристик (Schulthess & Faeth, 1998; Chen et al., 2013). Достовірність таких морфотипів як таксономічних груп була підтверджена за допомогою молекулярно-генетичних досліджень (Lacarp et al.,

2003). На основі культурально-морфологічних ознак були розроблені синоптичні ключі для представників роду *Xylaria*, наприклад, ключ до 23 видів, чисті культури яких були ізольовані з природного матеріалу, зібраного на території США та Канади (Callan & Rogers, 1993). Значна увага цих дослідників була приділена морфологічним особливостям міцеліальних колоній та описам стадії анаморфи в культурі.

Окрім того, активним напрямком дослідження представників роду *Xylaria* у культурі є вивчення впливу умов культивування на особливості росту міцелію. Так, було проведено ряд експериментів, спрямованих на оптимізацію умов культивування штамів видів цього роду. Наприклад, у результаті дослідження штаму *X. hypoxylon* на п'яти агаризованих живильних середовищах різного складу, було з'ясовано оптимальні температуру (30 °C), рН (6) та склад середовища для культивування цього штаму – картопляно-декстрозний агар (Ahmed & Jahan, 2018). Рамеш зі співавторами (2014) досліджували вплив різних джерел вуглецю та азоту на продукцію біомаси при глибинному культивуванні штаму *Xylaria* sp. R006. У результаті найвище значення біомаси було отримано при використанні глюкози та дріжджового екстракту, оптимальною для культивування виявилась температура 25 °C, а значення рН – 5,5 (Ramesh et al., 2014). Інша група дослідників окрім впливу різних діапазонів рН та температури на продукцію біомаси грибом *X. papulis* Lloyd, порівнювала різні режими освітлення та способи культивування. Було встановлено, що умови освітлення не мали значного впливу на кількість біомаси, втім виявилось, що середня суха маса міцелію при стаціонарному культивуванні була вищою, ніж при глибинному культивуванні (Lopez et al., 2022). Також автори зазначили, що оптимальним для росту міцелію був діапазон рН 5,5–6,5 та температур – 23–28 °C.

Варто зазначити, що подібні дослідження поодинокі та займають невелику частку усього масиву літературних даних щодо представників роду *Xylaria*. Найбільше інформації у літературних джерелах наводиться стосовно синтезу штамми-продуцентами сполук із різним спектром біологічної активності. Цей напрямок досліджень є актуальним та стрімко розвивається.

1.3. Біологічно активні сполуки видів роду *Xylaria* та їх функції

Більшість біологічно активних речовин, виділених з представників роду *Xylaria*, належать до вторинних метаболітів – проміжних сполук метаболізму, які не є необхідними для росту та розвитку, але впливають на конкурентоспроможність організмів і їх здатність до виживання у певних умовах.

Згідно з літературними даними станом на 2005 рік було відомо 44 сполуки, виділені з представників роду *Xylaria*, що складало близько 18% усіх відомих вторинних метаболітів грибів родини Xylariaceae (Stadler & Hellwig, 2005). Через 10 років у оглядовій роботі, присвяченій вторинним метаболітам грибів роду *Xylaria*, наводять уже 188 сполук, виділених із представників цього роду (Song et al., 2014).

Така тенденція до поглиблення вивчення метаболізму грибів, а саме виділення, дослідження шляхів синтезу та структури вторинних метаболітів, пов'язана у тому числі з їх біологічною активністю та потенціалом у застосуванні у фармакології та біомедицині. Відомо, що вторинні метаболіти видів роду *Xylaria* проявляють цитотоксичну, антиоксидантну, антибактеріальну, антифунгальну, антивірусну активність (Boonphong et al., 2001; Pittayakhajonwut et al., 2005; Hu et al., 2008; Pongcharoen et al., 2008; Linh et al., 2014; Adnan et al., 2018; Elias et al., 2018). Нижче нами наведено основні класи речовин та сполуки, що були виділені з грибів роду *Xylaria*.

Терпени та терпеноїди

Терпени належать до класу вторинних метаболітів, які є похідними ізопрену. Терпени містять кратну кількість ізопренових фрагментів незалежно від того, чи наявні у їх молекулі інші елементи, тоді як терпеноїди є модифікованим класом терпенів із різною кількістю атомів карбону та функціональними групами (Perveen & Al-Taweel, 2018). Завдяки хімічній різноманітності терпени та терпеноїди широко використовуються у промисловості та медицині (Jiang et al., 2016). Більшість терпенів та терпеноїдів характеризуються протипухлинною, протизапальною, антимікробною та іншими властивостями (Gallucci et al., 2009; Masyita et al., 2022).

Гриби, у тому числі представники роду *Xylaria*, синтезують велику кількість різноманітних сполук цього класу, які різняться за своїми структурою та властивостями.

Наприклад, у результаті досліджень культур *X. carpophila* було виділено п'ять нових сесквітерпенів, названих ксилкарпінами А–Е (рис. 1.3.1).

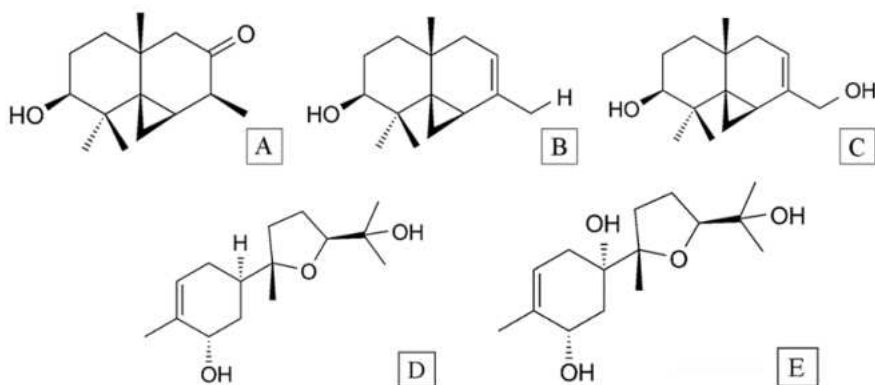


Рис. 1.3.1. Сесквітерпени, ізольовані з культур *X. carpophila*: ксилкарпіни А–Е (літерами позначені відповідні хімічні формули) (Yin et al., 2011).

Три дитерпенових глікозиди було отримано з метанольних екстрактів плодових тіл *X. polymorpha*, структуру яких було визначено за допомогою спектроскопічного та монокристалічного рентгеноструктурного аналізу (Shiono et al., 2009). Ці сполуки продемонстрували цитотоксичність проти ракових клітинних ліній людини з показниками IC₅₀ в діапазоні від 71 до 607 μM . Подальші дослідження цитотоксичності цих сполук проти клітин HL60 показали, що вони індукують апоптоз разом з типовою фрагментацією ДНК.

Інші відомі сполуки цього класу були виділені з представників, ідентифікованих лише до роду. Це, наприклад, ксилопімарен та сферопсидин (рис. 1.3.2), отримані зі штаму *Xylaria* sp. ВСС 4297 з колекції культур BIOTEC (Isaka et al., 2011). Ксилопімарен проявив цитотоксичність проти клітинних ліній KB, MCF-7, NCI-H187 з показниками IC₅₀ 1, 13 та 6 μM , відповідно.

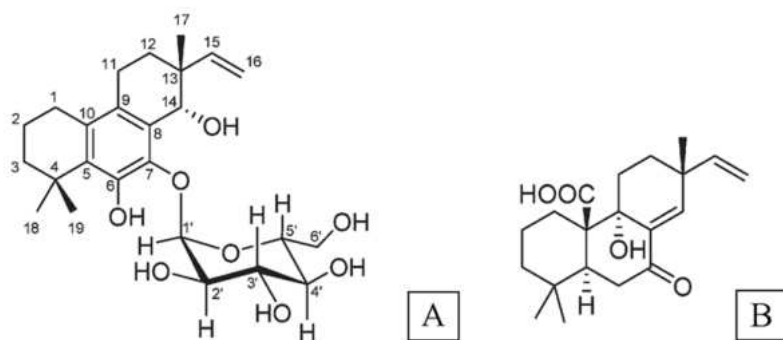


Рис. 1.3.2. Дитерпенові глікозиди, виділені з *Xylaria* sp. BCC 4297: ксилопімарен (А) та сферопсидин (В) (Isaka et al., 2011).

Нітрогенвмісні органічні сполуки

Більше половини нітрогенвмісних сполук, виділених з представників роду *Xylaria*, складають цитохалазини (Song et al., 2014). Ці сполуки відомі здатністю зв'язуватись із мікрофіламентами, блокуючи подальшу полімеризацію актину і пригнічуючи рухливість клітин, фагоцитоз та опосередкований мікрофіламентами транспорт органел і везикул, а також утворення ламелоподій і мікрошипів (Goodman & Zimmer, 2007). Основними відомими продуцентами цитохалазинів в межах роду *Xylaria* наразі є *X. hypoxylon* та *X. obovata*.

Зображені на рисунку 1.3.3 18-Дезокси-19,20-епоксицитохалазин Q, деацетил 19,20-епоксицитохалазин С, 19,20-епоксицитохалазин С та цитохалазини Q були виділені з міцелію *X. obovata* (Dagne et al., 1994).

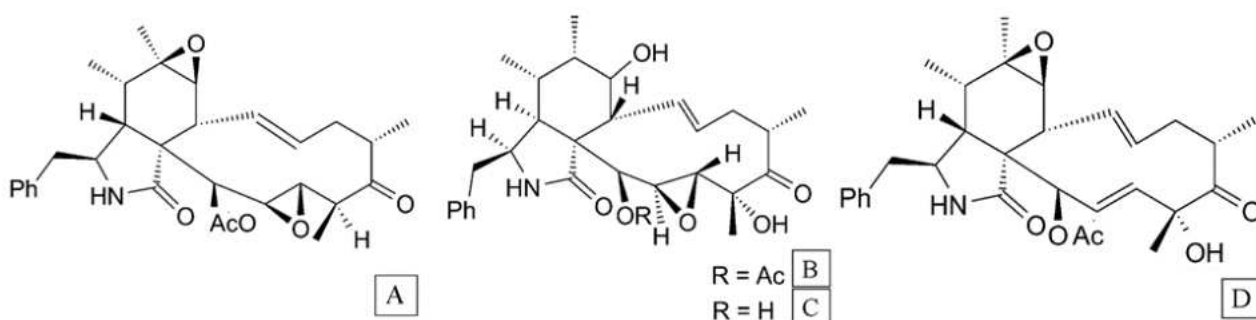


Рис.1.3.3. Цитохалазини, виділені з міцелію *X. obovata*: 18-Дезокси-19,20-епоксицитохалазин Q (А), деацетил 19,20-епоксицитохалазин С (В), 19,20-епоксицитохалазин С (С) та цитохалазини Q (D) (Dagne et al., 1994).

Інші дві сполуки – 19,20-епоксицитохалазин Q та деацетил 19,20-епоксицитохалазин Q (рис. 1.3.4) були виділені з культуральної рідини у дослідях зі штамом *X. obovata* ADA-288 (Abate et al., 1997). Останні дві сполуки, а також згадані вище 18-дезоксид-19,20-епоксицитохалазин Q та 19,20-епоксицитохалазин С були ізольовані також іншими авторами з культуральної рідини *X. hypoxylon* (Espada et al., 1997).

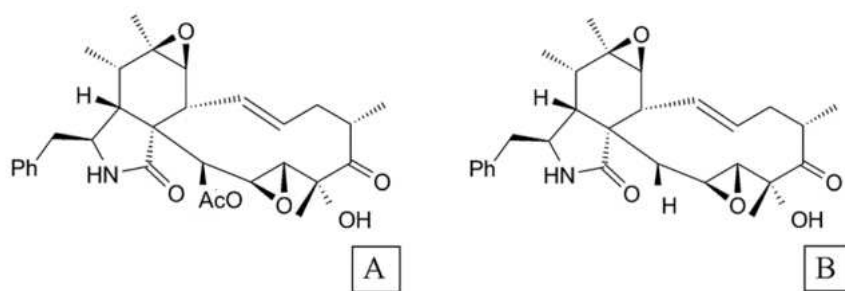


Рис. 1.3.4. Цитохалазини, виділені з культуральної рідини *X. obovata*: 19,20-епоксицитохалазин Q (A) та деацетил 19,20-епоксицитохалазин Q (B) (Abate et al., 1997).

Фенольні сполуки та їх похідні

Тирозол (рис. 1.3.5 A) був ізольований із культуральної рідини *X. longipes* (Schneider et al., 1996). Ксиларінол А та В (рис. 1.3.5 B, C) були виділені з метанольних екстрактів плодових тіл *X. polymorpha* (Jang et al., 2009). Глобсцинова кислота та глобсцин (рис. 1.3.5 D, E) були отримані з культуральної рідини *X. globosa* (Adeboya et al., 1995). Метил-3-4-метоксифеноксипропеноат був ізольований з уже згаданого вище штаму *X. obovata* ADA-288 (Abate et al., 1997).

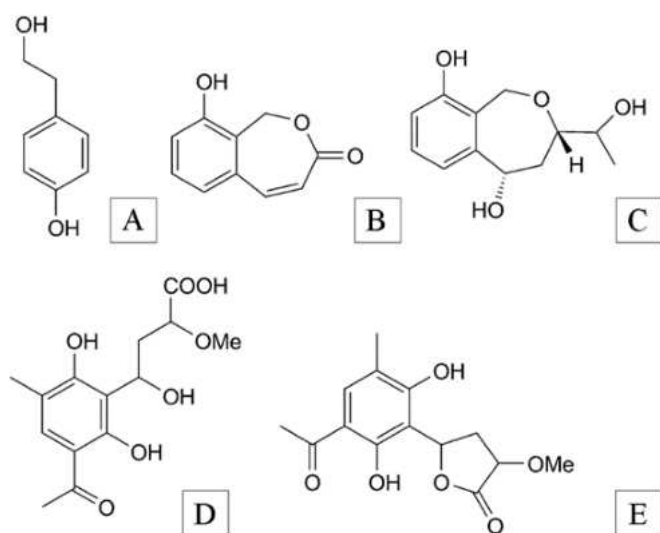


Рис. 1.3.5. Похідні фенольних сполук, ізольовані з представників роду *Xylaria*: тирозол з *X. longipes* (A), ксиларінол А (B) та ксиларінол В (C) з *X. polymorpha*, глобсцинова кислота (D) та глобсцин (E) з *X. globosa* (посилання на літературні джерела наведені у тексті).

Окрім зазначених класів речовин, з плодових тіл та міцеліальних культур грибів роду *Xylaria* було виділено багато інших органічних сполук з різноманітними карбоновими скелетами. Наприклад, похідні піронів, такі як ксиларон та 8,9-дегідроксиларон з культуральної рідини *X. hypoxylon* (Schüffler et al., 2007), ксиларопірон з *X. feejeensis* (Siriwach et al., 2011), граміцин з *X. grammica* (T. Y. Kim et al., 2018). Полікетиди клоностохідіол і ксилобовід були виділені з *X. obovata* (Abate et al., 1997). Стероїди ергостерин та блазеїн були отримані з ендofіта *Xylaria* sp.7S-1-3-1 (Wu et al., 2011).

Загалом велика кількість вторинних метаболітів була отримана з грибів, ідентифікованих до роду. Це пов'язано з тим, що більшість таких грибів є ендofітами, ідентифікація яких, незважаючи на загальну доступність сучасних методів молекулярної біології, усе ще залишається проблематичною, через відсутність надійних референтних даних у відкритих базах даних.

Втім, одним із шляхів подолання цієї проблеми є виявлення хемотаксономічних маркерних сполук. Дослідження вторинних метаболітів у культурах *Xylariaceae* вказують на те, що профілі вторинних метаболітів є не тільки

важливими видоспецифічними ознаками, але навіть мають філогенетичне значення. Однак надійність хемотаксономічних даних обмежена як мінімум тим, що вони стосуються динамічного, фізіологічного процесу, а отже, залежать від стандартизованих методик (Stadler, 2011; Stadler & Hellwig, 2005).

Отже, аналіз літературних даних щодо різних аспектів біології представників роду *Xylaria* виявив, що найбільшу увагу було приділено морфологічним, екологічним та молекулярно-філогенетичним дослідженням цих грибів, використовуючи як об'єкт здебільшого плодові тіла представників цього роду. Водночас, інформація щодо дослідження штамів видів роду у культурі фрагментована та стосується здебільшого підбору оптимальних умов для росту та синтезу біологічно активних сполук. Зазначаються також властивості таких сполук, серед яких антимикробні, антиоксидантні, антивірусні та ряд інших. Проте, навіть зважаючи на існуючі напрацювання, є необхідність у їх доповненні у зв'язку з невеликим об'ємом охоплених видів відносно усього роду.

Морфологічні особливості життєвих стадій, поліморфізм багатьох комплексних видів (або видових комплексів) та широке розповсюдження представників роду *Xylaria* призвело до певних труднощів у таксономії цих грибів. Поточний стан реконструкції філогенетичної спорідненості в межах роду *Xylaria* можна назвати проміжним, оскільки багато відомих таксонів не були включені до аналізу. До того ж різні локуси ДНК використовувалися в незалежних дослідженнях, іноді з суперечливими результатами. Тому поповнення бази даних нуклеотидними послідовностями нових штамів видів роду *Xylaria*, які до того ж підкріплені результатами культурально-морфологічних досліджень, є актуальним.

Варто зазначити, що вивчення особливостей штамів видів роду *Xylaria* з різних географічних зон України не проводилось, а отже вивчення характеристик штамів такого походження є доцільним і актуальним.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкти дослідження. Виділення чистих культур із природного матеріалу

Об'єктами досліджень стали чисті культури 28 штамів 7 видів роду *Xylaria* (табл. 2.1.1.), депоновані до Колекції культур шапинкових грибів (*IBK*) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (Bisko et al., 2023).

Таблиця 2.1.1

Перелік досліджених штамів видів роду *Xylaria*

Вид	Номер штаму в колекції <i>IBK</i>	Місце та дата збору зразка, з якого ізольовано культуру
<i>Xylaria carpophila</i> (Pers.) Fr.	2788*	Україна, Івано-Франківська область, Надвірнянський район, заповідне урочище "Букове"; 48°39'07.9"N 24°34'07.1"E; 2021
<i>Xylaria ellisii</i> J.B. Tanney, Seifert & Y.M. Ju	2724*	Україна, Івано-Франківська область, Богородчанський район, с. Стара Гута, 48°38'13.5"N 24°12'21.8"E; 2020
<i>Xylaria hypoxylon</i> (L.) Grev.	2725*	Україна, Івано-Франківська область, дендрологічний парк «Діброва»; 48°46'31.9"N 24°30'48.2"E; 2020
	2732*	Україна, Івано-Франківська область, Надвірнянський район, урочище "Ділок"; 48°36'00.1"N 24°33'10.6"E; 2020
	2734*	Україна, Тернопільська область, Бережанський район; 49°26'8.05"N 24°52'41.03"E; 2020
	2735*	Україна, Івано-Франківська область, національний природний парк «Гуцульщина»; 2020
<i>Xylaria longipes</i> Nitschke	2715*	Україна, Івано-Франківська область, національний природний парк «Гуцульщина»; 2020
	2716*	Україна, Київська область, м. Київ, національний природний парк «Голосіївський»; 2020

	2717*	Україна, Івано-Франківська область, дендрологічний парк «Діброва»; 48°46'28.3"N 24°30'39.6"E; 2020
	2718*	Україна, Київська область; Бучанський район, с. Борівка; 2020
	2722*	Україна, Київська область, Київ, регіональний ландшафтний парк «Лиса гора»; 2020
	2726*	Україна, Вінницька область, 49°15'08.3"N 28°24'34.1"E; 2020
	2730*	Україна, Київська область, м. Київ, національний природний парк «Голосіївський»; 50°23'27.1"N 30°31'11.9"E; 2020
	2733*	Україна, Львівська область, Золочівський район, с. Білий камінь, 49°52'40.9"N 24°53'02.9"E; 2020
	2738*	Україна, Київська область, м. Київ, НПП "Голосіївський"; 50°22'21.3"N 30°29'46.6"E; 2020
	2739*	Україна, Київська область, Бучанський район, с. Бабинці; 2020
<i>Xylaria oxyacanthae</i> Tul. & C. Tul.	2789*	Україна, Київська область, м. Київ, національний природний парк "Голосіївський"; 50°23'23.9"N 30°30'52.5"E; 2021
<i>Xylaria polymorpha</i> (Pers.) Grev.	2382	Україна, Івано-Франківська область, природний заповідник «Горгани»; 2014
	2430	Україна, Донецька область, Бахмутський район, с. Дронівка; 2013
	2719*	Україна, Вінницька область, 49°16'13.8"N 28°26'40.1"E; 2020
	2720*	Україна, Вінницька область, 49°16'13.8"N 28°26'40.1"E; 2020
	2721*	Україна, Вінницька область, 49°15'31.3"N 28°26'21.0"E; 2020
	2723*	Україна, Сумська область, Роменський район, с. Братське; 2020
	2727*	Україна, Вінницька область, 49°15'23.9"N 28°25'56.6"E; 2020
	2729*	Україна, Харківська область, м. Харків, 50°02'38.4"N 36°15'50.4"E; 2020

	2736*	Україна, Миколаївська область, Вознесенський район, заповідне урочище «Трикратьський ліс»; 2020
	2737*	Україна, Миколаївська область, Вознесенський район, заповідне урочище «Трикратьський ліс»; 2020
<i>Xylaria vasconica</i> J. Fourn. & M. Stadler	2728*	Київська обл., Обухівський район, м. Ржищів; 49°58'30.0"N 31°06'39.6"E; 2020

Примітки: «*» – ідентифіковано та ізольовано в чисту культуру дисертанткою.

Ідентифікацію зразків, з яких було виділено чисті культури, проводили згідно з визначниками, монографіями та опублікованими працями, присвяченими дослідженням роду *Xylaria* (Морочковський и др., 1969; Смицкая и др., 1986; Rogers, 1986; Hansen & Knudsen, 2000; Fournier et al., 2011; Ju et al., 2018).

Для виділення культур строми попередньо стерилізували, обробляючи поверхню 96% етиловим спиртом або занурюючи на декілька секунд у 3% розчин перекису водню. У лабораторних умовах відокремлювали частини ентостроматичної тканини та розміщували їх на стерильному живильному середовищі СА з антибіотиком ампіциліном (ПАТ «Arterium», Україна). Інкубацію проводили за температури 26 ± 1 °С протягом 3–7 діб (Билай, 1982).

2.2. Склад живильних середовищ, використаних у дослідженнях

Для вивчення різних біологічних характеристик штамів видів роду *Xylaria* використовували такі живильні середовища:

1. Глюкозо-пептон-дріжджове рідке середовище (ГПД), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дріжджовий екстракт – 3,0; $MgSO_4$ – 0,25; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0;
2. Глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дріжджовий екстракт – 3,0; $MgSO_4$ – 0,25; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; агар – 22,0;
3. Агаризоване пивне сусло (СА) – пивне сусло, сахаристість 8° за Балінгом – 1л., агар – 20,0;
4. Мальц-екстракт агар (МЕА) – середовище виробництва Scharlau Chemie S.A., Іспанія;

5. Мюллера-Хінтона агар (МХА) – середовище виробництва Biolife, Італія;
6. Мюллера-Хінтона бульйон (МХБ) – г/л: пептон – 17,0; крохмаль – 1,5; дріжджовий екстракт – 0,5; агар – 17,0.

2.3. Молекулярно-генетичні дослідження

2.3.1. Виділення ДНК та електрофорез в агарозному гелі

Тотальну ДНК із попередньо вирощеного на середовищі ГПДА міцелію виділяли за допомогою набору Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit™ (Zymo Research, США) відповідно до інструкцій виробника. Якість виділення оцінювали за допомогою електрофорезу ДНК в агарозному гелі. Для приготування 2% агарозного гелю використовували трис-боратний буфер (TBE) та агарозу (Clever Scientific, Велика Британія). У лунки в гелі для електрофорезу вносили 5 мкл розчину з ДНК та 1 мкл реагенту CSL-Runsafe (Clever Scientific, Велика Британія). Електрофорез проводили у TBE при напрузі струму 120 В протягом 30 хв. Для визначення розміру фрагментів ДНК використовували CSL-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU (Clever Scientific, Велика Британія). Для візуалізації результатів використовували транслюмінатор (Clever Scientific, Велика Британія) за довжини хвилі 254 нм.

2.3.2. Ампліфікація фрагментів ДНК

Гени, що кодують β -тубулін (TUB2), другу субодиницю РНК-полімерази II (RPB2) та внутрішній транскрибований спейсер ядерної рДНК (ITS) ампліфікували за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з використанням праймерів, наведених у таблиці 2.3.2.1.

Таблиця 2.3.2.1

Праймери для молекулярно-генетичного аналізу

Праймер	Нуклеотидна послідовність
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
5F2	5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGG C-3'

7cR	5'-CCCATRGCTTGYTTTRCCCAT-3'
Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'
Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'

Ампліфікацію проводили у реакційній суміші: 12,5 мкл реагенту DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США), 0,5 мкл кожного праймера, 1 мкл ДНК та 10,5 мкл води, з використанням термоциклера (Techne Prime, Велика Британія) за умов, підібраних для кожної пари праймерів (табл. 2.3.2.2).

Таблиця 2.3.2.2

Реакційні параметри для ампліфікації різних ділянок ДНК видів роду *Xylaria* методом ПЛР

ДНК локус	Праймери	Умови ПЛР
ITS	ITS1 ITS4	Первинна денатурація: 95,0°C, 2 хв; 40 циклів: денатурація при 95,0°C, 45 с; відпал праймерів при 52,0°C, 45 с; елонгація при 72,0°C, 45с; Кінцева елонгація: 72,0°C, 8хв
RPB2	5F2 7cR	Первинна денатурація: 95,0°C, 5 хв; 35 циклів: денатурація при 95,0°C, 45 с; відпал праймерів при 55,0°C, 90 с; елонгація при 72,0°C, 1 хв; Кінцева елонгація: 72,0°C, 8хв
TUB2	Bt2a Bt2b	Первинна денатурація: 95,0°C, 2 хв; 40 циклів: денатурація при 95,0°C, 45 с; відпал праймерів при 63,0°C, 90 с; елонгація при 72,0°C, 45 с; Кінцева елонгація: 72,0°C, 8хв

Якість та кількість ампліфікованої ДНК оцінювали за допомогою гелю електрофорезу (аналогічно до описаного в підрозділі 2.3.1). Наявність однієї яскравої смуги в кожній лунці приймали за ознаку успішної ампліфікації.

2.3.3. Секвенування ДНК та філогенетичний аналіз

Ампліфіковані ділянки ДНК очищали за допомогою набору DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research, США) та секвенували за Сенгером з використанням праймерів, зазначених у таблиці 2.3.2.1. Секвенування здійснювали на комерційній основі, користуючись сервісом GATC Sequencing Services (Eurofins Genomics Germany, Німеччина). Для оцінки таксономічного положення кожного секвенованого ізоляту консенсусні послідовності ITS, β -тубуліну та RPB2 порівнювали з наявними у базі даних GenBank за допомогою алгоритму BLASTn. До філогенетичного аналізу були включені найбільш близькі послідовності з покриттям та максимальною ідентичністю $\geq 98\%$. Доступні послідовності таксонів, включених у філогенетичний аналіз цього дослідження були завантажені з NCBI згідно номерів доступу до GenBank. Для кожної групи даних (ITS, β -тубулін, RPB2) проводили парне та множинне вирівнювання послідовностей за допомогою програми ClustalW, включеної до пакету програмного забезпечення MEGA v. 11 (Tamura et al., 2021).

Філогенетичні дерева були побудовані в MEGA v. 11 за допомогою методу приєднання сусідів (Neighbour-Joining) (Felsenstein, 1985; Saitou & Nei, 1987; Tamura et al., 2004) і максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) та 3-параметрової моделі Тамури (Tamura, 1992) з бутстреп аналізом при 500 репліках. Нуклеотидні послідовності штаму *Biscogniauxia nummularia* (Bull.) Kuntze MUCL 51395 (KY610382, KX271241, KY624236) було використано як аутгрупу для укорінення філогенетичних дерев.

2.4. Умови культивування вегетативного міцелію на живильних середовищах

Для культивування об'єктів дослідження використовували різні середовища з наведених у переліку в підрозділі 2.2 та різні методи і тривалість, обумовлені завданнями окремих експериментів.

Для отримання інокулюму міцелій обраних штамів культивували на чашках Петрі з середовищем ГПДА за температури $26,0 \pm 1$ °С та гомогенізували за допомогою гомогенізатора ("Mechanika Precyzyjna", Польща).

Стаціонарне культивування. Досліди проводили у колбах Ерленмеєра ємністю 500 мл, які містили 200 мл рідкого середовища ГПД. Інокулюм вносили в колби у кількості 10 % від об'єму живильного середовища та інкубували у термостаті за температури $26,0 \pm 1$ °С у темряві.

Глибинне культивування. Досліди проводили у колбах Ерленмеєра ємністю 250 мл, які містили 100 мл рідкого середовища ГПД. Інокулюм вносили в колби у кількості 10 % від об'єму живильного середовища. Культивування проводили на лабораторних качалках (120 об/хв) за температури $26,0 \pm 1$ °С у темряві.

Біомасу міцелію, отриману в умовах стаціонарного та глибинного культивування, відфільтровували від живильного середовища через капронові фільтри та промивали дистильованою водою. Кількість сухої біомаси розраховували у г/л після висушування до постійної ваги за температури $60,0 \pm 1$ °С (з урахуванням маси інокулюму). Для культуральної рідини відмічали значення об'єму наприкінці культивування та значення рН.

2.5. Морфолого-культуральні дослідження

2.5.1. Швидкість радіального росту міцеліальних колоній

Ріст та морфологію колоній вивчали на агаризованих середовищах ГПДА та МЕА за температури $25,0 \pm 1$ °С. У процесі росту вегетативного міцелію радіуси колоній вимірювали у чотирьох перпендикулярних напрямках кожену другу добу культивування впродовж трьох тижнів. Для розрахунку середньої швидкості радіального росту (V_R , мм/доба) будували криву залежності радіуса міцеліальної

колонії від часу культивування. У фазі лінійної залежності приросту радіуса від часу визначали середню швидкість росту (V_R , мм/доба) за формулою (2.5.1.1):

$$V_R = (R_1 - R_0) / (t_1 - t_0) \tag{2.5.1.1}$$

де R_1 – радіус колонії в кінці фази лінійного росту, R_0 – радіус колонії на початку фази лінійного росту (мм), $t_1 - t_0$ – тривалість лінійної фази росту (доба) (Бисько и др., 2011).

2.5.2. Макроскопічні характеристики колоній

При описі морфології колоній звертали увагу на текстуру, щільність, зональність, пігментацію, появу ексудату, утворення тяжів, колір реверзumu та край колонії. Морфологічні характеристики описували згідно з класифікацією Сталперса (Stalpers, 1978). Забарвлення колоній описували згідно з Ріджвеєм (Ridgway, 1912). За змінами у морфології колоній спостерігали кожні 2–3 доби культивування (Бухало, 1988).

2.5.3. Вплив підвищених температур на життєздатність міцелію

Для перевірки життєздатності міцелію проводили його культивування у пробірках зі скошеним середовищем СА в діапазоні температур від $35,0 \pm 0,1$ °C до $45,0 \pm 0,1$ °C з кроком $1,0$ °C. Після трьох днів інкубації фіксували появу росту або його відсутність. У випадку відсутності росту життєздатність міцелію перевіряли, розміщуючи його за умов оптимальної температури ($26,0 \pm 0,1$ °C) протягом 14 діб. Експеримент тривав до фіксації відсутності росту міцелію штаму після 14-ї доби після переносу його в оптимальні умови культивування.

2.6. Мікроскопічні дослідження

2.6.1. Світлова мікроскопія

Вивчення мікроструктур вегетативного міцелію проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX 53 (Токіо, Японія) з диференціальною

інтерференційною оптикою Номарського (DIC). Мікрофотографії були зроблені за допомогою камери Olympus LC30 і оброблені за допомогою програмного забезпечення cellSens Entry. Для приготування препаратів використовували вегетативний міцелій у фазі активного росту (5–7 діб) та після тривалого культивування (30 діб). Зразки для світлової мікроскопії готували з використанням дистильованої води або 10% КОН (Билай, 1982).

2.6.2. Сканувальна електронна мікроскопія

Зразки для сканувальної електронної мікроскопії (SEM) готували за модифікованою методикою Кваттельбаума та Карнера (Quattlebaum & Carner, 1980). Для цього міцелій культивували на середовищі ГПДА з розміщеними на поверхні стерильними покривними скельцями (4×4 мм). Після того як вегетативний міцелій повністю обростав поверхню покривних скелець, їх переносили до камери фіксації та витримували у парах тетроксиду осмію (1% розчин OsO₄) протягом 8 годин. Після фіксації скельця витримували до повного висихання протягом 72 годин. Далі зразки покривали золотом у вакуумному розпилювачі ЛІ-4Х з ротацією та досліджували за описаною методикою (Buchalo & Didukh, 2005) за допомогою сканувального електронного мікроскопу Jeon JSM-6060 LA (Японія).

2.7. Дослідження антагоністичної активності колоній у подвійній культурі

Антагоністичну здатність міцеліальних культур визначали за допомогою тесту з подвійною культурою згідно з роботами Бадалян зі співавторами (Badalyan et al., 2002, 2004). Конкурентні взаємодії між штамами видів роду *Xylaria* та організмами з переліку тест-культур оцінювались в експериментах на чашках Петрі (діаметр 90 мм) з живильним середовищем ГПДА (20 мл). Кожна дослідна пара складалась зі штаму виду роду *Xylaria* (табл. 2.1.1) з одного боку та тест-культури з іншого. До тест-культур належали *Aspergillus niger* Tiegh. VURV-F 822, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout N-023, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1P.2II.3, *Mucor plumbeus* Bonord. N-018, *Penicillium polonicum* K.W. Zaleski VURV-F 823, *Trichoderma viride* Pers. N-022. Інокулюм грибів вирощували на середовищі ГПДА

впродовж 7–14 діб (у залежності від швидкості росту) за температури $26,0 \pm 1$ °C. Інокулюм тест-культур вносили на чашку Петрі мікробіологічною петлею. По інший бік чашки Петрі дисками вносили інокулюм штамів видів роду *Xylaria*, який стерильно вирізали із зони активного росту колоній. Відразу після інокуляції чашки герметизували плівкою Parafilm та інкубували в темряві за температури $26,0 \pm 1$ °C протягом 30 діб. Ріст колоній і тип взаємодії досліджували щодня до настання рівноважного стану, після чого проводили оцінку антагоністичних властивостей.

Антагоністичну здатність досліджених штамів видів роду *Xylaria* визначали з використанням рейтингової шкали, заснованої на 4 основних типах реакцій (A, B, C, D) і 4 підтипах (C_{A1} , C_{B1} , C_{A2} і C_{B2}) (Badalyan et al., 2002) у модифікації Аль-Маалі Г.А. (Медведєв, 2020):

- тип А: зупинка росту штаму виду роду *Xylaria* відбувалась при безпосередньому контакті з колонією тест-культури;
- тип В: зупинка росту штаму виду роду *Xylaria* відбувалась до контакту з тест-культурою, між колоніями утворювалась зона інгібування;
- тип С: штам виду роду *Xylaria* заростав всю вільну від міцелію тест-культури поверхню чашки Петрі без зупинки росту;
 - підтип C_{A1} : штам виду роду *Xylaria* частково обростав колонію тест-культури. Зупинка росту тест-культури відбувалась при контакті з дослідженим штамом. Зона інгібування між колоніями не утворювалась;
 - підтип C_{A2} : штам виду роду *Xylaria* повністю обростав колонію тест культури. Зупинка росту тест-культури відбувалась при контакті з дослідженим штамом. Зона інгібування між колоніями не утворювалась;
 - підтип C_{B1} : штам виду роду *Xylaria* частково обростав колонію тест культури. Зупинка росту тест-культури відбувалась при контакті з дослідженим штамом, між колоніями формувалась зона інгібування;
 - підтип C_{B2} : штам виду роду *Xylaria* повністю обростав колонію тест культури. Зупинка росту тест-культури відбувалась до контакту з дослідженим штамом. між колоніями формувалась зона інгібування;

- тип D: тест-культура пригнічувала ріст штаму виду роду *Xylaria*, (всі варіанти обернені до типу C та його підтипів).

Кожному типу та підтипу реакції було присвоєно значення за бальною шкалою: тип A=1 бал; тип B=2 бали; тип C=3 бали; тип C_{A1}=3,5 балів; тип C_{B1}=4 бали; тип C_{A2}=4,5 балів; тип C_{B2}=5 балів; тип D=0 балів. Індекс антагонізму (AI) розраховували для кожного виду за формулою (2.7.1):

$$AI = A(n \times 1) + B(n \times 2) + C(n \times 3) + C_{A1}(n \times 3,5) + C_{B1}(n \times 4) + C_{A2}(n \times 4,5) + C_{B2}(n \times 5) + D(n \times 0)$$

(2.7.1)

де n – частота, з якою трапляється кожен тип та підтип реакції.

Досліди проводили у 3 повторах, загалом було досліджено 504 пари. Вивчали також зміни таких характеристик морфології колоній, як їхня щільність, пігментація міцелію або реверзуму, затримка в утворенні спорношення, поява ексудату, утворення потовщень або склеротизація лінії контакту між колоніями тощо. Монокультури штамів видів роду *Xylaria* та тест-культур, вирощені на середовищі ГПДА слугували контролем для відстеження морфологічних змін.

2.8. Методи екстракції біомаси та культуральної рідини

Відфільтровану та висушену міцеліальну біомасу, отриману методом глибинного та стаціонарного культивування, подрібнювали до порошкоподібного стану. До грибної біомаси додавали розчинник у співвідношенні 1:5. Як розчинник використовували етиловий спирт (96%), метиловий спирт (98%) та етилацетат (98%). Екстракцію проводили протягом доби за температури 20,0±1 °C. Далі екстракти центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 g, після чого супернатант відокремлювали і випаровували за допомогою роторного вакуумного випаровувача при 40,0±1 °C. Сухий залишок розчиняли у тому ж розчиннику у співвідношенні 1:1 та зберігали при 4,0±1 °C до подальшого аналізу (Ебрахимзаде и др., 2019).

Для екстракції культуральної рідини, її концентрували за допомогою вакуумного роторного випаровувача при $40,0 \pm 1$ °C та екстрагували етилацетатом у співвідношенні 1:2 протягом 24 годин за температури $20,0 \pm 1$ °C. Верхню етилацетатну фракцію відокремлювали за допомогою ділильної воронки та потім концентрували за допомогою вакуумного роторного випаровувача при $40,0 \pm 1$ °C.

2.9. Біосинтетична активність культур

2.9.1. Аналіз вмісту ендopolісахаридів

Для визначення вмісту ендopolісахаридів культури грибів вирощували методом глибинного культивування протягом 14 діб.

Екстракцію ендopolісахаридів з біомаси проводили дистильованою водою у співвідношенні 1:5 упродовж 16 год у термостаті при $98,0 \pm 1$ °C. Отриманий екстракт осаджували етиловим спиртом (96%) у співвідношенні 1:2 до об'єму протягом 24 год при $4,0 \pm 1$ °C. Після чого його центрифугували (3000 g, 25 хв), супернатант видаляли, а преципітат ресуспензували у гарячій дистильованій воді ($90,0 \pm 1$ °C) та висушували до постійної маси за температури $60,0 \pm 1$ °C. Кількість ендopolісахаридів визначали гравіметрично (Бисько и др., 2011).

2.9.2. Аналіз вмісту екзopolісахаридів

Для визначення вмісту екзopolісахаридів відфільтровану культуральну рідину концентрували втричі за допомогою роторного випаровувача при $40,0 \pm 1$ °C та осаджували етиловим спиртом (96%) у співвідношенні 1:2 до об'єму впродовж 24 год при $4,0 \pm 1$ °C. Осад відфільтровували за допомогою центрифугування (3000 g, 25 хв) та ресуспензували його у дистильованій воді ($90,0 \pm 1$ °C). Отриману фракцію полісахаридів висушували до постійної маси при $60,0 \pm 1$ °C, їх кількість визначали гравіметрично (Бисько и др., 2011).

2.9.3. Аналіз вмісту меланінів

Міцелій для визначення меланінів вирощували за допомогою методу стаціонарного культивування впродовж 30 діб. Екстракцію меланінів із отриманої

біомаси проводили 1М розчином NaOH у співвідношенні 1:10 впродовж 2 годин на киплячій водяній бані (Babitskaya et al., 2000). Отриманий екстракт охолоджували та осаджували 1М HCl та підкислювали до рН 2,0. Коагульований пігмент відокремлювали центрифугуванням при 10000 g протягом 15 хвилин. Одержаний осад очищали кислотним гідролізом з використанням 6 М HCl при $100,0 \pm 1$ °C протягом 2 год для видалення вуглеводів та білків, а також обробляли органічними розчинниками (хлороформ, етилацетат та етиловий спирт) для вимивання ліпідів. Отриману фракцію меланінів висушували до постійної маси при $60,0 \pm 1$ °C, їх кількість визначали гравіметрично. Продуктивність синтезу меланінів визначали як кількість (г) на одиницю об'єму живильного середовища (л) впродовж певного часу культивування.

Визначали фізико-хімічні властивості виділеного пігменту, такі як розчинність в органічних і неорганічних розчинниках, осадження розчинами 1М HCl і 1% FeCl₃, окислення 50%-м розчином H₂O₂ і 5% KMnO₄.

Ультрафіолетова спектроскопія. Розчини меланіну для аналізу готували в 1М NaOH у концентрації 0,1 мг/мл. УФ-спектр поглинання розчинів перевіряли в діапазоні довжин хвиль 300–900 нм за допомогою спектрофотометра (Jenway 6850, Велика Британія), як контроль використовували розчин 1М NaOH. Процедура повторювали для синтетичного L-ДОФА меланіну (Sigma-Aldrich, США), як стандарту для порівняння.

Раман-спектроскопія. Вимірювання проводили за допомогою раман-спектрометра на основі одного монохроматора MDR-23 (LOMO), оснащеного ПЗЗ-детектором з ТЕ-охолодженням (iDus 420, Andor). Спектри реєстрували у діапазоні хвильових чисел (частот молекулярних коливань) 400–3500 см⁻¹ зі спектральною роздільною здатністю 2 см⁻¹. Для збудження раманівських спектрів використовували одномодовий лазер (твердотільний DPSS, 10 mW) з довжиною хвилі 457 нм. Розмір лазерного пучка та час експозиції (накопичення сигналу, 30 с) були відрегульовані для оптимізації раманівського сигналу без спричинення термодеградації зразків. Для подальшого зниження питомої потужності лазера на зразок додатково

застосовувався набір нейтральних світлових фільтрів. Вимірювання проводили у трьох повторях. Спектри були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Origin.

2.9.4. Аналіз вмісту фенольних сполук

Загальний вміст фенольних сполук оцінювали з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу. Для цього до 0,5 мл екстракту біомаси або культуральної рідини додавали 0,5 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу (Sigma-Aldrich[®], Німеччина). Через 3 хвилини додавали 10 мл 7,5% розчину Na₂CO₃ та 5 мл дистильованої води. Кінцеву суміш перемішували та інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 30 хвилин (Donkor et al., 2012). Цю процедуру також повторювали з розчинами галової кислоти у діапазоні концентрацій 1–500 мкг/мл, які використовували як стандарт для побудови калібрувальної кривої. Оптичну густину розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра (Jenway[®] 6850, Велика Британія) при довжині хвилі 750 нм. Загальний вміст фенолів розраховували використовуючи рівняння регресії (2.9.4.1):

$$y = 0,0025x + 0,0982, R^2 = 0,9852$$

(2.9.4.1)

Вміст суми фенольних сполук перераховали у мг еквівалента галової кислоти на 1г сухої маси (мг ЕГК/г) для екстрактів біомаси та мг ЕГК/мл живильного середовища для екстрактів культуральної рідини.

2.9.5. Визначення антиоксидантної активності

Антиоксидантну здатність досліджуваних екстрактів біомаси та культуральної рідини визначали за допомогою методу знешкодження вільних радикалів 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH). Об'єм 0,1 мл екстракту змішували з 2,9 мл 120 μМ розчину DPPH (Alfa aesar[®], Німеччина) у метанолі. Суміш інкубували протягом 30 хв у темряві при 37,0±1 °С. Оптичну густину розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра (Jenway[®] 6850, Велика Британія) при

517 нм. Антиоксидантну активність вираховували як відсоток знешкодження вільних радикалів або антиоксидантний індекс (AI%) за наступною формулою (2.9.5.1):

$$AI = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100 \quad (2.9.5.1)$$

де A_0 – показник абсорбції контрольної суміші (містить усі реагенти, крім досліджуваного зразка), A_1 – показник абсорбції досліджуваного зразка (Liu et al., 2008).

2.9.6. Визначення антибактеріальної активності

Оцінку антибактеріальної активності досліджуваних метанольних екстрактів біомаси та етилацетатних екстрактів культуральної рідини проводили на отриманих з Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України тест-штамах мікроорганізмів: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (Ehrenberg) Cohn ATCC 6633 (депоновано як *Bacillus subtilis*), *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 25923 (депоновано як *Staphylococcus aureus* Rosenbach), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (Schroeter) Trevisan ATCC10031 та *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 10145.

Антибактеріальну активність визначали загальноприйнятим методом дифузії в агар (Collins et al., 2004). В якості носія досліджуваних екстрактів біомаси використовували стерильні картонні диски для лабораторних тест-систем (ТОВ «АСПЕКТ», Україна). Диски просочували екстрактами біомаси. При дослідженні екстрактів культуральної рідини використовували метод лунок (Билай, 1982).

Добові культури мікроорганізмів, які використовувались у роботі, отримували шляхом їх культивування за температури $37,0 \pm 1$ °C у рідкому середовищі МХБ. Із добових культур готували вихідні бактеріальні суспензії з густиною 10^5 колонієутворюючих одиниць на 1,0 мл (КУО/мл) живильного середовища.

Інокулюм у кількості 1 мл наносили піпеткою на поверхню чашки Петрі з живильним агаризованим середовищем МХ, рівномірно розподіляючи, та використовували для визначення антибактеріальної активності метанольних екстрактів біомаси та етилацетатних екстрактів культуральної рідини. Чашки підсушували при кімнатній температурі протягом 10–15 хв, після чого за допомогою стерильного пінцета поміщали на них диски, які були просочені екстрактами біомаси та підсушені за кімнатної температури. Екстракти культуральної рідини вносили у лунки, зроблені в агаризованому середовищі МХ за допомогою стерильної сталевий трубки діаметром 6 мм. Чашки Петрі поміщали в термостат для інкубації за температури $37,0 \pm 1$ °С протягом 18–24 год. Результати досліджень враховували за розміром зон затримки росту мікроорганізмів (у мм). Усі експерименти проводили в трьох повторях з контролем росту культур і використанням ампіциліну (ТОВ «АСПЕКТ», Україна) як позитивного контролю та чистого розчинника для екстракції, як негативного контролю.

2.10. Статистична обробка результатів

Обробку отриманих результатів проводили з використанням програм Excel 2007 та Statistica 6,0. Усі експерименти проводили в 3–6 повторях. Кількісні результати, отримані при порівняльному вивченні штамів у всіх проведених експериментах, оброблено статистичними методами аналізу (Молотов, 1965) та виконано розрахунки значень стандартних квадратичних відхилень, коефіцієнтів варіації, довірчих інтервалів. Результати досліджень відповідно до t-критерію Стьюдента були статистично достовірними за рівня значущості $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ГРИБІВ РОДУ *XYLARIA*

Представники роду *Xylaria* характеризуються дуже різноманітними за формою, розмірами та кольором стромами, які відрізняються навіть у межах одного виду. Такі варіації пов'язані зі стадіями розвитку, місцезнаходженням та, ймовірно, вродженою фенотиповою мінливістю. Тому гриби цього роду є доволі складними об'єктами для ідентифікації, а оскільки застосування коректних назв та визначення синонімів супроводжується певними труднощами, більшість таксонів *Xylaria* були описані неодноразово.

Різні мікологи акцентували увагу на відмінних морфологічних структурах видів роду *Xylaria* та їхній таксономічній значимості. Наприклад, поділ на секції *Xylorugosa* і *Xyloglossa* був запропонований на основі морфології ектостроми (Martin, 1970). Згідно з такою класифікацією, види з гладкою ектостромою належали до *Xyloglossa*, тоді як види з нерівномірною, вузлуватою поверхнею стром – до *Xylorugosa*. Загалом для представників роду *Xylaria* виділяють такі основні морфологічні ознаки: умбілікатні або папілятні перитеції, циліндричні або субциліндричні 8-спорові аски з апікальним амілоїдним кільцем, світло- або темно-коричневого кольору одноклітинні або нерівномірно двоклітинні (через наявність гіалінового клітинного придатка) аскоспори з короткою або довгою зародковою щілиною різної форми (Rogers & Samuels, 1986).

Строми, з яких було виділено міцеліальні культури, депоновано до Національного гербарію України (KW-M). Стислі описи морфологічних ознак досліджених нами видів, з яких було виділено чисті культури, наведено нижче.

Xylaria carpophila. Строми вертикальні, тонкі, висотою 20–75 мм, темно-коричневі, поверхня стром вузлувата (рис. 3.1 G, 3.2 D). Перитеції сферичні, частково занурені. Аски циліндричні, 8-спорові, 120–135×6–7 мм, із амілоїдним

апикальним кільцем. Аскоспори гладенькі, одноклітинні, світло-коричневі, веретеноподібні, дещо нерівнобокі, $10-12 \times 4,5-5$ мкм, з тонкими заокругленими кінцями та добре помітною прямою зародковою щілиною (рис. 3.2 Н). Примітка: вид асоційований із плодами *Fagus sylvatica* L.

Xylaria ellisii. Строби вертикальні, поодинокі, нерозгалужені, булавовидні з широко заокругленими верхівками, 30–60 мм заввишки, із чорною рівною поверхнею. Перитеції сферичні, занурені. Аски циліндричні, 8-спорові, $95-135 \times 5,5-6,5$ мкм, із амілоїдним апікальним кільцем. Аскоспори гладенькі, одноклітинні, темно-коричневі, $8-9,5 \times 5-5,5$ мкм, еліпсоїдно-нерівнобокі, з широко заокругленими кінцями та помітними прямими зародковими щілинами (рис. 3.2 G).

Xylaria polymorpha. Строби вертикальні, з добре помітними ніжками (рис. 3.1. С), або сидячі (рис. 3.1. А), різної форми (від веретеноподібної, булавовидної, лопатевої до сплющеної або округлої), 20-100 мм заввишки, коричневого або чорного кольору, з вузлуватою або зморшкуватою поверхнею. Аски циліндричні, 8-спорові, $135-160 \times 8-10,5$ мкм, із амілоїдним апікальним кільцем. Аскоспори гладенькі, одноклітинні, темно-коричневі, $20-25 \times 6-7,5$ мкм, від еліпсоїдних до човникоподібних, із звужено-заокругленими або злегка загостреними кінцями, з помітною прямою зародковою щілиною до $2/3$ довжини спори. Примітки: *X. polymorpha* є комплексним видом, який за макроморфологічними ознаками у природі практично неможливо відрізнити від *X. longipes*, втім наведені види легко розрізняються за розмірами аскоспор та формою зародкової щілини (рис. 3.2 Е, F.)

Xylaria longipes. Строби вертикальні, здебільшого з довгими ніжками, різної форми (аналогічно до опису *X. polymorpha*), 40–70 мм заввишки, від вохряно-коричневого до коричнево-чорного кольору, вузлуваті, подекуди зморшкуваті, із зовнішнім шаром, що розтріскується на дрібні коричневі або чорнуваті полігональні лусочки (рис. 3.2 А). Перитеції субсферичні, занурені. Аски циліндричні, 8-спорові, $75-90 \times 7,5-8,5$ мкм, із амілоїдним апікальним кільцем. Аскоспори гладенькі, одноклітинні, темно-коричневі, $10,5-13 \times 5-6$ мкм, еліпсоїдно-нерівнобокі, зі

звужено-заокругленими кінцями та помітною сигмоподібною зародковою щілиною (рис. 3.2 Е).

Xylaria vasconica. Строми вертикальні, поодинокі або згруповані, 40–70 мм заввишки, зі зморшкуватою коричнево-чорною поверхнею. Перитеції сферичні, занурені. Аски циліндричні, 8-спорові, 120–165×5,5–6,5 мкм, із амілоїдним апікальним кільцем. Аскоспори гладенькі, одноклітинні, темно-коричневі, 11,5–14×4,5–5,5 мкм, еліпсоїдно-нерівнобокі, з гострими кінцями, непомітним гіаліновим клітинним придатком та прямою зародковою щілиною.



Рис. 3.1. Строми грибів роду *Xylaria*, з яких було виділено міцеліальні культури: А – *X. polymorpha* KW-M 71587 (ІВК 2720); В – *X. polymorpha* KW-M71590 (ІВК 2729); С – *X. polymorpha* KW-M71591 (ІВК 2736); D – *X. longipes* KW-M71588 (ІВК 2718); Е – *X. longipes* KW-M71593 (ІВК 2726); F – *X. ellisii* KW-M71584 (ІВК 2724); G – *X. carpophila* KW-M71589 (ІВК 2788); H – *X. oxyacanthae* KW-M 71586 (ІВК 2789); I – *X. vasconica* KW-M71583 (ІВК 2725); J – *X. hypoxylon* KW-M71594 (ІВК 2735); K – *X. hypoxylon* KW-M71585 (ІВК 2725). Довжина штрихів – 10 мм. В дужках зазначені

відповідні номери штамів у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (ІВК).

Деякі з зібраних нами зразків були знайдені у стадії анаморфи. Оскільки для коректної ідентифікації цих грибів необхідна наявність репродуктивних структур телеоморф, видову приналежність цих зразків було підтверджено за допомогою молекулярно-генетичних методів. Це, зокрема, анаморфи *X. hypoxylon* та *X. oxyacanthae*, описи строматичних структур яких наведено нижче.

Xylaria hypoxylon. Анаморфні строми вертикальні, циліндричні, 10–30 мм заввишки, часто з розгалуженими сплющеними верхівками, вкритими порошкоподібною білою масою конідіального спороношення, при основі чорні, опушені. Конідіогенні клітини гіалінові, гладенькі, конідії веретено- або булавоподібні, 9–12×3–3,5 мкм.

Xylaria oxyacanthae. Анаморфні строми вертикальні, циліндричні, 25–50 мм заввишки, з подекуди розгалуженими верхівками, вкритими порошкоподібною білою масою конідіального спороношення, під яким помітно розстріскану зморшкувату чорну поверхню. Конідіогенні клітини гіалінові, гладенькі, конідії веретено- або булавоподібні, 3–4,5×2,5–3,5 мкм.

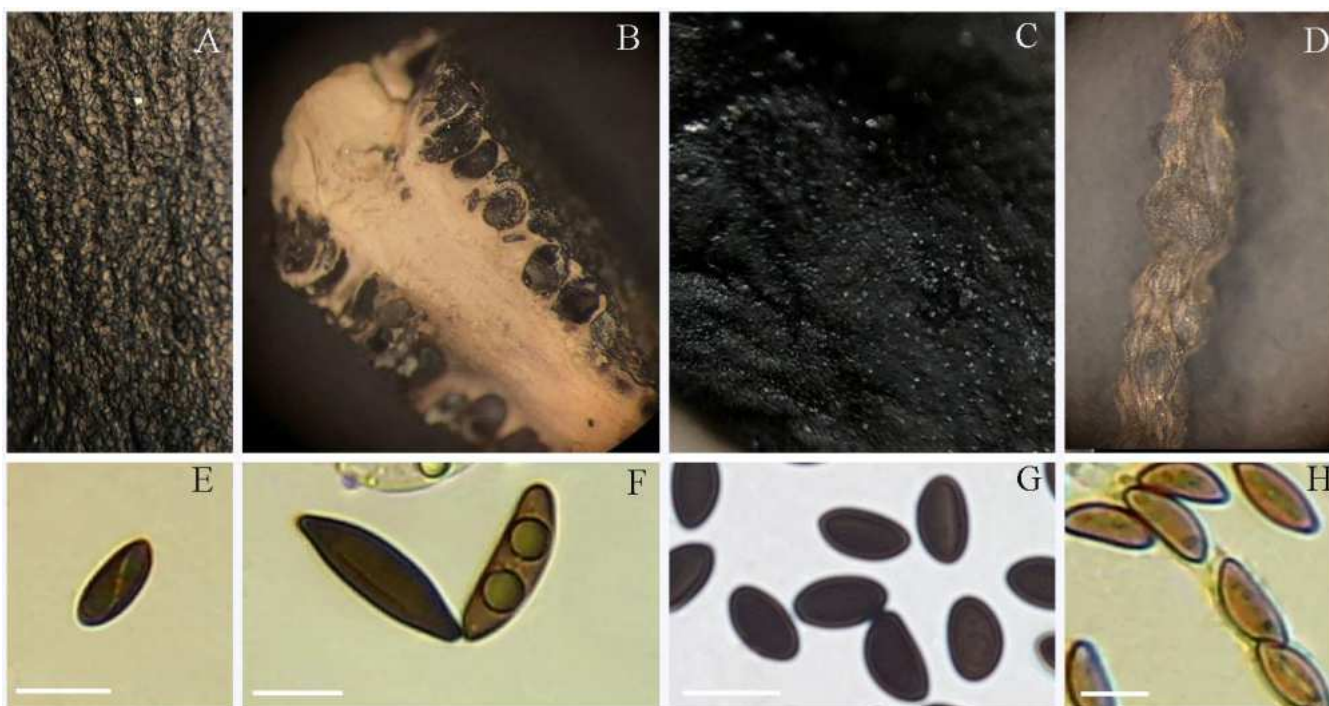


Рис. 3.2. Морфологія грибів роду *Xylaria*: А – поверхня строми *X. longipes* KW-M71588 (ІВК 2718); В – перитеції, занурені у строматичну тканину *X. polymorpha* KW-M71590 (ІВК 2729); С – поверхня строми *X. ellisii* KW-M71584 (ІВК 2724); D – поверхня строми *X. carpophila* KW-M71589 (ІВК 2788); Е – аскоспора *X. longipes* KW-M71588 (ІВК 2718); F – аскоспори *X. polymorpha* KW-M71590 (ІВК 2729); G – аскоспори *X. ellisii* KW-M71584 (ІВК 2724); H – аскоспори *X. carpophila* KW-M71589 (ІВК 2788). Довжина штрихів – 10 мкм. У дужках зазначені відповідні номери штамів у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (ІВК).

Варто зазначити, що наведені вище описи морфологічних ознак плодових тіл є стислими і включають основні характеристики, за якими було встановлено видову приналежність зібраних зразків грибів для подальшого виділення чистих культур із природного матеріалу. Більш детальні описи морфологічних структур плодових тіл представників роду *Xylaria*, які використовувались нами при ідентифікації зібраних зразків, наводяться у роботах, присвячених вивченню окремих таксонів цих грибів (Rogers, 1986; Fournier et al., 2011; Ju et al., 2018; Ibrahim et al., 2020). Оскільки метою даного дослідження було визначити особливості видів роду *Xylaria* у культурі, основну увагу приділено морфологічним особливостям міцеліальних колоній та культуральним характеристикам виділених штамів.

3.1. Макроморфологічні особливості міцеліальних колоній

Серед різноманітних аспектів вирощування міцелію *in vitro* важливим є підтримання стабільної культури та контроль її чистоти в процесі культивування. Виявлення найбільш типових морфологічних характеристик вегетативного міцелію на різних живильних середовищах дозволяє в подальшому контролювати чистоту культури на стадії ізоляції міцелію та його пересіву, а також доповнює ряд ознак таксономічного значення. Тому до завдань дослідження входило вивчення культурально-морфологічних ознак вегетативного міцелію виділених нами штамів видів роду *Xylaria* на живильних середовищах різного складу. При описі морфології

була використана адаптована термінологія (Stalpers, 1978) для позначення типів колоній, сформованих різним за текстурою міцелієм:

1. периста – гіфи формують міцеліальні тяжі, що віялоподібно розходяться від центру до периферії;
2. борошниста – гіфи тонкі і короткі, формують низький нещільний міцелій;
3. повстиста – гіфи купчасті, щільно контактують утворюючи ватоподібний, шорсткий міцелій;
4. ватоподібна – повітряні гіфи рясні, утворюють високий пухкий міцелій;
5. корковидна – гіфи формують твердий, щільний, цупкий меланізований міцелій.

Ці типи колоній не завжди чітко виражені та можуть бути змішаними: повтисто-ватоподібні, борошнисто-повстисті тощо. Детальні описи міцеліальних колоній кожного виду з ілюстраціями наведені нижче.

Xylaria polymorpha (Pers.) Grev.

При культивуванні штамів цього виду спостерігалось варіювання таких морфологічних ознак як текстура, колір, край та реверзум міцеліальних колоній. Ці характеристики були розбіжними як для різних штамів, що росли на середовищі однакового складу, так і для одного і того ж штаму на різних живильних середовищах. Загалом для штамів *X. polymorpha* нами були визначені такі культурально-морфологічні характеристики:

1. Міцеліальні колонії на середовищі ГПДА спершу білі, повтисто-ватоподібні, щільні, край колоній не притиснутий, хвилястий. Через 5–7 діб культивування спостерігається поява пігментації від центру до периферії колоній, внаслідок чого вони набувають темно-сірого забарвлення різних відтінків (R. L1 23k; L1 23i; L1 23b) (рис 3.1.1 А). Реверзум набуває зеленувато-сірого кольору з концентричними чорними колами (рис 3.1.1 С) Через тиждень культивування спостерігається поява радіально розташованих строматичних утворень ближче до периферії колоній.

Строми циліндричні, подекуди розгалужені на верхівках, 15–25×2–4 мм, сірі з рожевими верхівками та безбарвними краплинами ексудату (рис. 3.1.9 А).

2. Колонії на середовищі МЕА мають подібну морфологію, втім міцелій менш щільний, що позначається на товщині і висоті колоній. Пігментація колоній спостерігається пізніше, ніж на середовищі ГПДА, і часто розвивається зонально, не охоплюючи усю площу колонії. Забарвлення міцелію при цьому набуває сіро-зелених відтінків (R. XLV1 21i; L1 23k; L1 23i; L1 23b), концентрична зональність більш виражена (рис. 3.1.1 В, D). Строми циліндричні, нерозгалужені, 15–20×2–4 мм, сірі з білими верхівками та безбарвними краплинами ексудату (рис. 3.1.9 В).

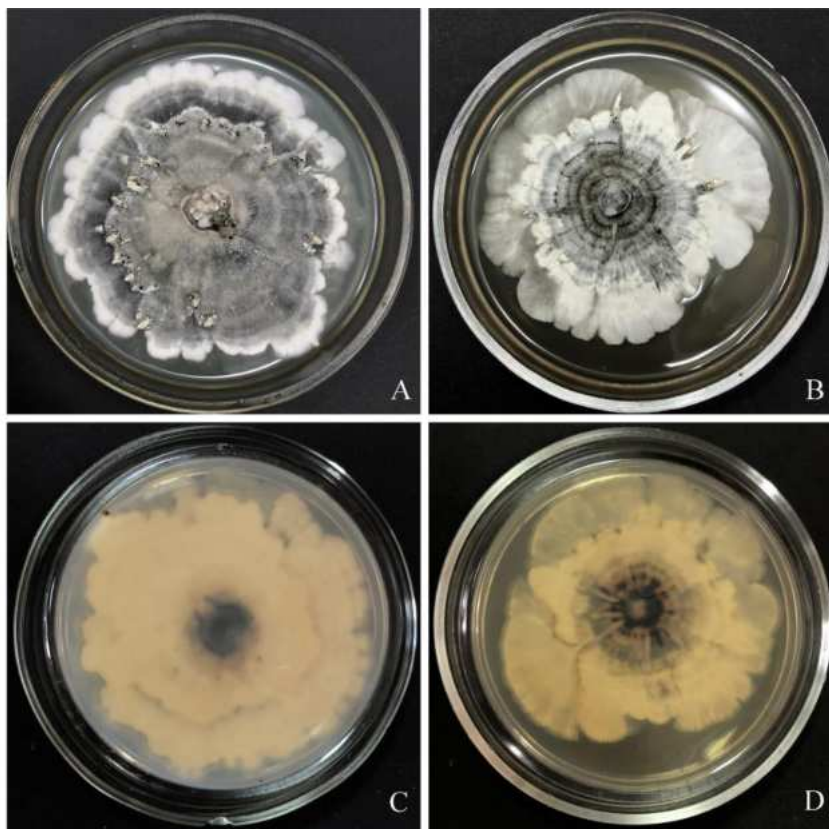


Рис. 3.1.1. Морфологія колоній *X. polymorpha* ІВК 2430 на живильних середовищах різного складу на 20-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзум колонії на середовищі МЕА.

3. Міцеліальні колонії на середовищі ГПДА спершу білі, повстисто-ватоподібні, щільні, край колоній не притиснутий, хвилястий. Через 7–14 діб культивування

спостерігається поява пігментації від центру до периферії колоній, внаслідок чого вони набувають темно-сірого або чорного забарвлення (R. L1 23m, L115k, L1 15i), при цьому міцелій ущільнюється, колонії стають коркоподібними, з притиснутими краями (рис. 3.1.2 А). Реверзум набуває чорного забарвлення з характерним візерунком, при цьому середовище набуває зеленувато-сірого відтінку (рис. 3.1.2 В). Строми з'являються після тижня культивування, вони циліндричні, розгалужені на верхівках, 20–30 мм×2–4 мм, сіро-чорні з рожевими верхівками та краплинами ексудату по всій довжині.

4. Міцеліальні колонії на середовищі МЕА подібні до колоній на цьому середовищі з групи 1, описаних вище. Основними відмінностями є притиснутий край колоній, що з часом набуває темного забарвлення та інтенсивніша пігментація реверзumu (рис 3.1.2 В, D).

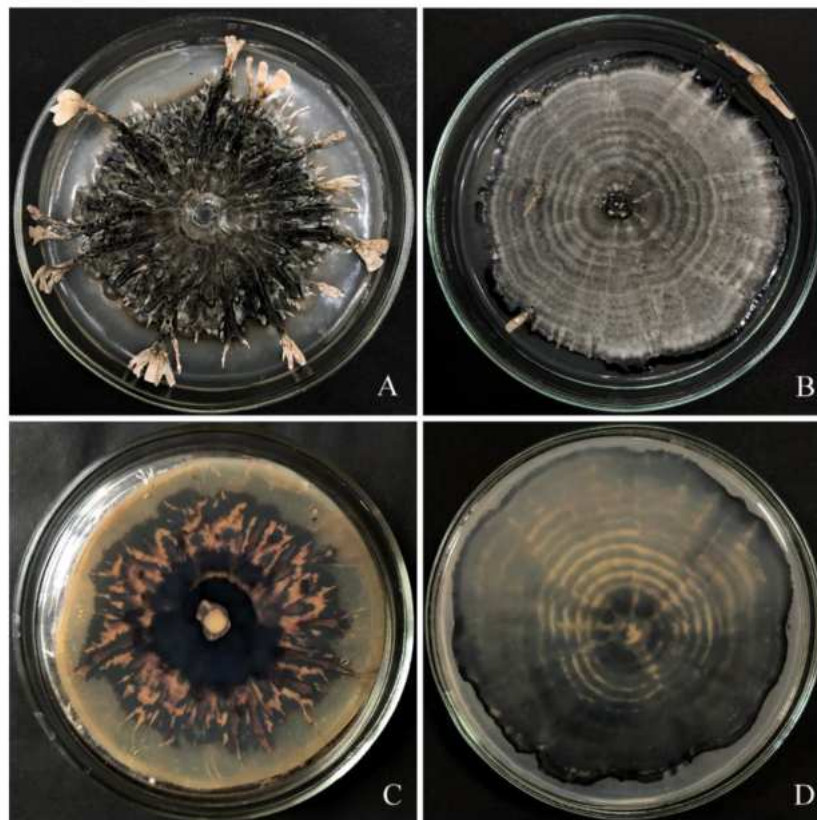


Рис. 3.1.2. Морфологія колоній *X. polymorpha* ІВК 2737 на живильних середовищах різного складу на 24-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзум колонії на середовищі МЕА.

Основними ознаками, спільними для всіх штамів *X. polymorpha*, були пігментація колонії від центру до периферії з часом від білого до різних відтінків сірого, зміна забарвлення живильного середовища на сіро-зелене, розвиток циліндричних стром після 7–10 днів культивування.

Xylaria longipes Nitschke

Міцеліальні колонії на середовищах ГПДА та МБА були подібними: білі, оксамитово-повстисті, край колоній нитчастий. Через 7–14 днів культивування з'являється пігментація, утворюється темно-сіре (R. L1, 23k) кільце навколо точки інокуляції. Для деяких штамів така пігментація не спостерігалась. Колір реверзуму кремовий, без пігментації (рис. 3.1.3). У 4-тижневих культурах після впливу світла спостерігалось утворення стром. Строми циліндричні, переважно нерозгалужені, коричнево-сірі, розміром 20–25×2–3 мм на середовищі ГПДА та лопатоподібні, оливково-сірі (R. L1, 23 i) з рожевими верхівками, розміром 10–15×3–5 (до 10 у верхівках) мм на середовищі МА (рис. 3.1.9 F, G).

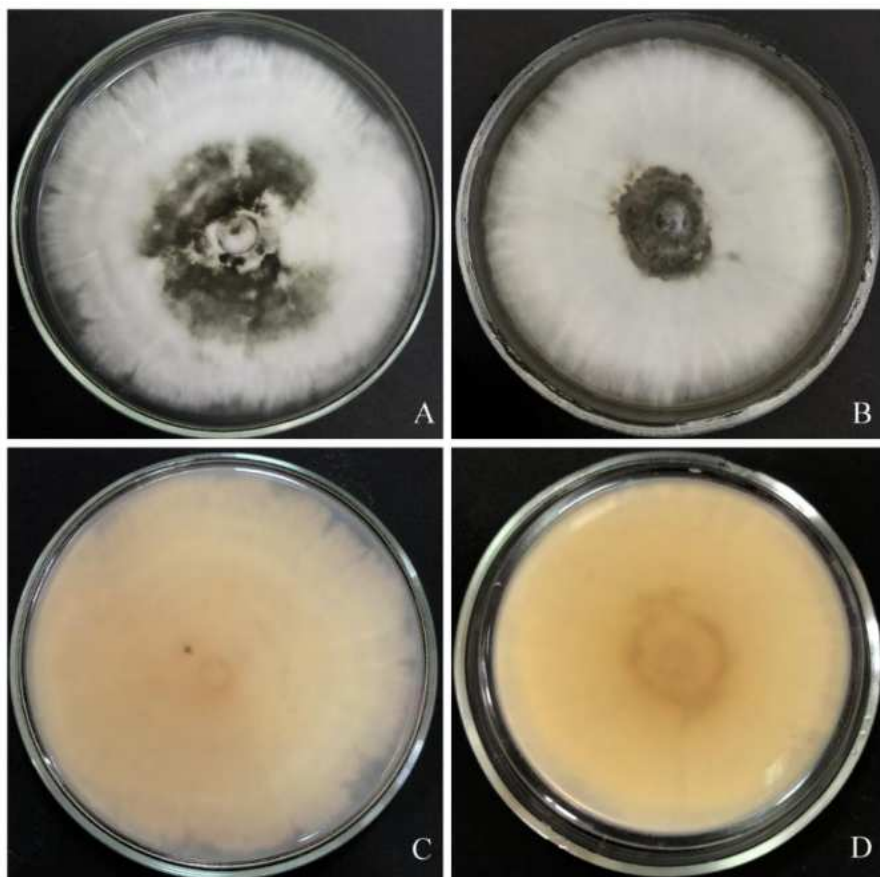


Рис. 3.1.3. Морфологія колоній *X. longipes* штам ІВК 2722 на живильних середовищах різного складу на 20-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзум колонії на середовищі МЕА.

Xylaria hypoxylon (L.) Grev.

Колонії спершу білі, повстисті з пучками повітряних гіф, нещільні, краї колоній хвилясті, опушені. Через 2 тижні культивування з'являється пігментація, міцеліальні колонії стають зонованими концентричними кільцями сірого (R. LI, 1i, 15b, 23b) та білого міцелію. Реверзум набуває чорного забарвлення навколо точки інокуляції, при цьому середовище набуває зеленувато-сірого відтінку (рис. 3.1.4 А, С). У 4-тижневих культурах після впливу світла спостерігалось утворення стром. Строми циліндричні, розгалужені на верхівках, $15\text{--}30\times 1\text{--}2$ мм, сірі з білими верхівками, опушені при основі (рис. 3.1.9 D).

Морфологія колоній на середовищі МЕА подібна (рис. 3.1.4 В, D), проте строми відрізнялись розміром ($10\text{--}20\times 2\text{--}3$ мм) та розгалуженими білими верхівками (рис. 3.1.9 E).

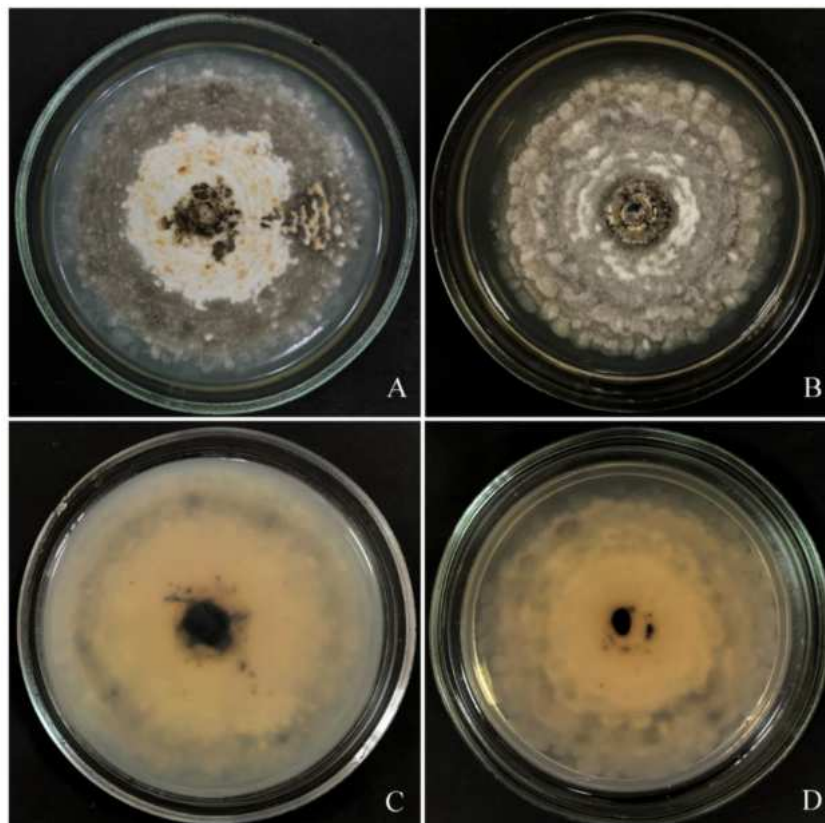


Рис. 3.1.4. Морфологія колоній *X. huroxylon* ІВК 2732 на живильних середовищах різного складу на 30-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзум колонії на середовищі МЕА.

Xylaria vasconica Sacc.

Міцеліальні колонії на середовищах ГПДА та МЕА подібні: білі, перисті, з чітко вираженими міцеліальними тяжами. Реверзум набуває чорного забарвлення (рис. 3.1.5). Через 2 тижні культивування на середовищі ГПДА спостерігається поява стром. Строми циліндричні, роговидні, $15\text{--}20\times 2\text{--}4$ мм, сірі з білими верхівками (рис. 3.1.9 С). Поява стром при культивуванні на середовищі МЕА не спостерігалась.

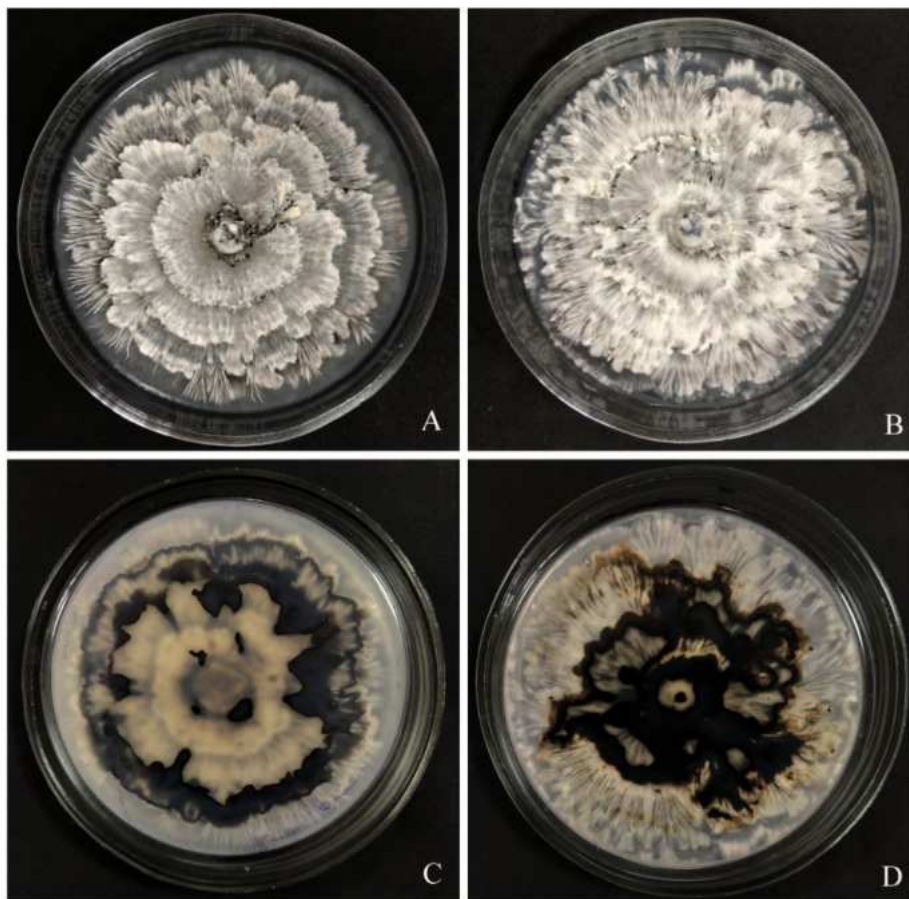


Рис. 3.1.5. Морфологія колоній *X. vasconica* ІВК 2728 на живильних середовищах різного складу на 30-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на

середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзрум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзрум колонії на середовищі МЕА.

Xylaria ellisii (Fr.) Fr.

Колонії на ГПДА ватоподібні, з великою кількістю повітряного міцелію, спершу білі, згодом набувають сіро-коричневого відтінку (R. XLVI, 17b, 21d). Реверзрум інтенсивно пігментований, набуває чорного забарвлення (рис. 3.1.6 А, С). Через 2 тижні культивування спостерігається поява стром, що концентрично розташовані по всій поверхні колонії. Строми циліндричні, нерозгалужені на верхівках, 15–20×1–3 мм, коричневі з білими верхівками (рис. 3.1.9 Н).

Колонії на МЕА подібні, проте забарвлення міцелію і реверзуму менш інтенсивне (рис. 3.1.6 В, D). Строми менші за розміром: 5–10×1–2 мм (рис. 3.1.9 І).

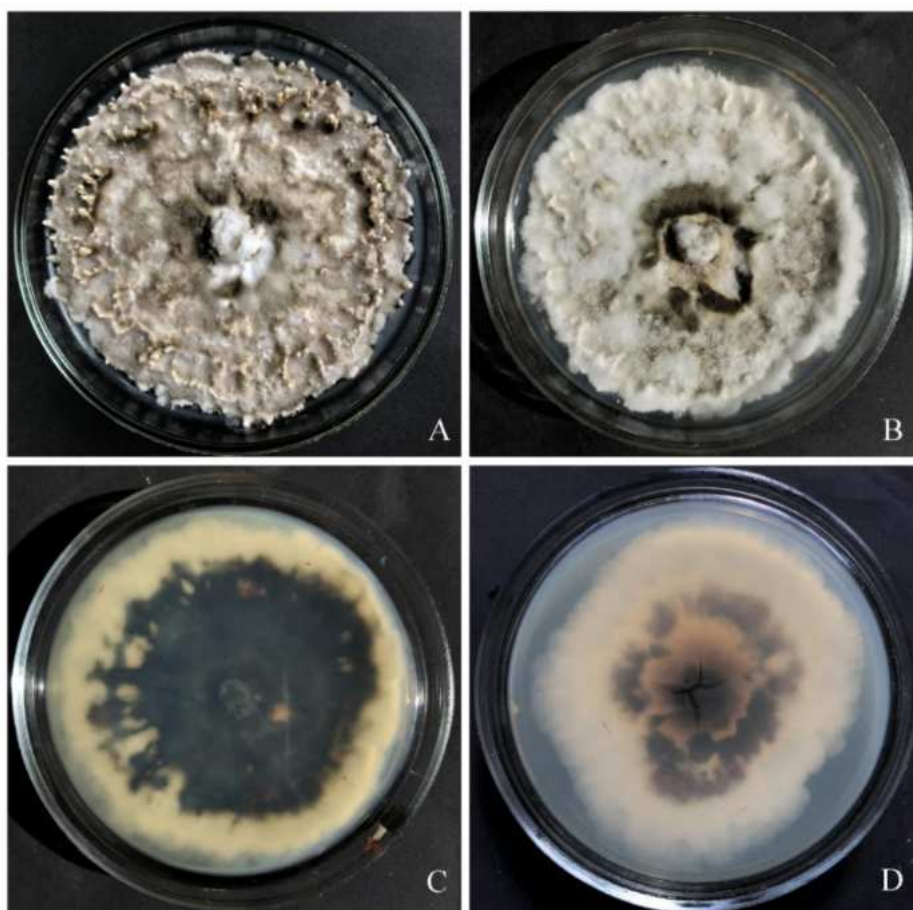


Рис. 3.1.6. Морфологія колоній *X. ellisii* ІВК 2724 на живильних середовищах різного складу на 20-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °C: А – колонія на

середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; С – реверзум колонії на середовищі МЕА.

Xylaria carpophila (Pers.) Fr.

1. Міцеліальні колонії на середовищі ГПДА повстисті, з концентричною зональністю, спершу білі, з часом набувають кремового відтінку, край колоній не притиснутий, хвилястий (рис. 3.1.7 А). Реверзум із характерним радіально-хвилястим візерунком та вкрапленнями у місцях формування зачатків строматичних утворень (рис. 3.1.7 С).

2. Міцеліальні колонії на середовищі МЕА повстисті, спершу білі, через 10–14 днів культивування спостерігається поява пігментації темно-сірого або чорного забарвлення (R. L1 23m, L115k, L1 15i) від центру до периферії колоній, край не притиснутий (рис 3.1.7 В). Спостерігається незначна пігментація реверзума (рис 3.1.7 D). Поява строматичних утворень відбувається через 3 тижні культивування після впливу світла. Строми концентрично розташовані по краю колонії, циліндричні, нерозгалужені, 10–15×1–2 мм, сірі з біло-рожевими верхівками (рис 3.1.7 В).

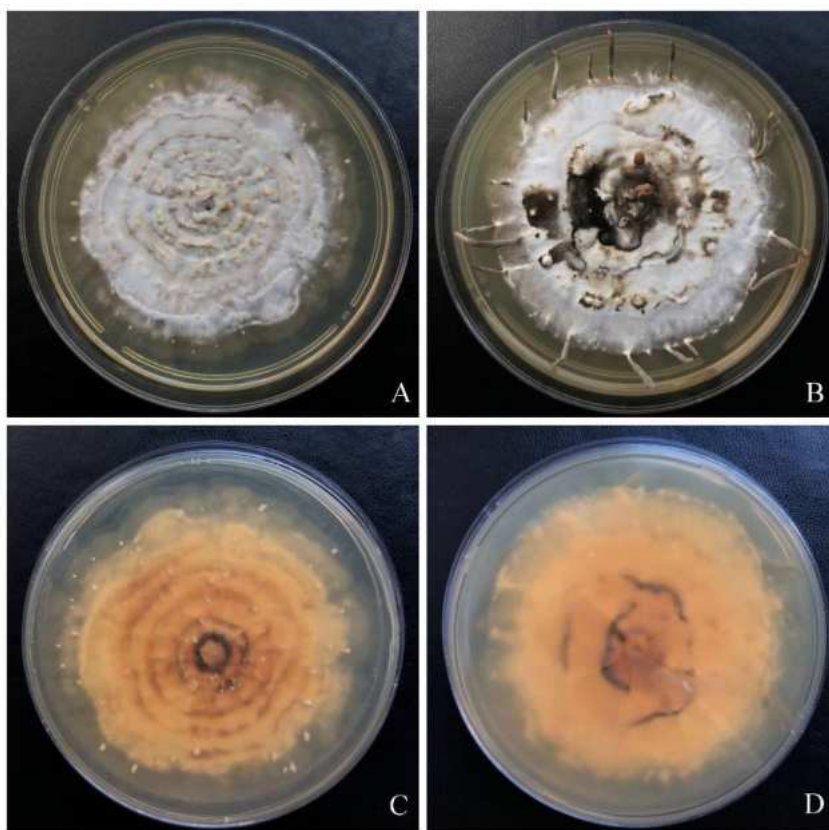


Рис. 3.1.7. Морфологія колоній *X. carpophila* ІВК 2788 на живильних середовищах різного складу на 30-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзум колонії на середовищі МЕА.

***Xylaria oxyacanthae* Tul. & C. Tul.**

Морфологія колоній на середовищах ГПДА та МЕА не відрізнялась: колонії повстисті, з хвилястим притиснутим краєм, спершу білі, згодом набувають сіро-коричневого відтінку (R. XLV, 9b; XLVI, 17d). Реверзум пігментований, коричневого кольору з помаранчевим відтінком (R. XIV, 11m; XV, 13m). При культивуванні на середовищі ГПДА спостерігалась поява краплин ексудату на поверхні колонії ближче до її периферії (рис. 3.1.8 А). Поява стром не спостерігалась на жодному з живильних середовищ.

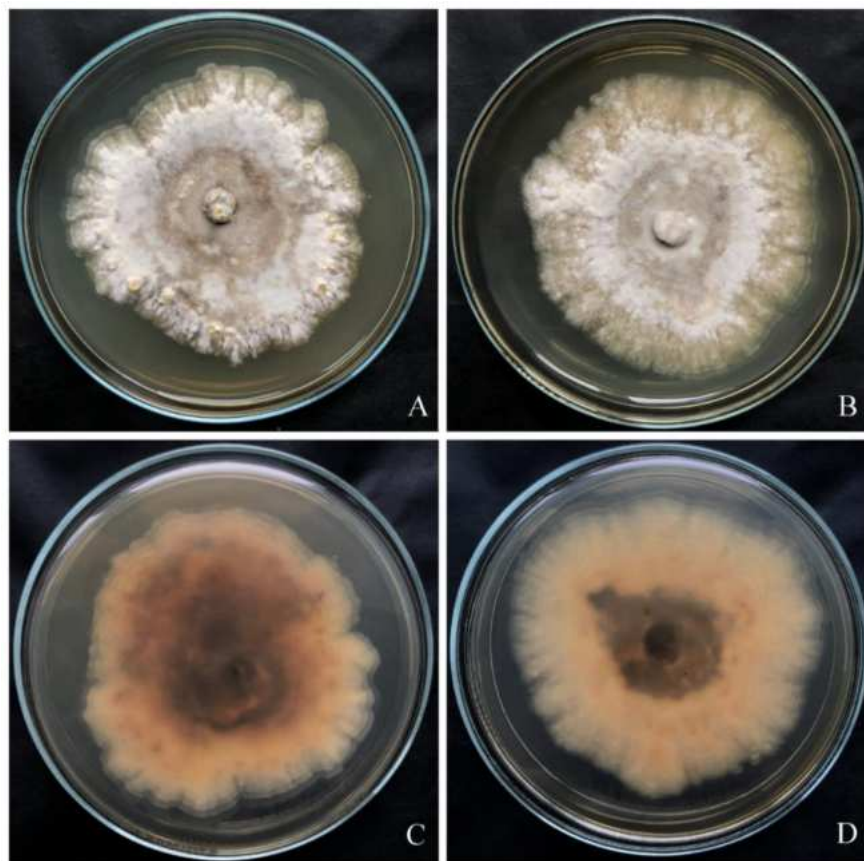


Рис. 3.1.8. Морфологія колоній *X. oxyacanthae* ІВК 2789 на живильних середовищах різного складу на 20-ту добу культивування за температури 25 ± 1 °С: А – колонія на

середовищі ГПДА; В – колонія на середовищі МЕА; С – реверзум колонії на середовищі ГПДА; D – реверзум колонії на середовищі МЕА.

Аналіз отриманих даних дозволив встановити, що серед різних видів роду *Xylaria* найбільша варіабельність морфологічних ознак була характерна для штамів *X. polymorpha*. Значно менше варіювали пігментація, текстура та щільність міцеліальних колоній різних штамів *X. longipes* та *X. hypoxylon*. Незважаючи на значну фенотипову мінливість серед штамів, деякі морфологічні ознаки були виокремлені для видів (табл. 3.3.2).

Спільними для штамів усіх видів був білий колір колонії на початку росту. З часом колонії більшості культур набували сірого забарвлення, відтінок якого був видо- та штамоспецифічним. Загалом, для більшості штамів певного виду морфологія на середовищах ГПДА та МЕА була подібною, різниця проявлялась переважно в інтенсивності пігментації реверзуму і висоті та щільності міцелію.

Деякі з зазначених нами характеристик узгоджуються із наведеними у літературі. Наприклад, для штамів видів *X. carpothila* та *X. longipes* американського походження на картопляно-декстрозному та вівсяному агарі характерними були білі міцеліальні колонії (Callan & Rogers, 1993). Концентричність колоній була характерною для видів *X. polymorpha* та *X. oxycanthae*. Втім, на відміну від наших спостережень, автори відмічали сіре забарвлення колоній при культивуванні *X. carpothila* та *X. oxycanthae*. Існують також відомості про морфологію культур деяких видів роду *Xylaria* на середовищі МЕА, аналогічному до використаного у нашій роботі. Так, колонії *X. hypoxylon* походженням із пустелі Сонора (США) морфологічно не відрізнялись за описом від ізольованих нами і також утворювали темно-сірі з білими верхівками строми після 4-х тижнів культивування (Nakasone & Gilbertson, 1977; Fenwick, 1997). За нашими спостереженнями строми утворювали усі штами *X. polymorpha*, *X. hypoxylon*, *X. ellisii*, а також окремі штами *X. longipes*: ІВК 2716, ІВК 2717, ІВК 2718, ІВК 2733, ІВК 2738, ІВК 2739. Форма, розміри та характер росту стром на поверхні колоній відрізнялись в залежності від виду (рис. 3.1.9).



Рис. 3.1.9. Строми представників роду *Xylaria*, утворені на поверхні міцеліальних колоній після 30 діб культивування за температури 25 ± 1 °C: А – *X. polymorpha* ІВК 2736 на середовищі ГПДА; В – *X. polymorpha* ІВК 2736 на середовищі МЕА; С – *X. vasconica* ІВК 2728 на середовищі ГПДА; D – *X. hypoxylon* ІВК 2735 на середовищі ГПДА; Е – *X. hypoxylon* ІВК 2735 на середовищі МЕА; F – *X. longipes* ІВК 2738 на середовищі ГПДА; G – *X. longipes* ІВК 2739 на середовищі МЕА; H – *X. ellisii* ІВК 2724 на середовищі ГПДА; I – *X. ellisii* ІВК 2724 на середовищі МЕА. Довжина штрихів – 5мм.

Результати підрозділу висвітлені у науковій публікації (Atamanchuk & Bisko, 2022).

3.2. Мікроморфологічні особливості міцеліальних колоній.

Вегетативний міцелій видів роду *Xylaria* у культурі представлений тонкостінними септованими розгалуженими гіаліновими гіфами діаметром 1–3 мкм (*X. vasconica*, *X. carpohila*, *X. hypoxylon*, *X. oxyacanthae*) або 2–4 мкм (*X. ellisii*,

X. longipes, *X. polymorpha*). Типовим явищем для міцелію всіх досліджених нами штамів було формування анастомозів (рис. 3.2.1 А). Деякі характеристики міцелію були видоспецифічними, наприклад, утворення тяжів та міцеліальних плівок було зафіксоване лише для штамів видів *X. longipes* та *X. polymorpha* (рис. 3.2.1 А, В). Водночас це явище є доволі розповсюдженим серед інших ксилотрофних грибів, зокрема родів *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Pholiota* (Buchalo et al., 2009). Міцеліальні тяжі складаються зі скупчень поздовжньо паралельних гіф і характерні для високо конкурентних грибів, які використовуючи обмежені ресурси доступних поживних речовин у природі, швидше заселяють субстрат (Thompson & Rayner, 1982). Для таких видів характерна висока швидкість росту міцелію, що підтвердилось і для деяких штамів у нашому дослідженні.

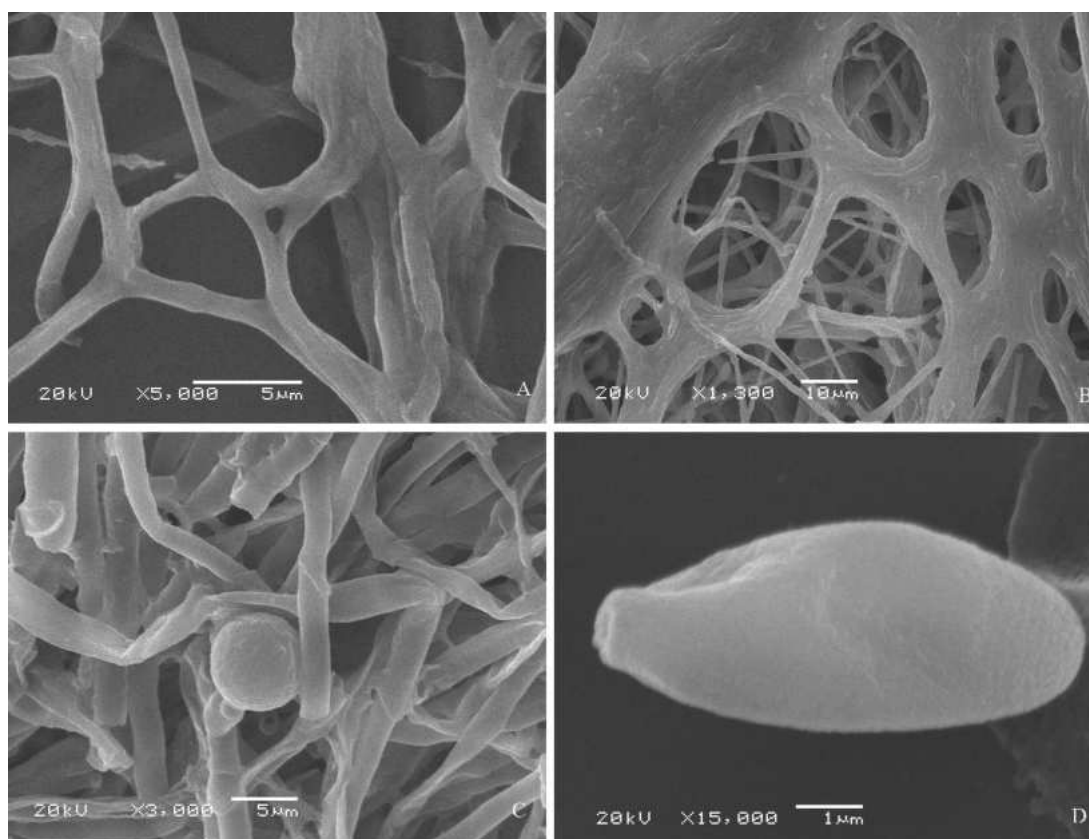


Рис. 3.2.1. Мікроморфологічні структури 20-добових колоній на середовищі ГПДА (SEM): А – анастомози та міцеліальний тяж *X. longipes* ІВК 2726; В – міцеліальні плівки *X. polymorpha* ІВК 2736; С – хламідоспора *X. polymorpha* ІВК 2430; D – конідіальне спороношення *X. longipes* ІВК 2738. Довжина штриха: А, С – 5 мкм, В – 10 мкм, D – 1 мкм.

Специфічним для деяких видів було також утворення інших структур, таких як хламідоспори та гіфальні кільця. Останні спостерігались при культивуванні штамів *X. polymorpha*, *X. longipes* та *X. carpophila* (рис. 3.2.2).

Інтеркалярні хламідоспори були виявлені у штамів видів *X. vasconica*, *X. carpophila*, *X. huroxylon*, *X. longipes*, *X. polymorpha* (рис. 3.2.3). Хламідоспори відомі у багатьох представників відділу Ascomycota та неодноразово фіксувались на гіфах інших об'єктів з Колекції культур шапинкових грибів ІВК (Buchalo et al., 2009; Михайлова та Бухало, 2005).

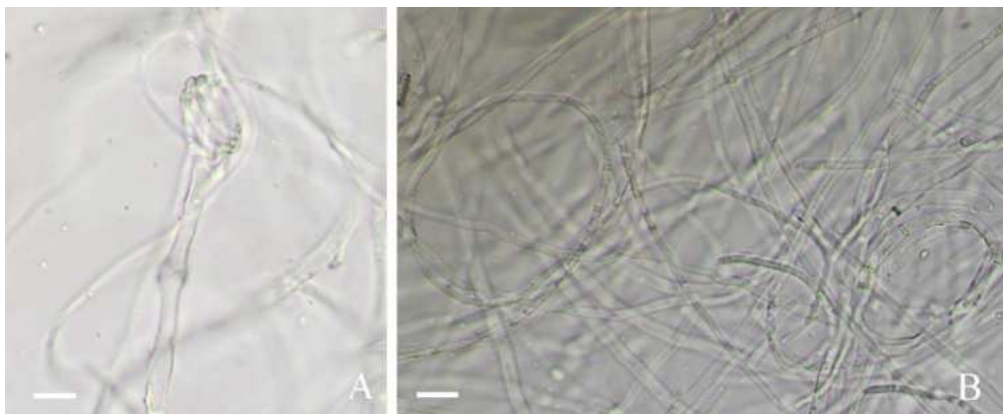


Рис. 3.2.2. Гіфальні кільця: А – *X. carpophila* ІВК 2788; В – *X. polymorpha* ІВК 2720. Довжина штрихів – 10 мкм.

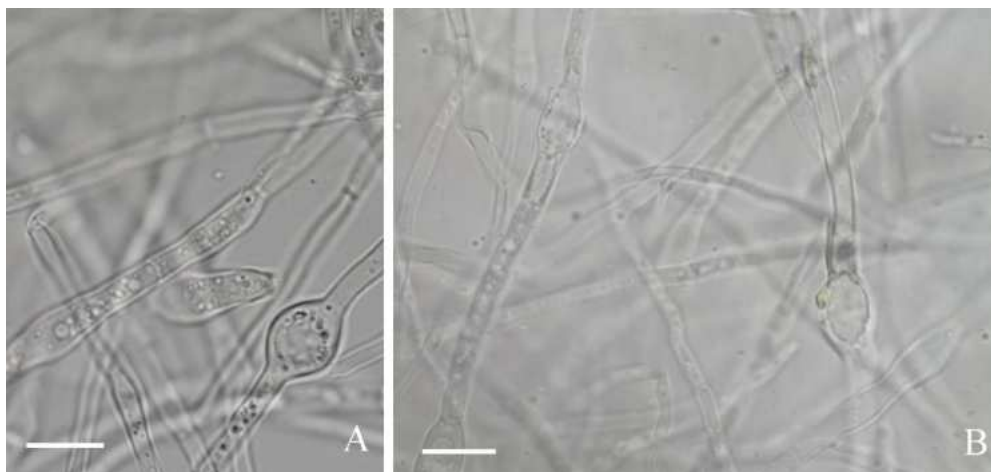


Рис. 3.2.3. Інтеркалярні хламідоспори: А – *X. vasconica* ІВК 2728; В – *X. longipes* ІВК 2718. Довжина штрихів – 10 мкм.

3.3. Швидкість радіального росту.

Оцінка швидкості росту колоній є важливим етапом дослідження міцелію у культурі, оскільки дає змогу визначати придатність та оптимальність складу живильних середовищ для його культивування. Відомості щодо швидкості росту на загальноживаних комерційних живильних середовищах були отримані для багатьох представників з Колекції культур шапинкових грибів ІВК (Бисько и др., 2011; Соломко та ін., 2000; Ломберг, 2017; Михайлова та ін., 2017). Напрацьовані дані свідчать, що часто окремі штами/види грибів надають перевагу певному середовищу, в залежності від його складу. Результати, наведені в таблиці 3.3.1, демонструють, що для більшості досліджуваних нами штамів видів роду *Xylaria* статистично достовірної різниці між швидкістю росту на середовищах ГПДА та МЕА не спостерігалось. Із 28 штамів лише 4 зростали з достовірно вищою швидкістю на середовищі МЕА та 9 штамів – на середовищі ГПДА. Найвищий показник швидкості радіального росту серед усіх культур був зафіксований для штаму *X. polymorpha* ІВК 2727 на середовищі МЕА – $4,41 \pm 0,33$ мм/добу. Найменший – $0,92 \pm 0,04$ мм/добу для штаму *X. huroxylon* 2725 на тому ж середовищі. Загалом для штамів *X. huroxylon* спостерігалась нижча швидкість росту ніж для штамів інших видів на обох живильних середовищах (табл. 3.3.1). При цьому гіфи були тоншими та утворювали менш щільні колонії, порівняно з міцелієм інших видів. Така різниця у швидкості та інтенсивності росту може бути пов'язана з різною здатністю видів до засвоєння поживних речовин із середовища. Швидке розростання міцелію часто інтерпретується дослідниками як ознака росту на збідненому або несприятливому субстраті, а повільніший ріст – сприятливими умовами та кращим засвоєнням поживних ресурсів (Zervakis et al., 2001). Проте, для оцінки придатності середовища важливо враховувати не лише швидкість, але і характер росту міцелію. За однакового діаметру колоній їх щільність і висота, відтак і кількість утвореної біомаси, може відрізнитись. Тому для відбору штамів для накопичення біомаси важливо оцінювати комплекс характеристик міцеліальних колоній.

Швидкість радіального росту штамів видів роду *Xylaria* на агаризованих живильних середовищах різного складу за температури 25±1 °С

Вид	Штам	Швидкість радіального росту (мм/добу)	
		ГПДА	МЕА
<i>X. carpophila</i>	2788	2,40±0,16*	1,84±0,05
<i>X. ellisii</i>	2724	2,79±0,15*	2,58±0,14
<i>X. hypoxylon</i>	2725	1,57±0,06*	0,92±0,04
	2732	1,46±0,06	1,47±0,03
	2734	1,31±0,04*	1,12±0,03
	2735	1,26±0,05*	1,11±0,04
<i>X. longipes</i>	2715	1,00±0,03	1,24±0,08**
	2716	2,28±0,09	2,35±0,20
	2717	2,98±0,27*	2,09±0,11
	2718	1,33±0,07	1,46±0,18
	2722	2,42±0,10	2,50±0,26
	2726	1,90±0,09	2,44±0,15**
	2730	2,41±0,39	2,71±0,09
	2733	1,50±0,16	2,03±0,18
	2738	2,21±0,12	2,22±0,05
	2739	2,75±0,18*	2,22±0,05
<i>X. oxyacanthae</i>	2789	1,35±0,08*	1,19±0,14
<i>X. polymorpha</i>	2382	2,65±0,14	2,99±0,07
	2430	2,41±0,19	2,67±0,22
	2719	2,86±0,27	3,82±0,29**
	2720	3,16±0,49	3,29±0,36
	2721	2,50±0,13*	2,05±0,07

	2723	2,03±0,31	3,24±0,18
	2727	3,49±0,77	4,41±0,33
	2729	1,65±0,07	3,15±0,36**
	2736	3,41±0,19	3,94±0,33
	2737	1,65±0,06	2,34±0,17
<i>X. vasconica</i>	2728	1,79±0,12	1,59±0,27

* швидкість росту статистично достовірно вища на середовищі ГПДА, $p \leq 0,0001$

** швидкість росту статистично достовірно вища на середовищі МЕА, $p \leq 0,0001$

За даними щодо радіальної швидкості росту досліджені нами штами видів роду *Xylaria* можна віднести до повільно зростаючих (швидкість росту менша ніж 4 мм/добу) (Nakasone & Gilbertson, 1978; Бисько и др., 2011; Ломберг, 2005) Це узгоджується з дослідженнями інших авторів, які відмічали повільну швидкість росту різних представників роду *Xylaria* на інших живильних середовищах. Було встановлено, що на картопляно-декстрозному агарі за температури 25 ± 1 °С міцелій видів *X. hypoxylon* та *X. carpophila* повністю покривав чашку Петрі за 3–4 тижні культивування (Chacko & Rogers, 1981). На середовищі МЕА діаметр колонії *X. polymorpha* досягав 50 мм через 3 тижні культивування за температури 22 ± 1 °С (Fenwick, 1994), а міцелій *X. hypoxylon* зростав зі швидкістю 10–20 мм/тиждень (Nakasone & Gilbertson, 1978). Інші дослідники вивчали морфолого-культуральні характеристики видів роду *Xylaria* на вівсяному агарі за умов освітлення 12 год/добу та температури культивування 20 ± 1 °С. Для міцелію штамів *X. polymorpha*, *X. longipes* та *X. hypoxylon* час повного обростання поверхні чашки Петрі діаметром 9 см становив 3–4 тижні культивування. Повільніше за таких умов зростали штами *X. carpophila* та *X. oxyacanthae*, які за понад 4 тижні культивування не доростали до краю чашки Петрі (Callan & Rogers, 1993).

Отже, узагальнюючи всі досліджені нами характеристики колоній штамів видів роду *Xylaria*, можна виділити ряд особливостей, властивих для певних видів (табл. 3.3.2). Варто зазначити, що до нашого дослідження існувало мало відомостей щодо швидкості росту вегетативного міцелію та морфологічних особливостей

міцеліальних колоній більшості видів роду *Xylaria*, а також мінливості окремих культуральних ознак на середовищах ГПДА та МЕА. При порівнянні отриманих нами результатів з даними щодо культурально-морфологічних особливостей видів роду *Xylaria* на інших живильних середовищах, опублікованими різними дослідниками, було виявлено ряд відмінностей.

Деякі дослідники зазначають, що такі характеристики як швидкість росту міцеліальних колоній, пігментація і формування стром є відносно стабільними діагностичними ознаками для розмежування видів у межах роду *Xylaria* (Petrini & Petrini, 1985). На нашу думку, морфологічні дані є цінним доповненням для полегшення таксономії даного роду, особливо у комбінації з молекулярно-генетичними та фізіолого-біохімічними ознаками. Тому визначення морфології є необхідним етапом у вивченні культур, особливо нових штамів, які були ізольовані вперше та не були описані раніше.

Культурально-морфологічна характеристика міцеліальних колоній видів роду *Xylaria* на живильних середовищах різного складу за температури 25 ± 1 °C

Вид	Середовище	Основні макроморфологічні особливості колоній	Швидкість радіально-го росту (мм/добу)	Форма та розміри стром	Мікроморфологічні особливості		Конідіальне спороношення
					хламідо-спори	гіфальнік ільця	
<i>X. carpohila</i>	ГПДА	Колонії повстисті, з концентричною зональністю, спершу білі, з часом набувають кремового відтінку, край не притиснутий, хвилястий. Реверзум з характерним радіально-хвилястим візерунком та вкрапленнями у місцях формування зачатків строматичних утворень.	2,40±0,16	Формуються лише зачатки строматичних утворень	+	+	-

	МЕА	Колонії повстисті, спершу білі, з часом пігментуються від центру до периферії та набувають темно-сірого або чорного забарвлення навколо точки інокуляції, край не притиснутий. Спостерігається незначна пігментація реверзума.	1,84±0,05	Циліндричні, нерозгалужені, сірі з біло-рожевими верхівками, 10–15×1–2 мм	+	+	-
<i>X. ellisii</i>	ГПДА	Колонії на обох середовищах подібні: ватоподібні, з великою кількістю повітряного міцелію, сіро-коричневі.	2,79±0,15	Циліндричні, нерозгалужені, коричневі з білими верхівками, 15–20×1–3 мм	-	-	+
	МЕА	Реверзум чорний.	2,58±0,14	Циліндричні, коричневі з білими верхівками, 5–10×1–2 мм	-	-	+
<i>X. hypoxylon</i>	ГПДА	Колонії на обох середовищах подібні: повстисті з пучками повітряних гіф, нещільні, сірі з концентричною	1,40±0,14*	Циліндричні сірі з білими верхівками, 15–30×1–2 мм	+	-	-

		зональністю, край хвилястий. Реверзум чорний, середовище зеленувато-сірого відтінку.					
	МЕА		1,16±0,43*	Циліндричні сірі з білими верхівками, 10–20×2–3 мм	+	-	-
<i>X. longipes</i>	ГПДА	Колонії на обох середовищах подібні: повстисті, білі, з нитчастим краєм.	2,08±0,64*	Циліндричні, коричневі з білими верхівками, 20–25×2–3 мм	+	+	+
	МЕА	Пігментація у вигляді темно-сірого кільця навколо точки інокуляції. Реверзум кремовий.	2,13±0,46*	Лопатоподібні, оливково-сірі з рожевими верхівками, 10–15×3–5 (до 10 у верхівках) мм	+	+	+

<i>X. oxyacanthae</i>	ГПДА	Колонії на обох середовищах подібні: повстисті, сіро-коричневі, край хвилястий. Реверзум коричнево-помаранчевий.	1,35±0,08	-	-	-	-
	МЕА		1,19±0,14	-	-	-	-
<i>X. polymorpha</i>	ГПДА	Повстисто-ватоподібні або корковидні, щільні, темно-сірі. Середовище пігментоване, сіро-зелене.	2,58±0,67*	Циліндричні, сірі з рожевими верхівками та краплинами ексудату, 15–25×2–4 мм	+	+	+
	МЕА	Повстисті, сіро-зелених відтінків із вираженою концентричною	3,19±0,73*	Циліндричні, сірі з рожевими	+	+	+

		зональністю. Середовище пігментоване, сіро-зелене.		верхівками та краплинами ексудату, 15–20×2–4 мм			
<i>X. vasconica</i>	ГПДА	Колонії на обох середовищах подібні: перисті, білі, з чітко вираженими міцеліальними тяжами. Реверзум чорний.	1,79±0,12	Циліндричні, роговидні, сірі з білими верхівками, 15–20×2–4 мм	+	-	-
	МЕА		1,59±0,27	-	+	-	-

Примітки: «*» – середнє значення для всіх досліджених штамів виду ±стандартне відхилення, «+» – наявність, «-» – відсутність.

3.4. Вплив підвищених температур інкубації на життєздатність вегетативного міцелію

Температура є одним з ключових факторів, що впливає на ріст і розвиток макроміцетів. Крайні значення температури (мінімальне та максимальне), а також оптимальна температура є різними для процесів росту, утворення репродуктивних органів та фізіологічної активності грибів (Luo et al., 2021; Антоняк та ін., 2013). Також температура безпосередньо впливає на метаболічну активність грибів (асиміляцію, дихання, біосинтез тощо) (Castillo et al., 2004). Отже, температурний режим відіграє важливу роль для технологій вирощування грибів та при збереженні чистих культур грибів у колекціях.

Дослідники виділяють різні групи грибів по відношенню до температурного фактору. Найкраще вивчені групи психрофілів і термофілів, хоча температурні межі їхнього росту чітко не встановлені. Виділяють також мезофільні, психро- і термотолерантні гриби (Бухало, 1988; Tesei et al., 2012; Антоняк та ін., 2013). При дослідженнях відношення грибів до температурних режимів окрім оптимальних температур, визначальними є критичні точки (мінімум, максимум) температур, після впливу яких ріст не відновлюється. Пасивно низькі та високі температури здатні переносити більшість грибів, проте не у вигляді вегетативних структур, а за допомогою структур, призначених для перенесення екстремальних умов, наприклад, хламідоспор (Mueller et al., 1992).

Вплив температури на ріст грибів детально вивчався для представників відділу Basidiomycota, які є об'єктами світового промислового грибовництва та біотехнології для отримання лікарських препаратів, зокрема, представників родів *Ganoderma*, *Lentinus*, *Hericium*, *Pleurotus* (Chang & Miles, 2004; Круподьрова, 2009; Бисько и др., 2011; Михайлова та ін., 2017; Ломберг, 2017). Водночас, життєздатність вегетативного міцелію представників роду *Xylaria* після впливу підвищених температур є малодослідженою, а штами видів роду *Xylaria* походженням з території України за даною ознакою досліджуються нами вперше.

З літератури відомо, що нижня межа росту вегетативного міцелію більшості видів грибів складає 4 °С, а вища 37 °С (Жданова & Василевская, 1982; Бухало, 1988). При дослідженні нами штамів видів роду *Xylaria* різного географічного походження встановлено, що при нижній граничній температурі 4±0,1 °С їхній ріст не спостерігався, проте було зафіксовано відновлення процесів життєдіяльності при перенесенні в умови інкубації за 26±0,1 °С. Жоден з досліджених штамів не зростав за температури 36±0,1 °С і вище, проте більшість штамів відновлювали ріст при подальшій інкубації за 26±0,1 °С після впливу підвищених температур (табл. 3.4.1). Серед усіх досліджених штамів лише для штамів *X. hypoxylon* не було зафіксовано здатності вегетативного міцелію до відновлення росту. Для інших видів у дослідженні спостерігалась значна штамова варіабельність у відновленні росту міцелію при зростанні температури.

Таблиця 3.4.1

Життєздатність вегетативного міцелію штамів видів роду *Xylaria* за високих температур інкубації

Вид	Штам	Температура інкубації, °С											
		36	→26	37	→26	38	→26	39	→26	40	→26	41	→26
<i>X. carpophila</i>	2788	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ⁵	-	-	-	-
<i>X. ellisii</i>	2724	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ⁵	-	+ ¹⁴	-	-
<i>X. hypoxylon</i>	2725	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2732	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2734	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. longipes</i>	2715	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-
	2716	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-	-	-
	2717	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-
	2718	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-
	2722	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-	-	-
	2726	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-	-	-	-	-
	2730	-	+ ³	-	+ ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-
	2733	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ³	-	+ ⁹	-	-	-	-
	2738	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-	-	-	-	-
	2739	-	+ ³	-	+ ³	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. oxyacanthae</i>	2789	-	+ ³	-	+ ⁷	-	+ ¹⁴	-	-	-	-	-	-
<i>X. polymorpha</i>	2382	-	+ ⁵	-	+ ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-

	2430	-	+3	-	+5	-	+9	-	-	-	-	-	-
	2719	-	+5	-	+9	-	-	-	-	-	-	-	-
	2720	-	+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2721	-	+3	-	+9	-	-	-	-	-	-	-	-
	2723	-	+3	-	+3	-	+9	-	+14	-	-	-	-
	2727	-	+7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2729	-	+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2736	-	+7	-	+9	-	-	-	-	-	-	-	-
	2737	-	+5	-	+9	-	+9	-	+14	-	-	-	-
<i>X. vasconica</i>	2728	-	+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітки: «-» – відсутність росту вегетативного міцелію; «+^{3,5,7,9,14}» – поновлення росту вегетативного міцелію на 3, 5, 7, 9 чи 14-ту добу інкубації за температури 26±0,1 °С.

Так, наприклад, для трьох з десяти штамів *X. polymorpha* (ІВК 2720, 2727, 2729) критичною температурою, після впливу якої відновлення росту міцелію не спостерігалось, була температура 37±0,1 °С. Така ж критична температура була зафіксована для вегетативного міцелію *X. vasconica* ІВК 2728. Для чотирьох штамів *X. polymorpha* (ІВК 2382, 2719, 2721, 2736) критичною була температура 38±0,1 °С, для одного (ІВК 2430) температура 39±0,1 °С, та для двох (ІВК 2723, 2737) 40±0,1 °С. Штами іншого виду з деревного субстрату – *X. longipes* реагували на вплив підвищених температур дещо інакше. По два штами відновлювали ріст вегетативного міцелію після впливу температур 38±0,1 °С та 39±0,1 °С (ІВК 2716, 2722 та 2726, 2730, відповідно). Для п'яти інших штамів цього виду критичною температурою, після якої ріст не відновлювався, була 40±0,1 °С (табл. 3.4.1).

По-різному реагував на вплив підвищених температур і міцелій видів, асоційованих з насінням. Для міцелію *X. carpophila* ІВК 2788 критичною стала температура 40±0,1 °С, в той час як міцелій *X. oyuacanthae* ІВК 2789 не відновлював ріст після впливу температури 39±0,1 °С. Відрізнялась і доба, на яку фіксувалось відновлення росту вегетативного міцелію цих видів: після впливу температури 38±0,1 °С міцелій *X. carpophila* ІВК 2788 відновлював ростові процеси вже на третю добу, а міцелій *X. oyuacanthae* ІВК 2789 на 14-ту добу інкубації при 26±0,1 °С.

Максимальна критична температура, після якої не спостерігалось відновлення росту, була зафіксована для *X. ellisii* IBK 2724 та становила $41\pm 0,1$ °C.

Виявлено залежність терміну відновлення росту міцелію досліджених штамів за $26\pm 0,1$ °C від показника початкової високої температури. Це добре простежується на прикладі штаму *X. polymorpha* IBK 2430, міцелій якого після впливу температури $36\pm 0,1$ °C відновлював ростові процеси вже на третю добу, після впливу температури $37\pm 0,1$ °C – на 5-ту добу, а з підвищенням температури до $38\pm 0,1$ °C термін зріс до дев'яти діб. Аналогічна закономірність спостерігалась для інших штамів і видів, окрім *X. longipes*. Міцелій штамів *X. longipes* (окрім штаму IBK 2733) зберігав здатність відновлювати ріст на третю добу інкубації за температури $26\pm 0,1$ °C, незалежно від значення початкової високої температури (табл. 3.4.1).

Одним із вагомих факторів існування та поширення видів в різних географічних умовах є температура. Тому можна було б припустити, що життєздатність міцеліальної культури за високих температур узгоджуватиметься із загальними закономірностями кліматичних умов у регіоні їх походження. Проте, нами спостерігались як штамові відмінності для культур зі схожим географічним походженням, так і подібність у реакції на вплив підвищених температур штамів з різних областей України. Наприклад, для штамів *X. polymorpha* IBK 2723 з Сумської та IBK 2737 з Миколаївської області, критична температура не відрізнялась і становила $40\pm 0,1$ °C. На противагу їм, штами *X. longipes* IBK 2718, 2722 та 2730, виділені зі стром, зібраних у Київській області, мали різне граничне значення критичної температури росту (табл. 3.4.1).

Таке явище може пояснюватись тим, що потреби у температурі можуть змінюватись при зміні інших умов, наприклад живильного субстрату. Втім, як відомо, температурні оптимуми часто, хоча і не завжди, пов'язані з умовами навколишнього середовища в районі походження ізоляту (Vidal et al., 1997; Filotas & Hajek, 2007).

Наприклад, у дослідженнях впливу температурного фактору на ріст штаму *X. hypoxylon*, виділеного зі зразка зібраного в місті Дакка (Бангладеш), оптимальним діапазоном температур виявся 30–35 °С (Ahmed & Jahan, 2018). У нашому дослідженні штами *X. hypoxylon* були єдиними, для яких не було зафіксовано здатності вегетативного міцелію до відновлення росту після впливу температур 36±0,1 °С та вище. Можна припустити, що така різниця пов'язана з географічним походженням, адже Дакка розташовується у зоні тропічного клімату з середньорічною температурою 25 °С. Для іншого представника роду, що зростає у субекваторіальному кліматі – *X. papyrifera* (Link) Fr., оптимальною для росту вегетативного міцелію виявилась температура 30 °С, а при 35 °С ріст пригнічувався (Castillo et al., 2004).

Згідно з літературними даними, такі відмінності можуть бути пов'язані з мікрокліматичними умовами біотопу, де були зібрані зразки, з яких було ізольовано культури (Kerry, 1990; Sterflinger et al., 2012). Це було підтверджено на прикладі штамів видів роду *Ganoderma* з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК), які проявляли різну стійкість щодо підвищених температур у залежності від географічного походження (Круподьорова, 2009). Оскільки гриби пристосовуються до умов навколишнього середовища, виявляючи ознаки відповідно до характеристик біотопу, для підтримки їхньої оптимальної життєдіяльності та біосинтетичної активності *in vitro* необхідні певні температурні параметри, характерні для їх природного місцезростання. Тому температурні межі росту є важливими фізіологічними характеристиками різних штамів, які необхідно досліджувати для реалізації процесу культивування.

Отже, дослідження життєздатності штамів видів роду *Xylaria* в умовах високих температур виявило видові та штамові особливості у їх пристосованості до впливу високих температур. Відрізнялись як максимальна критична температура, після впливу якої міцелій втрачав життєздатність, так і доба, на яку фіксувалось відновлення росту вегетативного міцелію при збереженні ним життєздатності. Більшість штамів (85,71%) відновлювали ріст після інкубації за температури

36±0,1 °C, зі зростанням температури їх число зменшувалось. Менше половини штамів (42,86%) зберігало життєздатність після впливу температури 38±0,1 °C. Температура 40±0,1 °C була критичною для всіх штамів, окрім *X. ellisii* IBK 2724.

РОЗДІЛ 4

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Молекулярні методи у біології є цінним і незамінним інструментом для ідентифікації таксонів, для вивчення біорізноманіття угруповань та еволюції грибів. Філогенетичний аналіз на основі локусів ядерної рибосомальної ДНК є ключовими у розв'язанні питань стосовно видових комплексів та для класифікації анаморфних грибів. Однак, незважаючи на стрімке зростання кількості даних про нуклеотидні послідовності різних локусів ядрДНК, молекулярно-філогенетична модель роду *Xylaria* лишається суперечливою, маючи численні нерозв'язані вузли та комплекси видів (Peršoh et al., 2009; Fournier et al., 2011; Stadler et al., 2020). До того ж, будь-які класифікаційні системи лишаються суб'єктивними і залежать щонайменше від вибору таксонів, включених до аналізу, що призводить до різних таксономічних інтерпретацій.

Значна морфологічна пластичність в межах роду *Xylaria*, потребує комплексного підходу до вивчення біологічних особливостей його представників. Для філогенетичного аналізу грибів цього роду, як і представників інших родів, найчастіше використовувались гени ядерної рибосомальної ДНК.

Внутрішня транскрибована спейсерна ділянка (ITS) ядерної рибосомальної ДНК широко залучена для молекулярної ідентифікації грибів завдяки високому ступеню міжвидової мінливості, консервативним сайтам праймерів та мультикопійності в геномі (Schoch et al., 2012; Blaalid et al., 2013). Протягом останніх десятиліть ITS активно використовується мікологами як у систематиці, так і в екологічних дослідженнях грибів, що призвело до накопичення у міжнародних базах даних значного числа нуклеотидних послідовностей цього локусу. Втім деякі науковці ставлять під сумнів валідність таксономічної ідентифікації грибів на основі використання даних ITS без підкріплення відомостями про інші локуси ДНК. Це пов'язано з внутрішньогеномною мінливістю паралогів ITS. Наприклад, нещодавні

молекулярно-генетичні дослідження виявили, що для виду *X. hypoxylon* існує щонайменше 13 копій ITS у одному геномі, в деяких випадках між ними спостерігалися різкі відмінності (ідентичність нижче 97%) (Stadler et al., 2020). Хоча ITS-регіон є універсальним у таксономії грибів, для деяких таксонів, у тому числі в межах роду *Xylaria*, необхідним залишається залучення до аналізу додаткових маркерних послідовностей (Balajee et al. 2009).

У даному дослідженні ми використовували послідовності трьох ядерних локусів, а саме ITS-регіону та генів, що кодують β -тубулін (TUB2) та другу субодиницю ДНК-залежної РНК-полімерази (RPB2). Порівняння відомостей про ці гени дозволило нам детальніше встановити філогенетичні зв'язки досліджуваних штамів видів роду *Xylaria* з іншими видами даного роду. До філогенетичного аналізу були включені 10 штамів 6 видів роду *Xylaria*, вегетативний міцелій яких було виділено нами у чисту культуру зі стром, зібраних у різних географічних зонах України, а також споріднені види роду *Xylaria* різного географічного походження, які були описані у літературних джерелах, наведених у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Ізоляти видів роду *Xylaria*, використані у філогенетичному аналізі

Вид	Код зразка у колекціях	Країна походження	Код доступу до нуклеотидної послідовності в NCBI			Посилання
			ITS	TUB2	RPB2	
<i>X. longipes</i>	CBS 148.73	Нідерланди	AY909 013	KU684 204	KU684 280	(Peláez et al., 2008)
<i>X. longipes</i>	CBS 580.88	Німеччина	AY909 015	-	-	(Peláez et al., 2008)
<i>X. longipes</i>	CWU-МусAS13 78	Україна	AM993 137	-	-	(Peršoh et al., 2009)
<i>X. longipes</i>	CBS 147.73	Німеччина	AY909 017	-	-	(Peršoh et al., 2009)

<i>X. polymorpha</i>	MUCL 49884	Франція	KY610 408	KX271 280	KY624 288	(Wendt et al., 2018)
<i>X. polymorpha</i>	JDR 1012	США	GU322 460	GQ495 954	GQ848 343	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. corniformis</i>	DAOM 159095	-	MN219 591	-	-	(Ibrahim et al., 2020)
<i>X. corniformis</i>	DAOM 145381	-	MN219 588	-	-	(Ibrahim et al., 2020)
<i>X. digitata</i>	CWU-MyсAS24 38	Україна	GU322 456	GQ495 949	GQ848 338	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. digitata</i>	TW 07032019	-	MN846 335	MN917 775	-	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>X. digitata</i>	CBS 161.22	-	AY909 006	-	-	(Peláez et al., 2008)
<i>X. delitschii</i>	07_X2	Німеччина	HQ414 586	-	-	(Rönsch et al., 2010)
<i>X. ellisii</i>	DAOMC 252031	-	NR1729 72	-	MN216 186	(Ibrahim et al., 2020)
<i>X. feejeensis</i>	UOC MINNP MK 34	Шрі-Ланка	KR3488 64	-	-	(Fernando et al., 2017)
<i>X. hypoxylon</i>	CBS 122620	Швеція	KY610 407	KX271 279	KY624 231	(Wendt et al., 2018)
<i>X. hypoxylon</i>	HAST 152	Бельгія	GU300 096	GQ260 187	GQ844 812	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. hypoxylon</i>	CBS 86.72	-	AY909 011	-	-	(Peršoh et al., 2009)
<i>X. hypoxylon</i>	HAST 95082001	Тайвань	GU300 095	GQ487 703	GQ844 811	(Peršoh et al., 2009)
<i>X. oxyacanthae</i>	JDR 859	США	GU322 434	GQ495 927	GQ844 820	(Hsieh et al., 2010)

<i>X. oxyacantha</i>	FCATAS 906	Китай	MZ620 655	MZ695 790	MZ678 636	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. oxyacantha</i>	YMJ 1660	Франція	MF773 429	MF773 437	MF773 433	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. oxyacantha</i>	YMJ 1320	Німеччина	MF773 431	MF773 439	MF773 435	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. oxyacantha</i>	YMJ 1184	Німеччина	MF773 430	MF773 438	MF773 434	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. arbuscula</i>	CBS 126415	Німеччина	KY610 394	KX271 257	KY624 287	(Fournier et al., 2011)
<i>X. arbuscula</i>	HAST 89041211	Тайвань	GU300 090	GQ478 226	GQ844 805	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. carpophila</i>	FCATAS 917	Китай	MZ621 171	MZ695 801	MZ707 122	(Hsieh et al., 2010)
<i>X. vasconica</i>	MUCL 51697	США	FN6898 00	-	-	(Fournier et al., 2011)
<i>X. vasconica</i>	MUCL 51705	Франція	FN6898 04	-	-	(Fournier et al., 2011)
<i>X. vasconica</i>	BER 42 (TENN)	-	MF755 269	-	-	(Stadler et al., 2020)
<i>B. nummularia</i>	MUCL 51395	Франція	KY610 382	KX271 241	KY624 236	(Hsieh et al., 2010)

Примітки: CBS – Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; DAOM – Canadian National Mycological Herbarium; DAOMC – Canadian Collection of Fungal Cultures; FCATAS – Fungarium of Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; HAST – Herbarium, research Center for Biodiversity, Academia Sinica, Taipei; JDR – Herbarium of J.D. Rogers; MUCL – Université Catholique de Louvain; TENN – University of Tennessee Herbarium; UOC – University of Colombo, Department of Plant Science, Faculty of Science; YMJ – Herbarium of Yu-Min Ju; CWU – Гербарій Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна; «-» – інформація відсутня.

Філогенетичні дерева, побудовані за допомогою методів приєднання сусідів (Neighbour-Joining) і максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) на основі матриці, до якої були включені досліджені нами штами видів роду *Xylaria*, за топологією добре узгоджувались з тими, що наводяться для цього роду в сучасній літературі (Lee et al., 2000; Ju & Hsieh, 2007; Peláez et al., 2008; Hsieh et al., 2010). Сформовані клади характеризувались помірною та високою бутстреп-підтримкою, яка втім була вищою при використанні методу максимальної правдоподібності, тому філогенетичні дерева, побудовані за допомогою цього методу були відібрані нами як більш достовірні та наведені у цьому розділі.

На всіх варіантах філогенетичних дерев формувались стійкі клади, представлені окремими видами (рис. 4.1, 4.3, 4.4). За винятком штаму *X. vasconica* IBK 2728, який на дендрограмі з залученням секвенованих генів RPB2, потрапив у відокремлену кладу з *X. hypoxylon* HAST9508200 з помірною бутстреп-підтримкою (рис. 4.4). На жаль, у базах даних відсутні референтні послідовності інших штамів *X. vasconica*, секвеновані за цим геном, щоб залучити їх для порівняльного аналізу. Водночас побудовані нами дендрограми на основі двох інших локусів ДНК свідчили про відокремленість *X. vasconica* IBK 2728 від інших видів. Згідно дендрограми на основі ITS-регіону, штам *X. vasconica* IBK 2728 потрапляв у стійку кладу з іншими штамми цього виду із бутстреп-підтримкою 100 (рис. 4.1).

Загалом, видовий комплекс *X. hypoxylon* включає багато представників, а порівняння молекулярних даних на основі 5,8S/ITS рДНК виявило, що дані, опубліковані в GenBank для таксону *X. hypoxylon*, очевидно, відповідають багатьом різним видам (Peršoh et al., 2009). Згідно літературних даних, *X. vasconica* та *X. hypoxylon* є близькоспорідненими видами, які майже неможливо відрізнити на основі морфологічних ознак, через поліморфізм стром, подібність асків та спор (Fournier et al., 2011). Однак, на основі молекулярно-генетичних даних, а також деяких відмінностей, таких як поверхня екстостроматичної тканини та сезонність стадії анамофри, було виокремлено таксон *X. vasconica* (Fournier et al., 2011).

На побудованих нами філогенетичних деревах, штам *X. huroxylon* IBK 2725 потрапляв у стійкі вирізнені клади з надійними референтними послідовностями інших штамів цього виду, відібраними з літературних джерел (рис. 4.1, 4.3, 4.4; таб. 4.1).

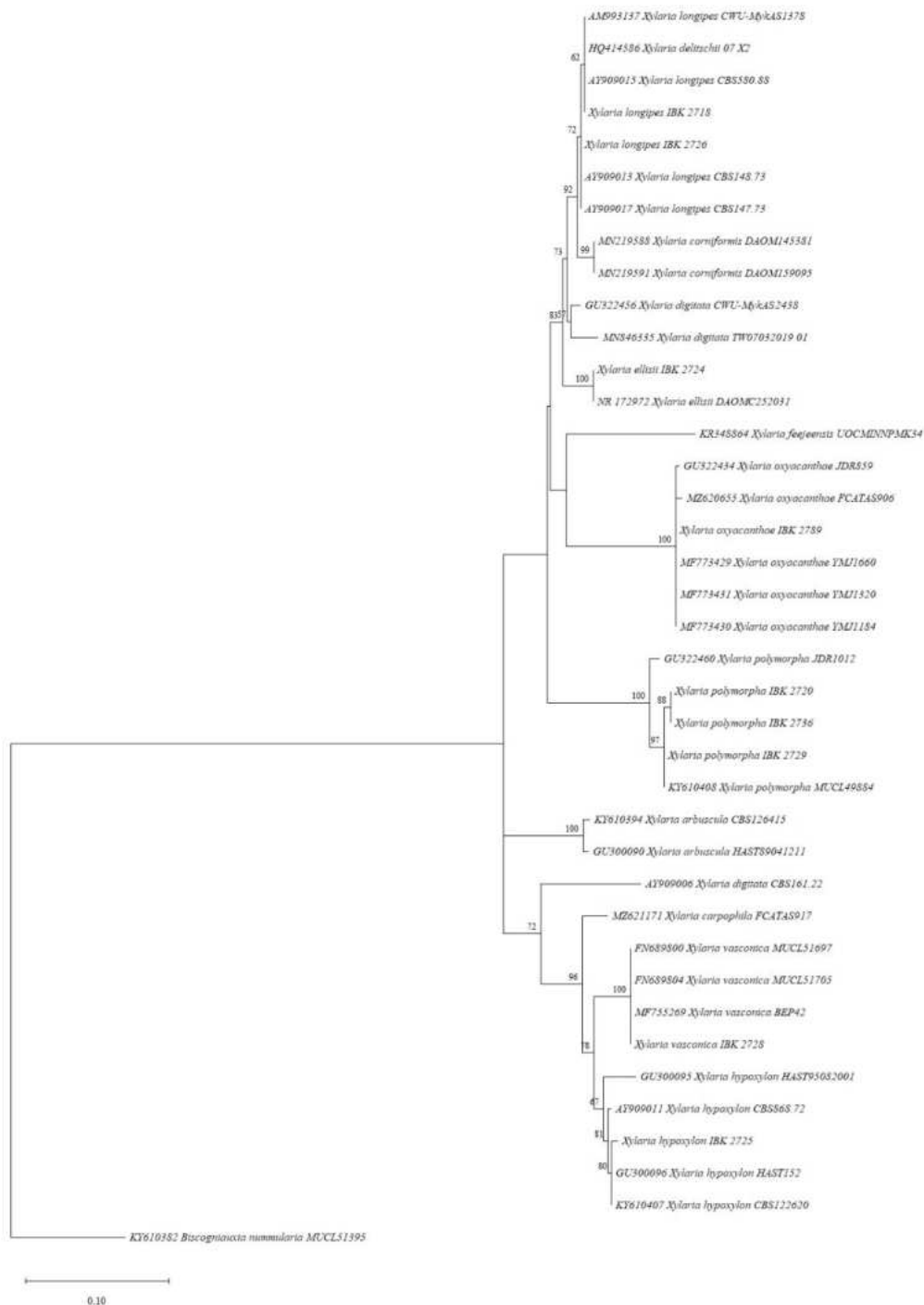


Рис. 4.1. Філогенетичне дерево, побудоване на основі нуклеотидних послідовностей ITS з використанням методу максимальної правдоподібності та 3-параметрової

моделі Тамури. Довжина гілок на дереві відповідає кількості замін. Для моделювання відмінностей у швидкості еволюції між сайтами було використано дискретний гамма-розподіл (5 категорій (+G, параметр = 0,4769)). До аналізу залучено 39 нуклеотидних послідовностей. До фінального набору даних було включено 453 позиції.

Іншим великим комплексом у межах роду є комплекс видів *X. polymorpha*. На всіх варіантах побудованих нами філогенетичних дерев штами *X. polymorpha* з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК 2720, 2729, 2736, 2737) формували стійкі клади разом із зазначеними вище ізолятами з інших колекцій (рис. 4.1, 4.3, 4.4). При цьому на всіх дендрограмах штама *X. polymorpha* JDR1012 потрапляв у виокремлену субкладу. Інші штами об'єднувались у помірно стійкі субклади, топологія яких дещо відрізнялась в залежності від локусу ДНК, за яким проводився аналіз.

До філогенетичного аналізу були залучені нуклеотидні послідовності *X. polymorpha* MUCL 49884 французького походження та *X. polymorpha* JDR1012 американського походження (табл. 4.1), оскільки вони були секвеновані за трьома локусами ДНК, які ми використали у цьому дослідженні. Вибір штамів декількох *X. polymorpha* із Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) був обґрунтований значною штамовою варіабельністю культурально-морфологічних ознак в межах цього виду. Так, штами *X. polymorpha* ІВК 2729 та 2736 відрізнялись від усіх інших штамів цього виду формою, текстурою та пігментацією міцеліальних колоній (Atamanchuk & Bisko, 2022).

Аналіз генетичної подібності за допомогою алгоритму «ClustalW» показав, що найбільш подібними виявились штами *X. polymorpha* ІВК 2720 та 2737 (99,16% ідентичності). В той час як штама *X. polymorpha* ІВК 2729 відрізнявся від трьох інших штамів у дослідженні найбільше – число нуклеотидних замін складало 20 на 956 п.о. (рис. 4.4).

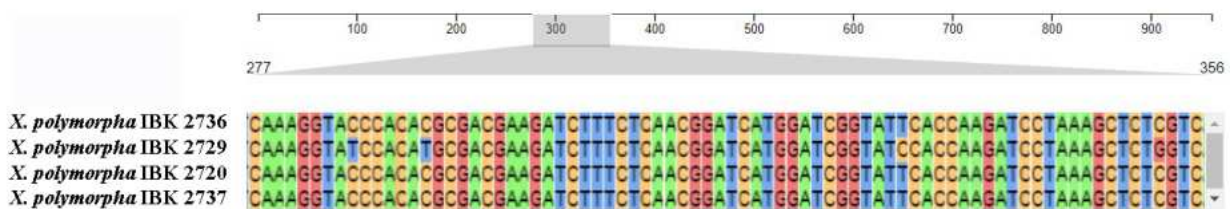


Рис. 4.2. Результат множинного вирівнювання нуклеотидних послідовностей RPB2 штамів *X. polymorpha* IBK 2720, 2729, 2736 та 2737.

Як відображено на дендрограмах (рис. 4.1, 4.3, 4.4), у результаті проведеного нами філогенетичного аналізу, штам IBK 2789 згрупувався у клади зі штамми *X. oxyacanthae* зі світових колекцій, які були виділені з плодів та насіння різних рослин. Цей штам був ізольований нами зі стром, зібраних на насінні *Carpinus betulus* L., та за морфологічними ознаками був визначений як *X. oxyacanthae*. Цей вид був вперше описаний на насінні *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) з Франції (Tulasne et al., 1861). На сьогодні відомо, що представники даного виду грибів мають широке коло рослин-господарів родів *Carpinus*, *Carya*, *Cornus*, *Crataegus* та *Prunus*. Примітно, що порівняння послідовностей ДНК, виділених зі штамів *X. oxyacanthae*, асоційованих з плодами та насінням різних рослин-господарів, виявило високу схожість за результатами попарних порівнянь: 99,67–100 % (Ju et al., 2018). Враховуючи, що перераховані роди рослин належать до чотирьох різних родин, подальші молекулярно-генетичні дослідження виду *X. oxyacanthae* можуть виявити певні ступені диференціації, що існують на внутрішньовидовому рівні.

Деякі дослідники відмежовують представників, які зростають на насінні *C. betulus*, надаючи їм статусу окремого виду – *Xylaria delitschii* Auersw. (Auerswald, 1868). За морфологічними ознаками описаний вид *X. delitschii* неможливо чітко відрізнити від *X. oxyacanthae*, підставою для їх розрізнення наводять приуроченість грибів виду *X. delitschii* виключно до насіння рослин роду *Carpinus*, в той час як строми *X. oxyacanthae* асоційовані із насінням широкого кола рослин (Rönsch et al., 2010). У нашому дослідженні зазначений ізолят *X. delitschii* на філогенетичному дереві згрупувався у кладу зі штамми виду *X. longipes* (рис. 4.1). Подібні результати

наводились також іншими авторами, які синонімізують таксони *X. oxyacanthae* та *X. delitschii* (Ju et al., 2018).

Варто зазначити, що серед філогенетичних дерев, побудованих нами за різними локусами ДНК, було виявлено деякі топологічні відмінності у розташуванні штаму *X. oxyacanthae* IBK 2789. Так, на дендрограмі із залученням послідовностей ITS, досліджуваний штам знаходився у чітко виокремленій кладі з бутстреп-підтримкою 100 між *X. oxyacanthae* YMJ1660 (штам, виділений із насіння *Prunus* sp.) та *X. oxyacanthae* FCATAS906 (штам, виділений із насіння *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid) (рис. 4.1). До цього аналізу було також включено нуклеотидну послідовність ITS із бази даних GenBank, депоновану як *X. delitschii* (код доступу HQ414586). Цей ізолят, як наведено у роботі Рьонша зі співавторами, після порівняльного аналізу на основі множинного вирівнювання за допомогою «ClustalW» без постобробки, відрізнявся від *X. oxyacanthae* на 62 позиції із 524, що відповідало збігу послідовностей на 88,2 % (Rönsch et al., 2010).

Філогенетичне дерево, побудоване нами на основі послідовностей генів, що кодують β -тубулін, відрізнялось топологією штамів *X. oxyacanthae* YMJ1660 та *X. oxyacanthae* FCATAS906, які сформували окрему субкладу. Розташування штаму *X. oxyacanthae* IBK 2789 виявилось найближчим до YMJ1320, виділеного з насіння *Cornus sanguinea* L. (рис. 4.3). У той же час, на філогенетичному дереві, побудованому на основі послідовностей генів, що кодують другу субодиницю РНК-полімерази II, штам *X. oxyacanthae* JDR859 (виділений із насіння *Crataegus monogyna* Jacq.) виокремився у субкладу з бутстреп-підтримкою 100 (рис. 4.4). Досліджуваний нами штам *X. oxyacanthae* IBK 2789 розташовувався поряд зі штамом *X. oxyacanthae* YMJ1184, який був виділений із насіння *C. betulus*, аналогічно до нашого ізоляту. Отже, на основі отриманих даних, можна стверджувати, що штам IBK 2789 виявився представником кладі «*X. oxyacanthae*», спорідненим зі всіма залученими до аналізу секвенованими за ITS, RPB2 та TUB2 штамми виду *X. oxyacanthae* зі світових колекцій.

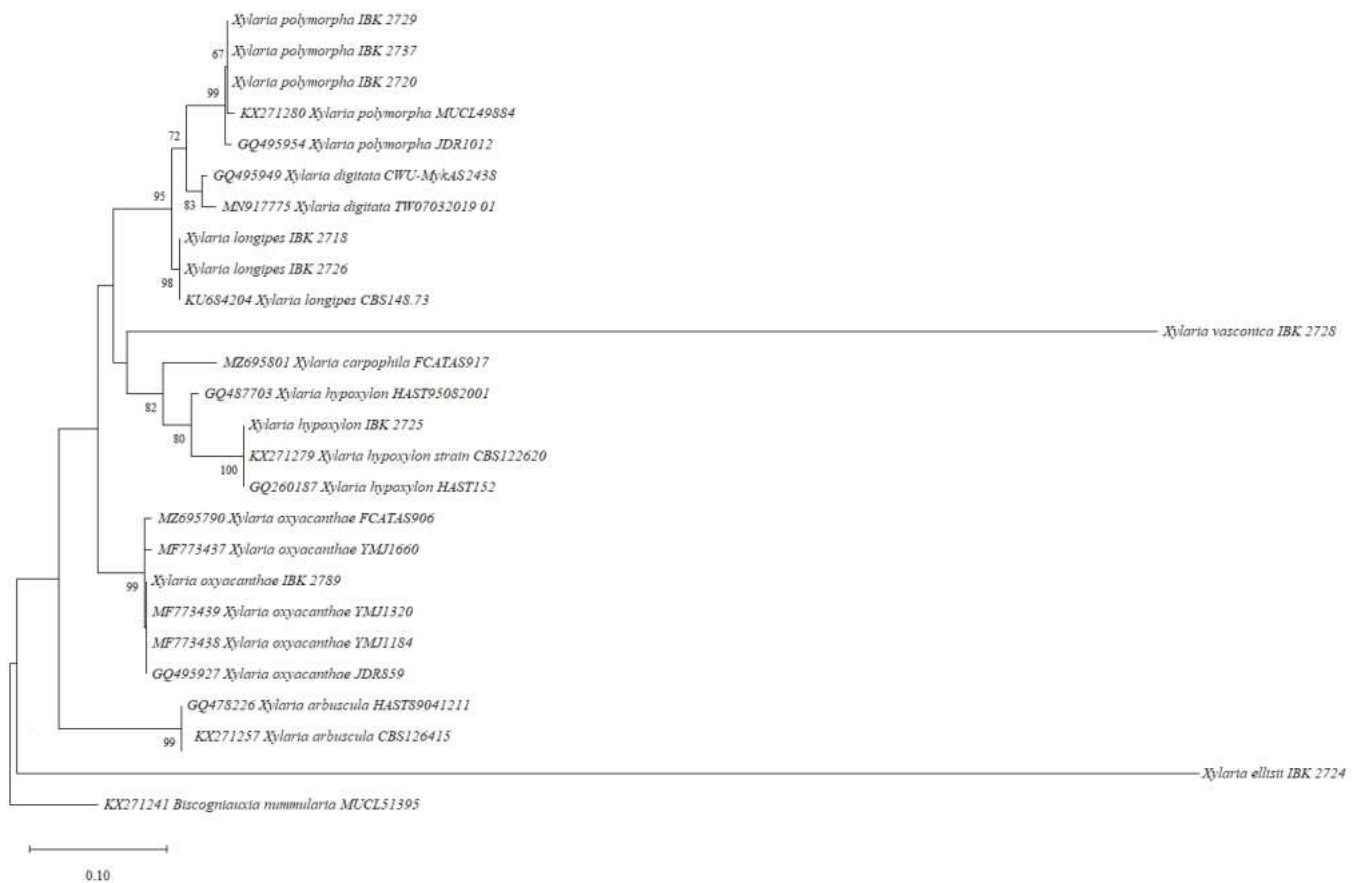


Рис. 4.3. Філогенетичне дерево, побудоване на основі нуклеотидних послідовностей генів, що кодують β -тубулін з використанням методу максимальної правдоподібності та 3-параметрової моделі Тамури. Довжина гілок на дереві відповідає кількості замін. Для моделювання відмінностей у швидкості еволюції між сайтами було використано дискретний гамма-розподіл (5 категорій (+G, параметр = 3,1347)). До аналізу залучено 27 нуклеотидних послідовностей. До фінального набору даних було включено 189 позицій.

При порівнянні одержаного нами сиквенсу ITS-регіону штаму IBK 2724 з референтними послідовностями з бази даних GenBank було виявлено 98% подібності з таксоном *X. ellisii*. *Xylaria ellisii* є відносно новим видом, що був описаний американськими мікологами на основі молекулярно-генетичних, морфологічних та біохімічних досліджень (Ibrahim et al., 2020). Даний таксон прирівнюється до *X. corniformis* var. *obovata*, втім видова приналежність *X. corniformis* є одним з невирішених видових комплексів у межах роду *Xylaria* (Rogers, 1983; Læssøe, 1987). Роджерс ще у 1983-му році зазначав, що назва

X. corniformis часто застосовується мікологами для опису морфологічно подібних видів та рекомендував розбити цей таксон на декілька видів (Rogers, 1983). У результаті проведеного нами філогенетичного аналізу було визначено, що референтні штами *X. corniformis* формували відокремлену стійку кладу, віддалену від кладу *X. ellisii*, до якої увійшов досліджуваний нами штам IBK 2724 разом зі штамом DAOMC 252031, який був виділений у культуру з типового зразка (рис. 4.1). На філогенетичних деревах, побудованих з використанням TUB2 та RPB2 штаму *X. ellisii* штам IBK 2724 відгалузився в окрему кладу (рис. 4.3, 4.4).

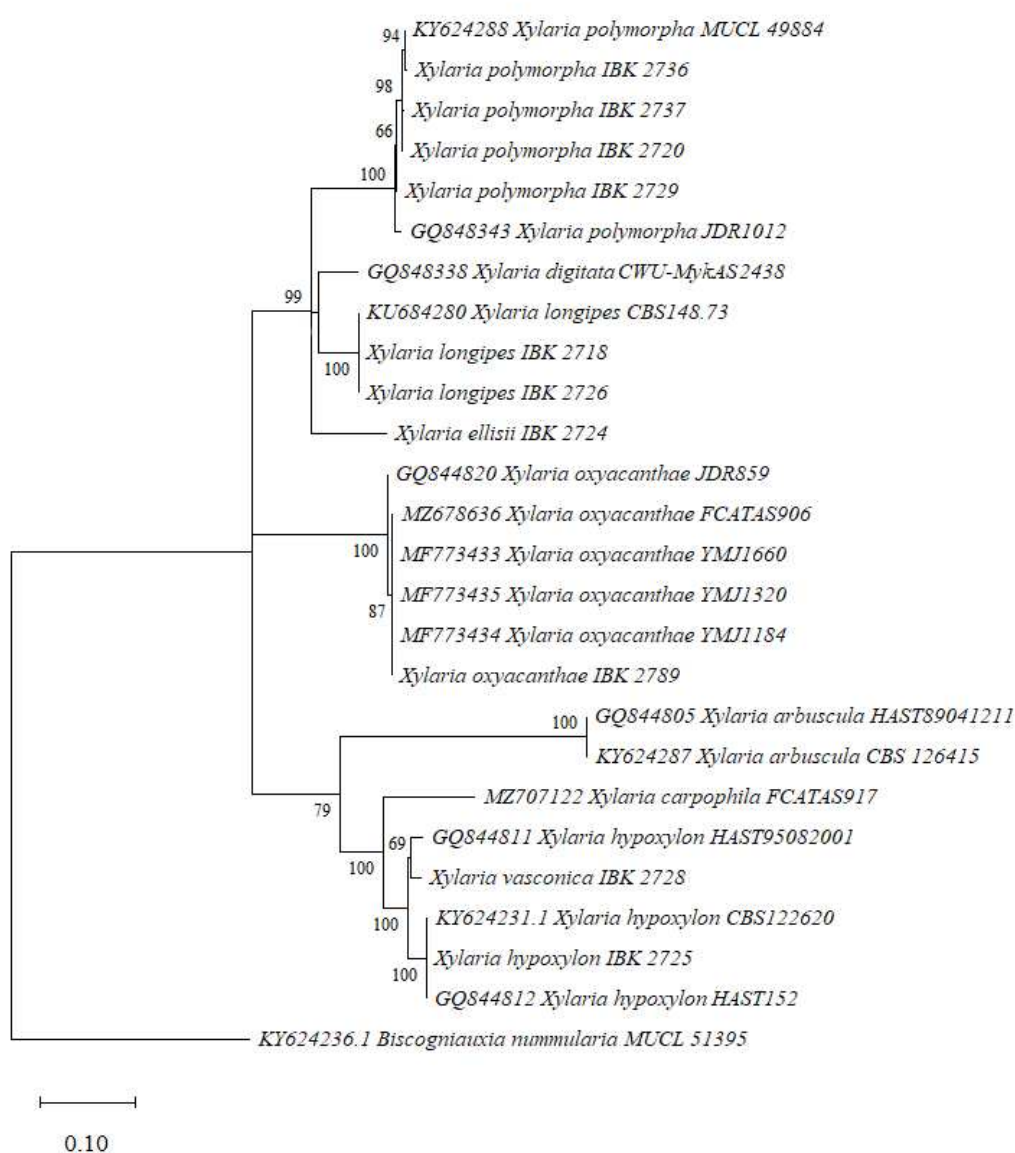


Рис. 4.4. Філогенетичне дерево, побудоване на основі нуклеотидних послідовностей генів, що кодують другу субодиницю РНК-полімерази II (RPB2) з

використанням методу максимальної правдоподібності та 3-параметрової моделі Тамури. Довжина гілок на дереві відповідає кількості замін. Для моделювання відмінностей у швидкості еволюції між сайтами було використано дискретний гамма-розподіл (5 категорій (+G, параметр = 4,1124)). До аналізу залучено 26 нуклеотидних послідовностей. До фінального набору даних було включено 799 позицій.

Досліджені нами штами виду *X. longipes* IBK 2718 та 2726 формували стійкі клади на всіх отриманих дендрограмах (рис. 4.1, 4.3, 4.4). Примітно, що штам *X. longipes* CWU-Мус AS 1378 походженням з України потрапив в окрему від досліджених нами штамів субкладу з помірною бустреп-підтримкою (рис. 4.1). На жаль, у базі даних GenBank депонована лише послідовність ITS зазначеного штаму, тому відсутня можливість уточнити його положення, порівнюючи за іншими локусами ДНК.

Отже, отримані нами результати молекулярно-філогенетичного аналізу на основі ITS-регіону та генів, що кодують β -тубулін (TUB2) і другу субодиницю РНК-полімерази II (RPB2) демонструють положення досліджених штамів видів роду *Xylaria* з Колекції культур шапинкових грибів (ІБК) відносно близьких видів роду. За комплексом фенотипових ознак досліджені штами показали морфологічну відповідність видам, підтвердженим молекулярними методами. На нашу думку, комбінація молекулярно-генетичних і морфологічних даних надає змогу ретельніше систематизувати таксони, а також оцінювати та порівнювати різні аспекти їх біології та географічне поширення.

РОЗДІЛ 5

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *XYLARIA* ЩОДО ІНШИХ ГРИБІВ

Міжвидова взаємодія грибів є динамічним явищем у екосистемах. У місцях перекриття екологічних ніш гриби, що взаємодіють, конкурують за доступне джерело живлення та заселення субстрату. Загалом таку конкуренцію можна розділити на 2 типи: первинне захоплення ресурсів, у випадку, якщо організм першим колонізує вільну територію, і вторинне захоплення ресурсів, коли організм захоплює територію у грибів, які вже колонізували субстрат (Boddy, 2000). Ефективність первинного захоплення ресурсів визначається в основному механізмами розселення, швидкими темпами росту і здатністю використовувати легкодоступні поживні речовини (R-стратегія). Ефективність захоплення вторинних ресурсів залежить від агресивних та/або захисних антагоністичних механізмів (C-стратегія). Результатом таких взаємодій може бути або заміщення, коли один міцелій повністю або частково витісняє інший, або неможливість витіснити конкурента, що призводить до зупинки росту обох при контакті, або ж повна сумісність видів (Watkinson et al., 2016). Ці типи антагоністичних взаємодій відбуваються або на відстані, або під час/після фізичного контакту між окремими гіфами або міцеліальними колоніями (Falconer et al., 2007). Тобто відбувається активне розпізнавання присутності конкурентних видів та ініціюється реакція, яка може відбуватись до або при контакті з міцелієм конкурентного виду. Такі реакції вимагають синтезу певних біологічно активних речовин, які якісно та кількісно змінюватимуться (активуватимуться) під час взаємодії з різними конкурентами (Dullah et al., 2021). Конкуруючі міцелії під час таких реакцій зазнають змін у морфології, накопиченні активних форм кисню та активності ферментів (Watkinson et al., 2016). Відомо також, що зміни, які відбуваються під час взаємодії грибів, можуть включати утворення позаклітинних вторинних метаболітів, зокрема фенольних та хінонових сполук (Gloer, 1995). Ряд таких метаболітів було виявлено

протягом останніх десятиліть при дослідженні взаємодії між міцелієм грибів-деструкторів деревини (Humphris et al., 2001; Wheatley, 2002; Peiris et al., 2008). До того ж було виявлено, що під час цих міцеліальних взаємодій індукується синтез деяких ферментів: фенолоксидаз, пероксидаз, лаказ тощо (Score et al., 1997; White & Boddy, 1992). Ці ферменти, у тому числі, беруть участь в утворенні активних форм кисню, які накопичуються у зонах взаємодії колоній та можуть мати токсичну дію, спричиняючи окислювальне пошкодження міцелію конкурентів (Tornberg & Olsson, 2002). Також серед позаклітинних ферментів, виявлених при дослідженні антагоністичних взаємодій грибів, були хітинази та глюканази, що гідролізують клітинні стінки, тобто безпосередньо руйнують міцелій конкурента (Lindahl & Finlay, 2006). Тому, окрім важливого екологічного значення, міжвидові взаємодії є предметом біотехнологічних досліджень, адже в їх процесі відбувається індукція синтезу ряду біологічно активних продуктів із залученням складних метаболічних шляхів.

Загалом, здатність грибів взаємодіяти з іншими грибами за допомогою будь-якого типу реакції закладена в геномі і може проявлятися за певних умов культивування. Такі взаємодії можна відтворити штучно, культивуючи два або більше організми разом, використовуючи тверді середовища. Така методика називається експериментом у подвійній культурі, сумісним культивуванням або кокультивуванням. Експериментальні пари між різними видами можуть бути створені для визначення відносної конкурентної здатності з метою дослідження шляхів розвитку угруповань, або для вивчення індукції метаболізму спеціально у зонах взаємодії організмів (переважно з метою виявлення нових біологічно активних сполук). Ці та інші аспекти посилюють науковий інтерес до методів кокультивування різних біологічних об'єктів.

Серед грибів широко дослідженим є антагонізм у подвійній культурі представників відділу Basidiomycota. В літературі є відомості про антагоністичну активність грибів родів *Ganoderma*, *Fomitopsis*, *Hericium*, *Inonotus*, *Pleurotus*, *Trametes*, у тому числі штамів з Колекції культур Інституту ботаніки (ІБК) (Badalyan

et al., 2004; Krupodorova et al., 2021, 2023). Проте для представників роду *Xylaria* дані щодо антагоністичної здатності наведені лише для ендоефітних видів (Hamzah et al., 2018; Kinamot & Monotilla, 2022), водночас інформація про сапротрофні види *Xylaria* обмежена даними про антагонізм цих грибів під час колонізації деревини (Campbell, 1933).

Метою нашого дослідження було визначити та порівняти антагоністичну активність штамів видів роду *Xylaria* щодо патогенних грибів. Антагоністичну здатність оцінювали за допомогою рейтингової шкали та розрахунку індексу антагонізму (AI) – кількісного показника, що позначає здатність досліджуваного штаму виду роду *Xylaria* конкурувати з тест-культурою. Як тест-культури було обрано гриби, що є поширеними збудниками інфекцій та/або псування сільськогосподарської продукції, проти яких є актуальним пошук нових засобів біоконтролю. *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* та *Mucor plumbeus* є видами-космополітами, які пов'язують зі псуванням різноманітної сільськогосподарської продукції, зокрема продуктів харчування та кормів (Koka et al., 2021; Pitt & Hocking, 2022; Chou et al., 2023). *Aspergillus niger* також є збудником різноманітних опортуністичних інфекцій, таких як кератит, отомікоз, назальний синусит, алергічний бронхолегеневий аспергільоз, інвазивний аспергільоз (Gautam et al., 2011; Gughani, 2003). Окрім ролі етіологічного агента мікозів, *Aspergillus niger* є об'єктом біотехнології як продуцент ферментів та глюкуронової кислоти (Fogarty, 1994). Інший представник цвілевих грибів – *Penicillium polonicum* є опортуністичним патогеном. Цей психротолерантний ксерофільний гриб спричиняє економічні збитки, вражаючи продовольчу продукцію, наприклад, крупи, сушене м'ясо, арахіс, цитрусові (Khalil et al., 2019). Окрім того, *P. polonicum* було виявлено в легеневому мікробіомі пацієнтів із хронічними запальними захворюваннями дихальних шляхів. Розвиток опортуністичної інфекції пов'язують зі зниженням ефективності імунної системи (Rubio-Portillo et al., 2020).

Представники видового комплексу *Fusarium solani* є фітопатогенами багатьох сільськогосподарських культур (Coleman, 2016), а також можуть викликати

оніхомікози та системні інфекції у пацієнтів з ослабленим імунітетом (Lodato et al., 2006; Guilhermetti et al., 2007). *Candida albicans* є компонентою мікрофлори людини, проте водночас є найпоширенішим грибним патогеном, здатним викликати інфекції, що можуть призвести до тяжкого сепсису та септичного шоку, особливо у пацієнтів з імуносупресивною терапією (Kim & Sudbery, 2011; Kollef et al., 2012; Tong & Tang, 2017; Macias-Paz et al., 2023). *Trichoderma viride* було обрано як тест-культуру у зв'язку відомостями про високу метаболічну активність цього гриба та його широкого використання як агента біологічного контролю проти патогенів (включаючи деякі з перелічених), завдяки своїй здатності паразитувати на них (мікопаразитизм), серед інших механізмів дії (Rajendiran et al., 2010; Poveda, 2021; Yassin et al., 2021).

Отже, основною метою цього дослідження було оцінити антагоністичну активність штамів видів роду *Xylaria* щодо перелічених видів грибів.

Результати показали, що міжвидові міцеліальні взаємодії між досліджуваними грибами мали конкурентний характер, що зазвичай призводило або до зупинки росту (при безпосередньому контакті культур чи на відстані), або до повного чи часткового обростання тест-культур грибів штамми видів роду *Xylaria*.

Нами спостерігались усі типи взаємодій, описані у підрозділі 2.7 «Матеріалів і методів», за винятком підтипу C_{B2}, коли досліджений вид повністю обростав колонію тест-культури після формування зони інгібування між колоніями (табл. 5.1, рис. 5.1).

Таблиця 5.1

Антагоністична взаємодія між штамми видів роду *Xylaria* та тест-культурами
грибів

Вид	Штам	<i>A. niger</i>	<i>M. plumbeus</i>	<i>P. polonicum</i>	<i>F. solani</i>	<i>T. viride</i>	<i>C. albicans</i>	AI
<i>X. carpophila</i>	2788	B	C _{B1}	C _{B1}	B	D	C _{A1}	15,5
<i>X. ellisii</i>	2724	A	C _{A1}	A	A	A	C _{A1}	11
<i>X. hypoxylon</i>	2725	B	C _{A1}	B	A	D	C _{A1}	12
	2735	B	C _{A1}	A	A	D	C _{A1}	11
	2734	B	C _{A1}	A	A	D	C	10,5
	2732	A	C _{A1}	B	A	D	C _{A1}	11
<i>X. longipes</i>	2715	B	C _{B1}	A	A	D	C _{A1}	11,5
	2716	C _{A1}	C _{A1}	A	C _{A1}	D	C _{A2}	16
	2717	C _{A1}	C _{B1}	A	A	D	C _{A1}	13
	2718	C _{A1}	C _{B1}	C _{A1}	C _{A1}	D	C _{A2}	19
	2722	B	C _{B1}	A	A	D	C _{A1}	11,5
	2726	A	C _{A2}	C _{A1}	C _{A1}	D	C _{A2}	17
	2730	A	C _{B1}	A	A	D	C _{A1}	9,5
	2733	C _{A1}	C _{B1}	C _{A1}	B	D	C _{A1}	16,5
	2738	A	C _{B1}	C _{A1}	C _{A1}	D	C _{A1}	15,5
	2739	B	B	C _{A1}	C _{A1}	D	C _{A1}	14,5
<i>X. oxyacanthae</i>	2789	A	A	A	A	D	C _{A1}	7,5
<i>X. polymorpha</i>	2382	B	C _{A2}	C _{B1}	C _{A1}	A	C	18
	2430	B	C _{B1}	C _{A1}	C _{A1}	A	C _{A2}	18,5
	2719	B	C _{A2}	B	C _{A1}	A	C	16
	2720	C _{A1}	C _{A2}	C _{A1}	C _{A2}	A	C	20
	2721	C _{B1}	C _{B1}	C _{A1}	C _{A1}	D	C	18
	2723	C _{A1}	C _{A2}	B	C _{A1}	A	C	17,5
	2727	C _{A1}	C _{A1}	B	C _{A1}	D	C	15,5
	2729	B	C _{A1}	B	C _{A1}	D	C	14
	2736	C _{A1}	C _{A2}	C _{A1}	C _{A1}	A	C _{A1}	19,5
	2737	B	C _{A2}	B	C _{A1}	D	C _{A2}	16,5
<i>X. vasconica</i>	2728	A	C _{A1}	A	A	D	C _{A1}	10

Примітки: відповідно до класифікації типів взаємодій, яку ми використовуємо у даній роботі, кожен з представлених типів реакцій оцінювався за бальною шкалою, де тип А=1 бал; тип В=2 бали; тип С=3 бали; підтип С_{А1}=3,5 балів; підтип С_{В1}=4 бали; підтип С_{А2}=4,5 балів; підтип С_{В2}=5 балів; тип D=0 балів. Антагоністичний індекс (AI) вираховувався на основі частоти, з якою траплявся кожен тип та підтип реакції.

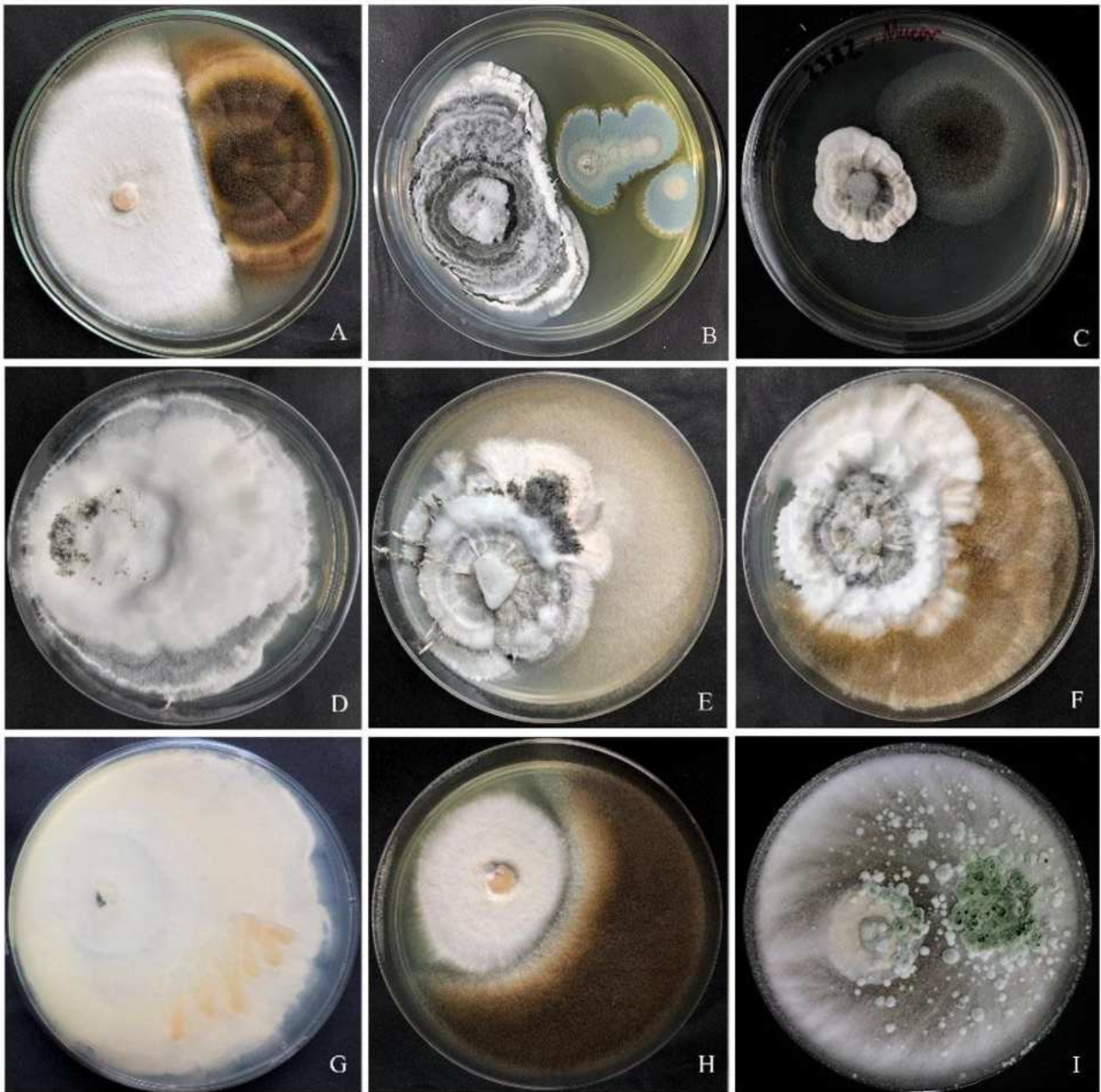


Рис. 5.1. Антагоністична взаємодія між колоніями тест-культур та колоніями штамів видів роду *Xylaria* на 20-ту добу культивування (якщо не зазначено інакше) на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – зупинка росту при безпосередньому контакті колоній *X. longipes* IBK 2726 та *A. niger* (тип А); В – зона інгібування після зупинки росту *X. polymorpha* IBK 2723 та *P. polonicum* (тип В); С – зупинка росту *X. polymorpha* IBK 2382 та *M. plumbeus* (на 7-му добу ко-культивування); F – подальше обростання колонії тест-культури дослідженим видом на 20-ту добу культивування (підтип С_{A2}); D та G – обростання колонії *C. albicans* штамом

X. polymorpha IBK 2723, поверхня колонії та реверзум, відповідно (тип С); Е – часткове обростання колонії *F. solani* штамом *X. polymorpha* IBK 2382 після зупинки росту при контакті (підтип С_{А1}); Н – часткове обростання колонії *M. plumbeus* штамом *X. longipes* IBK 2733 після зупинки росту на відстані та утворення зони інгібування (підтип С_{В1}); І – обростання досліджуваного виду *X. hypoxylon* IBK 2732 тест-культурою *T. viride* (тип D). Примітка: на всіх фотографіях колонія тест-культури розташована праворуч, колонія досліджуваного штаму виду роду *Xylaria* – ліворуч.

Загалом найчастіше відмічалось обростання тест-культур грибів колоніями штамів видів роду *Xylaria* (тип С та підтипи С_{А1}, С_{А2}, С_{В1}), відсоток яких серед усіх досліджених взаємодій складав 53,7%. При цьому переважав підтип С_{А1}, коли досліджений вид частково обростав колонію тест культури, а зупинка росту тест-культури відбувалась при контакті з дослідженим видом (32,72%) (рис.5.2).

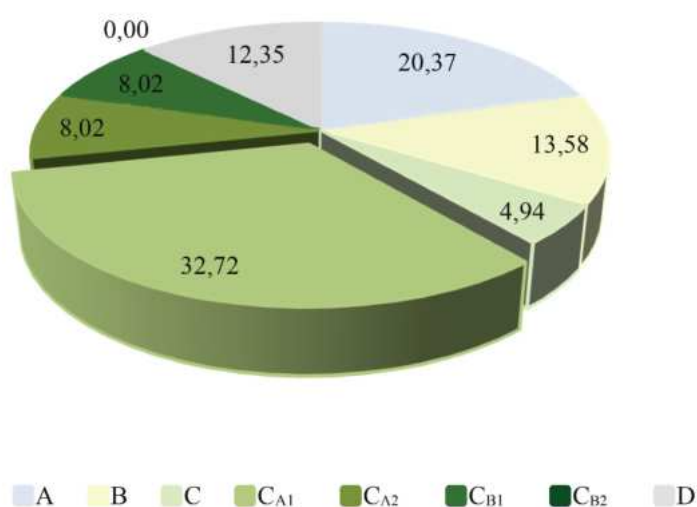


Рис. 5.2. Відсотковий розподіл типів взаємодій між досліджуваними штамми видів роду *Xylaria* та тест-культурами. Типи реакцій (А, В, С, D) та їх підтипи (С_{А1}, С_{А2}, С_{В1}, С_{В2}) описані детально у Розділі 2 «Матеріали і методи» (підрозділ 2.6). Окремими кольорами на діаграмі позначені типи взаємодій, зростання насиченості забарвлення вказує на зростання індексу антагонізму згідно зі шкалою, наведеною у «Матеріалах і методах».

Ці результати свідчать про ефективність досліджених штамів видів *Xylaria* проти тест-культур грибів за рахунок контактного антагонізму. Детальніший опис антагоністичних взаємодій грибів у подвійних культурах наведено нижче.

5.1. Взаємодія з *Fusarium solani*

Усі штами *X. polymorpha*, окрім ІВК 2720, частково нарастали на колонії *F. solani* (підтип С_{A1}), тоді як штам ІВК 2720 обростав їх повністю (підтип С_{A2}). Частина штамів *X. longipes* також взаємодіяли з *F. solani* за типом С_{A1}, тоді як інша частина штамів зупиняли ріст до (тип В) або при контакті (тип А) з колонією *F. solani*. За типом А з *F. solani* також взаємодіяли всі штами *X. hypoxylon*, *X. ellisii*, *X. vasconica*, *X. oxyacanthae* (табл. 5.1). Деякі з цих взаємодій супроводжувались змінами у морфології колоній штамів видів *Xylaria*. Найбільш вираженим було формування великої кількості повітряних гіф (рис 5.1.1 В). Крім того, взаємодія всіх штамів *X. polymorpha* з *F. solani* призводила до зміни кольору реверзumu, що проявлялась у вигляді помаранчевої пігментації у місці контакту колоній або усієї колонії тест-культури (рис. 5.1.1 С). Серед штамів інших досліджених видів, лише для *X. longipes* ІВК 2738 було відмічено таку пігментацію у зоні взаємодії культур (рис. 5.7.2 Н).

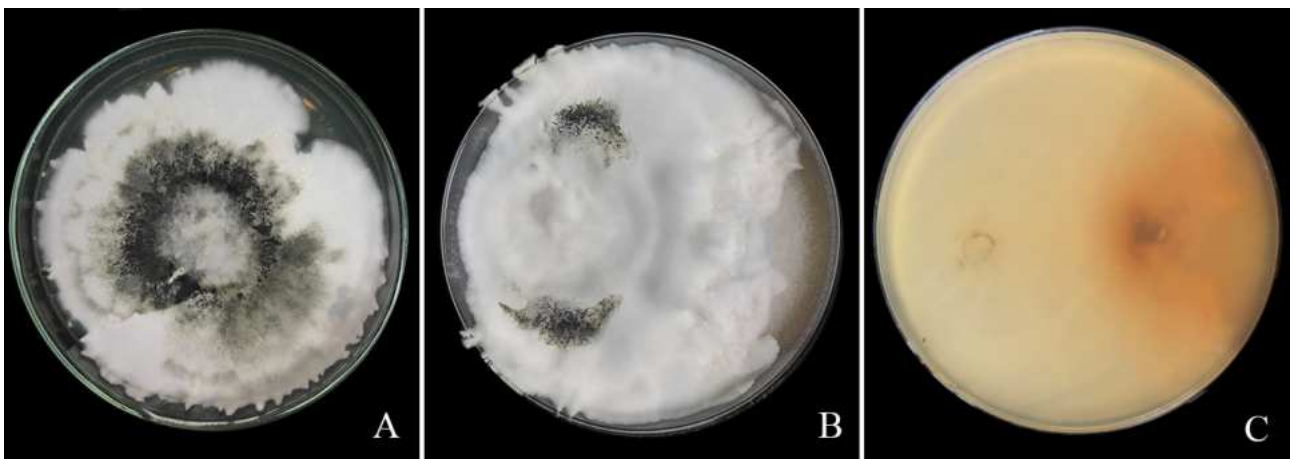


Рис. 5.1.1. Морфологічні зміни міцеліальних колоній *X. polymorpha* ІВК 2720 та *F. solani* при сумісному культивуванні на 20-ту добу на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – монокультура *X. polymorpha* ІВК 2720; В – утворення

значної кількості повітряного міцелію колонією *X. polymorpha* ІВК 2720 при обростанні тест-культури; С – зміна забарвлення реверзumu колонії *F. solani*.

Подібну пігментацію спостерігали інші дослідники в експериментах щодо антагоністичної активності грибів ендofітів, наприклад, штаму *Xylaria* sp., виділеного з мангрового дерева *Rhizophora mucronata* Lam. Автори зазначили, що розвиток міцелію *F. solani* в чашках Петрі з подвійною культурою значно пригнічувався міцеліальною культурою *Xylaria* sp. (відсоток пригнічення І% – 65,11%). При цьому спостерігалась пігментація «ржавого» відтінку на перетині колоній (Hamzah et al., 2018). Згідно з літературними даними, вторинні метаболіти деяких грибів можуть інгібувати або стимулювати ріст інших грибів, при цьому на перетині їх міцеліальних колоній утворюються так звані «зони конфронтації» або «бар'єрні зони», які морфологічно відрізняються від монокультур. Наявність пігментації у таких зонах вказує на значну метаболічну активність, що потенційно може бути використано для пошуку нових біологічно активних сполук з антифунгальною дією (Peiris et al., 2008; Vohni et al., 2013).

5.2. Взаємодія з *Penicillium polonicum*

Половина штамів *X. polymorpha* та штамів *X. longipes* частково наростали на колонії *P. polonicum* за підтипом С_{А1}. Інша половина штамів *X. longipes* зупиняла ріст при контакті з колонією тест-культури, а штамів *X. polymorpha* – на відстані з тест-культурою, формуючи зону інгібування. Зона інгібування на відстані утворювалась також при взаємодії з колонією *P. polonicum* штамів *X. hypoxylon* ІВК 2725 та ІВК 2732, та з подальшим наростанням на колонію тест-культури штамів *X. carpophila* ІВК 2788 та *X. polymorpha* ІВК 2382 (таб. 5.1). Примітно, що при ко-культивуванні зі штамми *X. polymorpha*, спостерігалась жовта пігментація середовища навколо колонії *P. polonicum*. (рис. 5.1 В, 5.2.1 В, С).



Рис. 5.2.1. Морфологічні зміни міцеліальних колоній *X. polymorpha* ІВК 2382 та *P. polonicum* при сумісному культивуванні на 20-ту добу на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °С: А – монокультура *X. polymorpha* ІВК 2382; В – пігментація живильного середовища навколо колонії *P. polonicum* при ко-культивуванні; С – пігментована зона контакту міцеліальних колоній (реверзум чашки Петрі).

Сумісне культивування зі штамми інших видів не призводило до такої вираженої зміни забарвлення середовища, за винятком незначного потемніння (рис. 5.2.2).

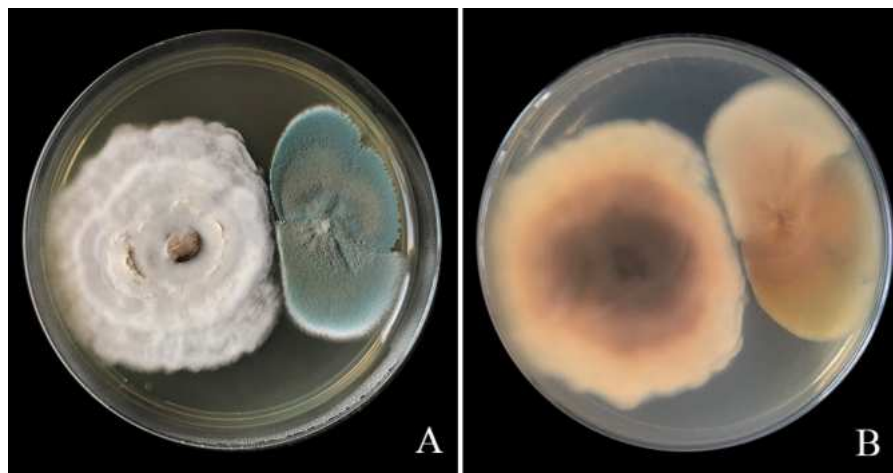


Рис. 5.2.2. Антагоністична взаємодія *X. oxycanthae* ІВК 2789 та *P. polonicum* на 20-ту добу ко-культивування на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °С: А – зупинка росту при міцеліальному контакті колоній; В – реверзум чашки Петрі.

Згідно з літературними даними, пігментація середовища може бути спричинена продукуванням видами роду *Penicillium* вторинних метаболітів, які

забарвлюють середовище або проявляються у вигляді краплин ексудату. Багато видів роду *Penicillium* продукують кислоти як вторинні або надлишкові первинні метаболіти, що може візуалізуватися у вигляді жовтого ореолу навколо колонії (Frisvad et al., 2008). Окрім того, відомо, що *Penicillium* spp. здатні продукувати пігменти (Samson & Pitt, 2003).

5.3. Взаємодія з *Aspergillus niger*

Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо іншого опортуністичного патогену – *A. niger* була подібною для штамів *X. polymorpha* та *X. longipes*. Половина штамів *X. polymorpha*, а також 6 з 10 штамів *X. longipes* зупиняли ріст при контакті або на відстані з колонією *A. niger*. Так само взаємодіяли штами видів *X. hypoxylon*, *X. vasconica*, *X. carpophila*, *X. oyuacanthae* та *X. ellisii*. Інша частина досліджених штамів частково обростали колонію *A. niger* після міцеліального контакту культур або після утворення зони інгібування (рис. 5.3.1). При сумісному культивуванні з усіма штамами *X. longipes*, *X. carpophila*, *X. oyuacanthae* та деякими штамами *X. polymorpha* спостерігалась зональність колоній *A. niger*, утворена за рахунок формування секторів із затримкою спороношення (рис. 5.7.2 F). Утворення гетероморфологічних секторів є загальним явищем, що спостерігається у багатьох цвілевих грибів. Однак варто зазначити, що згідно літературних даних, формування таких секторів у деяких штамів-продуцентів, призводило до зниження виходу вторинних метаболітів і ферментів (Chun et al., 2019). Окрім того, після двох тижнів ко-культивування з *A. niger* на колонії *X. longipes* IBK 2739 спостерігалась поява ексудату у вигляді прозорих жовтуватих крапель (рис. 5.7.2 D). Поява ексудату може свідчити як про підвищене продукування конститутивно присутніх сполук під час сумісного культивування грибів, так і про накопичення сполук, які не продукуються у монокультурі (Marmann et al., 2014).

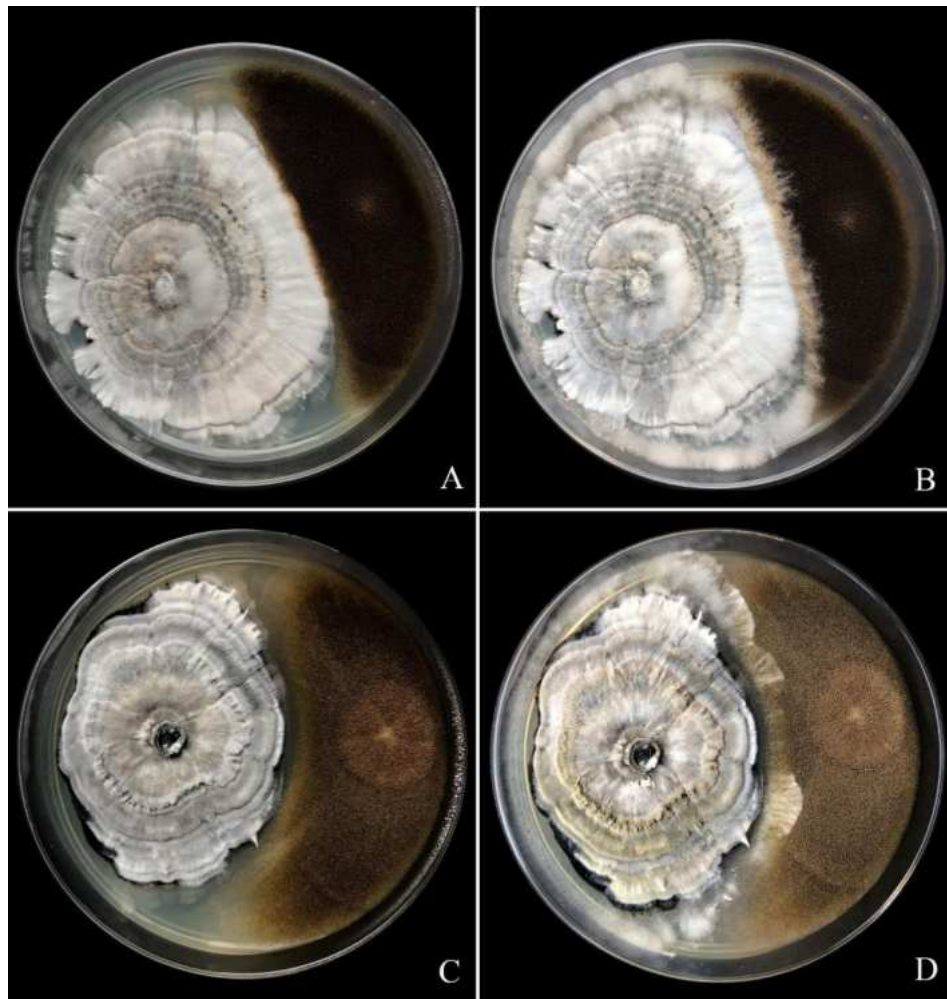


Рис. 5.3.1. Антагоністична активність *X. polymorpha* щодо *A. niger* при сумісному культивуванні на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – зупинка росту колонії тест-культури при контакті з міцелієм штаму IBK 2736 на 14-ту добу ко-культивування, В – часткове обростання колонії тест-культури міцелієм штаму IBK 2736 (підтип C_{A1}) на 20-ту добу ко-культивування, С – зупинка росту колонії тест-культури до контакту з міцелієм штаму IBK 2721 на 14-ту добу культивування, D – часткове обростання колонії тест-культури міцелієм штаму IBK 2721 (підтип C_{B1}) на 20-ту добу культивування. Примітка: на всіх фотографіях колонія тест-культури розташована праворуч, колонія досліджуваного штаму виду роду *Xylaria* – ліворуч.

5.4. Взаємодія з *Mucor plumbeus*

Під час міжвидової взаємодії з *M. plumbeus* більшість штамів видів роду *Xylaria* виявили значну антагоністичну активність, частково або повністю обростаючи його колонії (рис. 5.4.1). Лише для двох штамів – *X. oxycanthae* IBK

2789 та *X. longipes* IBK 2739 при взаємодії з *M. plumbeus* спостерігалась зупинка росту (таб. 5.1). Взаємодія з останнім відбувалась на відстані, з формуванням зони інгібування. При цьому на поверхні колонії *X. longipes* IBK 2739 з'являлись краплини ексудату, а у колонії *M. plumbeus* спостерігалась затримка у спороношенні (рис. 5.7.2. I). Такий антагонізм між грибами без фізичного міцеліального контакту виникає внаслідок продукування ними летких та/або дифузних антифунгальних метаболітів, ферментів, токсинів або при зміні рН середовища (Watkinson et al., 2016).

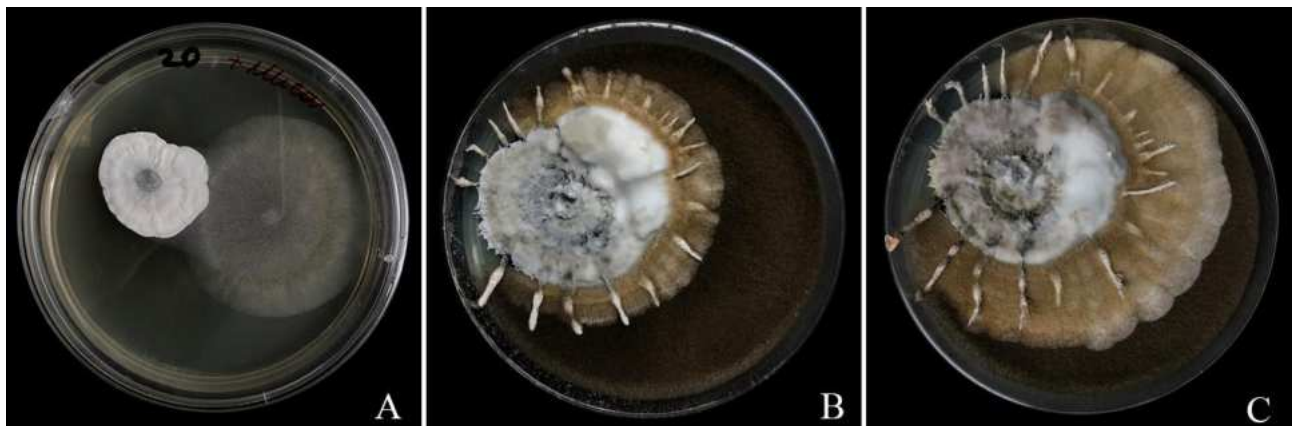


Рис. 5.4.1. Антагоністична активність *X. polymorpha* IBK 2729 проти *M. plumbeus* (тип взаємодії C_{A2}) при сумісному культивуванні на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – контакт міцеліальних колоній на 5-ту добу сумісного культивування, В – початок обростання колонії тест-культури штамом *X. polymorpha* IBK 2729 на 14-ту добу сумісного культивування, С – заміщення колонії *M. plumbeus* за рахунок обростання досліджуваним штамом на 20-ту добу сумісного культивування. Примітка: на всіх фотографіях колонія тест-культури розташована праворуч, колонія досліджуваного штаму виду роду *Xylaria* – ліворуч.

5.5. Взаємодія з *Trichoderma viride*

Trichoderma viride була єдиним організмом з тест-культур, який пригнічував ріст досліджуваних штамів видів роду *Xylaria* (тип взаємодії D). Міцелій *T. viride* повністю обростав колонії всіх досліджуваних штамів *X. longipes* (рис. 5.5.1). Така значна антагоністична активність *T. viride* може пояснюватись продукуванням різноманітних вторинних метаболітів та летких сполук, що пригнічують ріст та

розвиток інших організмів (Hermosa et al., 2014; Keswani et al., 2014). Види роду *Trichoderma* можуть колонізувати деревину, використовуючи неструктурні вуглеводи, такі як цукор і крохмаль, а потім обмежувати доступ для колонізації іншим грибам – деструкторам деревини (Badalyan et al., 2004). Варто зазначити, що при сумісному культивуванні зі штамми *X. longipes* IBK 2722 та IBK 2738 спороношення *T. viride* не спостерігалось взагалі, хоча міцелій тест-культури повністю обростав колонії досліджуваних штамів (рис. 5.7.2 E). Така відсутність, а також затримка спороношення *T. viride*, яка спостерігалась у місці контакту колоній досліджуваної і тест-культури (рис. 5.5.1 B), вказує на те, що *X. longipes* проявляє певну активність при ко-культивуванні з *T. viride*.

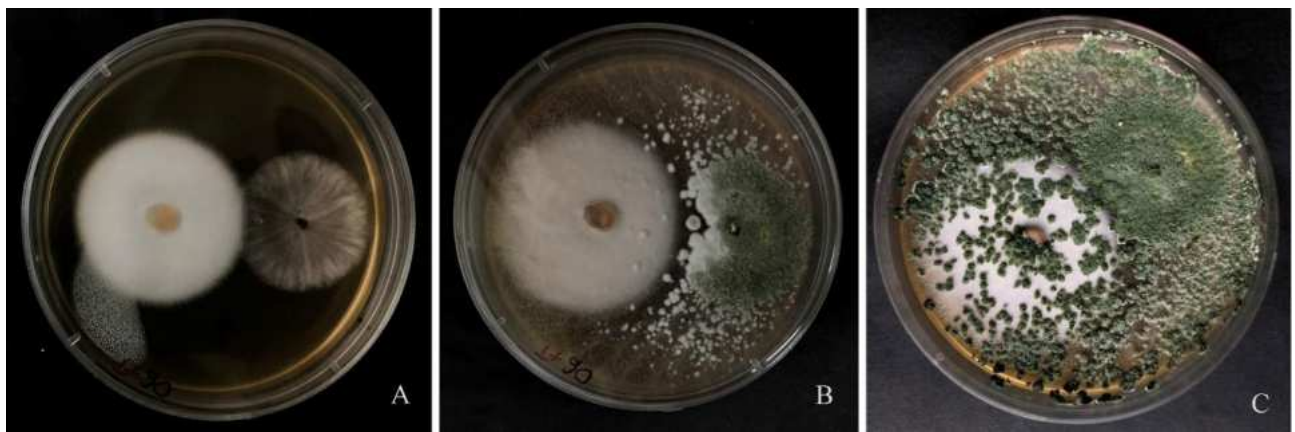


Рис. 5.5.1. Взаємодія *X. longipes* IBK 2717 (на фотографіях ліворуч) та *T. viride* (праворуч) у подвійній культурі на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – міцеліальний контакт колоній на 5-ту добу ко-культивування; В – затримка спороношення *T. viride* на межі колонії на 14-ту добу ко-культивування; С – обростання колонії *X. longipes* IBK 2717 міцелієм *T. viride* та утворення спороношення по всій поверхні на 20-ту добу ко-культивування.

Антагоністична активність була більш вираженою для штамів *X. polymorpha*, половина яких взаємодіяли з *T. viride* за типом А – зупинка росту при контакті (таб. 5.1). Цей тип взаємодії відмічали також при ко-культивуванні *T. viride* з *X. coniformis* IBK 2724. Окрім того, нами спостерігалась затримка росту колоній *T. viride* в напрямку до штамів *X. polymorpha* (рис. 5.5.2 А). На відміну від колоній штамів

інших видів, які на початкових етапах росли пропорційно у напрямку колоній тест-культур (рис. 5.5.1 А).



Рис. 5.5.2. Взаємодія *X. polymorpha* ІВК 2430 (на фотографіях у верхній частині чашки Петрі) та *T. viride* у подвійній культурі на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °С: А – нерівномірний ріст колонії *T. viride* із затримкою у напрямку до колонії *X. polymorpha* на 5-ту добу ко-культивування; В – часткове утворення зон інгібування між колоніями грибів на 14-ту добу ко-культивування; С – зупинка росту колоній при міцеліальному контакті на 20-ту добу ко-культивування.

З літературних даних відомо, що *T. viride* обмежує ріст деяких патогенів у подвійній культурі на агаризованому середовищі Чапека-Докса, включаючи *A. niger* (відсоток пригнічення 55%), *Fusarium* sp. (64%) і *Penicillium* sp. (54%). Така активність пояснюється швидким ростом, виділенням токсичних позаклітинних сполук, ферментів, що руйнують клітинну стінку (глюконази, ендохітинази та хітинази) (Rajendiran et al., 2010). У нашому дослідженні штами *X. polymorpha* та *X. ellisii* проявляли антагоністичну активність як щодо представників перерахованих родів, так і щодо *T. viride*. Це свідчить про значний антифунгальний потенціал зазначених штамів видів роду *Xylaria*.

5.6. Взаємодія з *Candida albicans*

Міцелій усіх штамів видів роду *Xylaria* в нашому дослідженні частково або повністю обростав колонії *C. albicans* при сумісному культивуванні, що свідчить про агресивність щодо цього патогену. При цьому для усіх штамів *X. polymorpha*,

окрім IBK 2723, було відмічено зміну морфології колоній, що проявлялась у значному збільшенні продукції повітряних гіф при наростанні на колонію тест-культури (рис. 5.1 D, 5.6.1 B, C). Подібна зміна морфології колоній досліджуваних видів спостерігалась також при взаємодії міцелію 7 з 10 штамів *X. polymorpha* з *M. plumbeus* (рис. 5.1 F) та взаємодії 4 з 10 штамів *X. polymorpha* з *F. solani* (рис. 5.1.1 B).

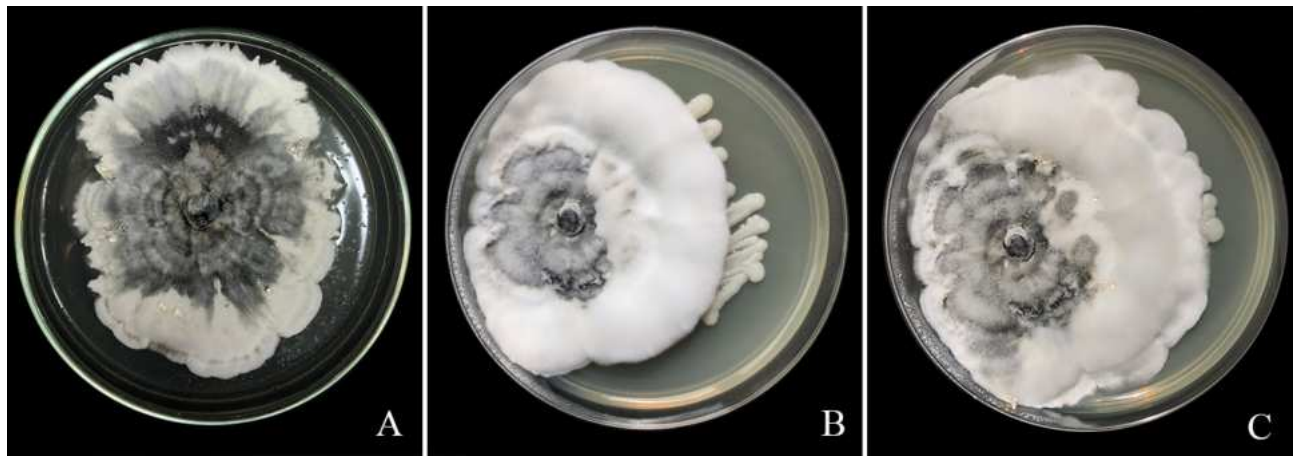


Рис. 5.6.1. Морфологічні зміни міцеліальних колоній *X. polymorpha* IBK 2721 при сумісному культивуванні з *C. albicans* на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – монокультура *X. polymorpha* IBK 2721 на 20-ту добу культивування; В – утворення повітряного міцелію колонією *X. polymorpha* IBK 2721 при обростанні тест-культури на 14-ту добу ко-культивування; С – повне обростання колонії *C. albicans* на 20-ту добу ко-культивування.

З літературних даних відомо лише про активність інших макроміцетів проти *C. albicans* у експериментах з подвійною культурою (Krupodogova et al., 2021). Дослідження щодо активності представників роду *Xylaria* зосереджені в основному на екстрактах їх плодових тіл. Наприклад, етанольний екстракт, отриманий з плодових тіл *X. polymorpha*, проявляв активність проти *C. albicans* у антимікробному тесті з дифузією в агарі (Nacioglu et al., 2011). Використовуючи той самий метод, колектив інших авторів дослідив дію етанольного екстракту *X. hypoxylon* проти *C. albicans* та виявив його антимікробну активність (Canli et al., 2016). Особливий інтерес становлять дослідження щодо антимікробної дії деяких

вторинних метаболітів, що продукуються видами роду *Xylaria*, як, наприклад, дослідження щодо двох циклічних пентапептидів з антибактеріальною та протигрибковою дією, в тому числі проти *C. albicans* (Xu et al., 2017).

Загалом, антагонізм, який проявляли штами видів роду *Xylaria* у нашому дослідженні, був агресивним, що проявлялось у обростанні ними поверхні більшості тест-культур грибів. Аналіз антагоністичних взаємодій дозволив виявити найбільш активні штами видів роду *Xylaria* з високим індексом антагонізму (AI). Так, найвищий індекс антагонізму (20 балів) по відношенню до всіх тест-культур грибів був зафіксований для штаму *X. polymorpha* IBK 2720 (табл. 5.1). Агресивність цього штаму проявилася у здатності рости поверх колоній 5 із 6 тест-культур. Винятком була взаємодія з *T. viride*, коли зупинка росту колоній відбувалась при контакті. Культура *X. polymorpha* IBK 2736 демонструвала дещо меншу агресивність з індексом антагонізму 19,5 балів. Найменший індекс антагонізму мав штам *X. oxyacanthae* IBK 2789 (7,5 балів). Взаємодія цього штаму з тест-культурами проявлялась в основному у зупинці росту при контакті колоній.

У таблиці 5.1. продемонстровано, що загалом штами видів *X. polymorpha* та *X. longipes* мали вищі індекси антагонізму, ніж штами інших видів у нашому дослідженні. Зважаючи на це, та на те, що ці види є близькоспорідненими та займають схожі екологічні ніші і кількість їх штамів у нашому дослідженні співпадає (по 10 штамів кожного виду), ми вирішили окремо порівняти типи взаємодій цих грибів з тест-культурами.

5.7. Порівняння антагоністичної активності штамів *X. polymorpha* та *X. longipes*

Аналіз показав, що штами *X. longipes* вдвічі частіше взаємодіяли з тест культурами за типом А, а також дещо частіше взаємодіяли за підтипами С_{А1} та С_{В1}. Проте кількість штамів *X. polymorpha*, які взаємодіяли з тест-культурами з утворенням зони інгібування, майже вдвічі перевищувала кількість таких штамів виду *X. longipes* (рис. 5.7.1). Крім того, штами *X. polymorpha* вдвічі частіше повністю

заростали колонії тест-культур після міцеліального контакту. При цьому 11,7% штамів *X. polymorpha* повністю заростали колонії *C. albicans* без зупинки росту (тип С), тоді як для штамів *X. longipes* такого типу реакції не відмічалось взагалі. Тип D спостерігався нами лише при взаємодії досліджуваних штамів з *T. viride*. Усі штами *X. longipes* та половина штамів *X. polymorpha* пригнічувалися тест-культурою *T. viride* за типом D, що становило 16,7% та 6,7% протестованих пар кожного виду, відповідно.

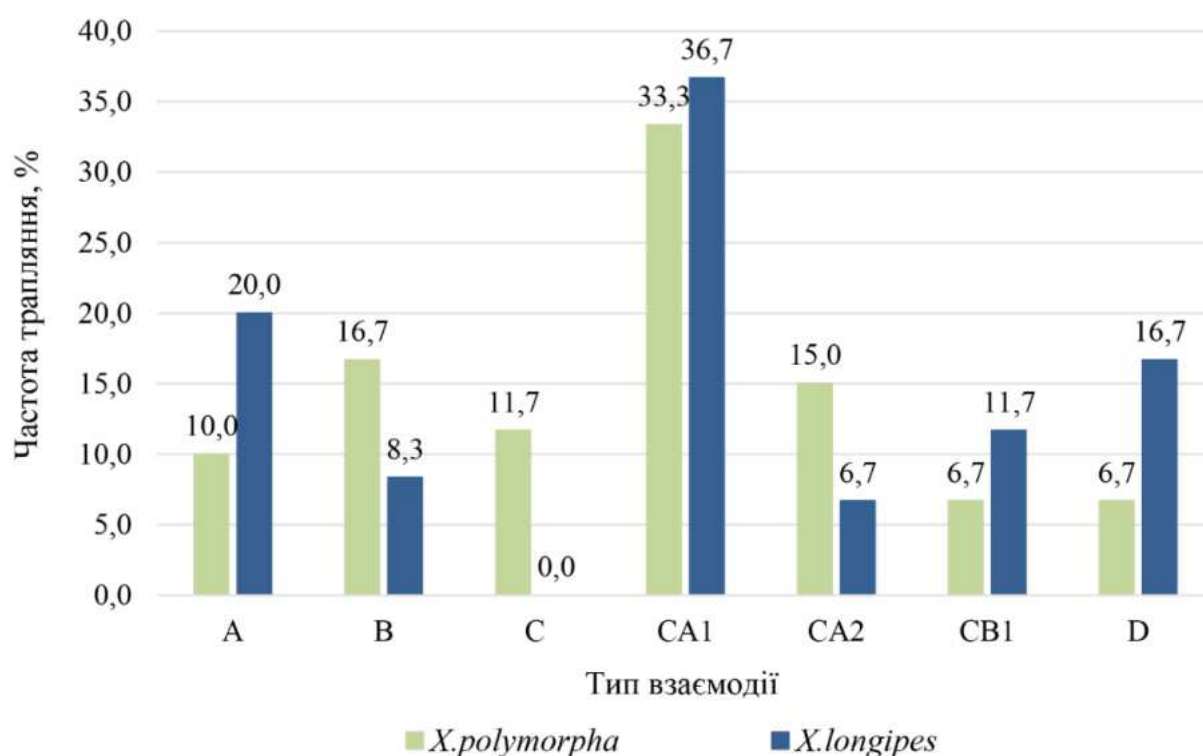


Рис. 5.7.1. Порівняння типів взаємодій досліджуваних штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes* з тест-культурами.

Окремо звертали увагу на морфологію колоній. Так, майже всі штами *X. polymorpha* утворювали стромі при сумісному культивуванні з *A. niger* та *P. polonicum*. Однак штам ІВК 2736 не утворював стром ні при сумісному культивуванні з цими тест-культурами, ні в подвійних культурах з *M. plumbeus*. З останнім лише половина штамів *X. polymorpha* (ІВК 2719, ІВК 2721, ІВК 2727, ІВК 2729, ІВК 2737) формували стромі. Водночас, серед штамів *X. longipes* лише штам ІВК 2738 утворював стромі при ко-культивуванні з *F. solani* (рис. 5.7.2 G). Слід

зазначити, що не було виявлено зв'язку між формуванням стром та конкретними типами міцеліальних взаємодій, утворення стром спостерігалось як під час взаємодій на відстані, так і під час різних типів заміщення колоній.

Серед інших морфологічних змін було відмічено утворення великої кількості повітряних гіф *X. polymorpha* при сумісному культивуванні з *M. plumbeus* та *C. albicans*, секторизацію колоній *A. niger* у подвійних культурах з *X. longipes*, а також дифузії пігментів, утворення ексудату та формування потовщених зон на перетині міцеліальних колоній (рис. 5.7.2). Враховуючи різноманітність типів реакцій та морфологічних змін, що спостерігались у дослідженні, можна припустити, що в них задіяні різноманітні антагоністичні механізми. Особливий інтерес становлять штами, які взаємодіяли з тест-культурами грибів на відстані, адже вони можуть бути потенційними продуцентами дифузних або летких біологічно активних сполук. Ці штами, що мають значну антагоністичну активність щодо *A. niger*, *M. plumbeus*, *C. albicans*, *P. polonicum* та *F. solani*, є перспективними для подальших досліджень з метою вивчення та виділення антифунгальних метаболітів.



Рис. 5.7.2. Зміни у морфології колоній при ко-культивуванні тест-культур та штамів видів роду *Xylaria* на 20-ту добу культивування на середовищі ГПДА за температури 26 ± 1 °C: А – пігментація середовища навколо колонії *P. polonicum* при ко-культивуванні з *X. polymorpha* IBK 2737; В – утворення повітряних гіф на межі колоній *X. polymorpha* IBK 2721 та *F. solani*; С – повітряний міцелій штаму *X. polymorpha* IBK 2719 при обростанні колонії *C. albicans*; D – ексудат на поверхні колонії штаму *X. longipes* IBK 2739 при ко-культивуванні з *A. niger*; Е – відсутність спороношення *T. viride* при ко-культивуванні з *X. longipes* IBK 2722; F – секторизація колонії *A. niger* при ко-культивуванні з *X. polymorpha* IBK 2430; G – утворення стром штамом *X. longipes* IBK 2738 при ко-культивуванні з *F. solani*; H –

пігментація реверзumu на межі взаємодії колоній *X. longipes* IBK 2738 та *F. solani*; I – затримка росту колонії *X. longipes* IBK 2739 та спороношення *M. plumbeus*. Примітка: на всіх фотографіях колонія тест-культури розташована праворуч, колонія досліджуваного штаму виду роду *Xylaria* – ліворуч.

Отже, проведене дослідження доповнює відомості про міжвидові взаємодії грибів. Метод подвійних культур, використаний у цій роботі, дозволив оцінити та порівняти антагоністичну здатність штамів видів роду *Xylaria* проти ряду тест-культур грибів, серед яких опортуністичні патогени та мікофіли. Інгібуюча активність досліджуваних штамів видів роду *Xylaria* полягала у пригніченні росту колоній тест-культур на відстані або при міцеліальному контакті, або заміщення колоній тест-культур шляхом часткового або повного обростання. Загалом встановлено переважання заміщення колоній *F. solani*, *M. plumbeus* і *C. albicans* колоніями штамів видів роду *Xylaria* (типи реакцій С та підтипи С_{A1}, С_{A2}, С_{B2}). Взаємодія на відстані відмічена при сумісному культивуванні деяких штамів *X. polymorpha* з *A. niger* та *P. polonicum*, тоді як штами *X. longipes* взаємодіяли з цими видами при міцеліальному контакті. Навпаки, тест-культура *M. plumbeus* після початкової зупинки росту на відстані частково обростала міцелієм штамів *X. longipes*, а штамів *X. polymorpha* – при контакті. *Trichoderma viride* єдина з тест-культур у дослідженні пригнічувала ріст міцелію досліджуваних штамів видів роду *Xylaria*. Всі штами *X. longipes*, *X. hypoxylon*, *X. vasconica*, *X. carpophila*, *X. oxyacanthae* та частина штамів *X. polymorpha* пригнічувались тест-культурою *T. viride*, яка повністю обростала їх колонії. Втім штами *X. polymorpha* IBK 2382, IBK 2430, IBK 2719, IBK 2720, IBK 2723 та *X. ellisii* IBK 2724 взаємодіяли з тест-культурою за типом А ріст обох колоній зупинявся при міцеліальному контакті і жоден з грибів не мав переваги над іншим.

Високий ступінь антагонізму штамів видів роду *Xylaria* щодо опортуністичних патогенів та мікофільного гриба *T. viride*, виявлений у нашому дослідженні, може свідчити про значний біопротекторний потенціал досліджуваних штамів. Тому доцільним є подальше поглиблення досліджень окремих штамів видів

роду *Xylaria*, особливо вторинних метаболітів цих штамів та наявності у них біологічної активності. Враховуючи, що досліджені нами штами видів роду *Xylaria* виявились антагоністами для патогенних організмів, перспективним є подальше дослідження їх антимікробних якостей, як основи для розробки нових агентів біологічного контролю патогенів.

Результати розділу висвітлені у науковій публікації (Atamanchuk et al., in press).

РОЗДІЛ 6

БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУР

6.1. Динаміка накопичення біомаси, ендо- та екзополісахаридів при глибинному культивуванні

На основі вивчених культурально-морфологічних особливостей та характеристик антагоністичної здатності міцеліальних колоній, нами були відібрані штами з найвищими значеннями індексів антагонізму та швидкості радіального росту для дослідження їх біосинтетичної активності. Такими виявились штами *X. polymorpha* ІВК 2720, ІВК 2736 та *X. longipes* ІВК 2718, ІВК 2726. При відборі цих штамів враховувались також певні морфологічні ознаки колоній, такі як щільність міцелію, наявність та інтенсивність пігментації, утворення стром та ексудату на поверхні.

Окрім того, одним з ключових критеріїв для відбору штамів-продуцентів є обсяг міцелію, утвореного під час культивування. Тому одним з важливих етапів роботи з культурами грибів є вивчення закономірностей динаміки накопичення міцеліальної біомаси. Враховуючи, що за умов глибинного культивування, як правило, відбувається більш швидке накопичення біомаси (Бисько и др., 1983), нами був обраний метод культивування міцелію з використанням лабораторної качалки. У нашому дослідженні були застосовані однакові параметри культивування, втім морфологія міцеліальних структур відрізнялась в залежності від штаму. Це може бути пов'язано зі співвідношенням між швидкістю росту та частотою галуження гіф (Righelato et al., 1968) або іншими біологічними особливостями окремих штамів.

На рисунку 6.1.1 зображено різницю у формі та розмірах агломератів штамів *X. polymorpha* та *X. longipes* у проведеному експерименті. Так, для штамів *X. longipes* характерним було утворення сферичних, дрібніших, порівняно зі штамами *X. polymorpha* міцеліальних колоній. Для штамів *X. polymorpha* характерним було формування сферичних (та подекуди кубічних) агломератів з

нитчастим ростом на поверхні (рис. 6.1.1. С, D). Розміри міцеліальних структур варіювали від 3 до 7 мм для штамів *X. longipes* та від 10 до 15 мм для штамів *X. polymorpha*. Загалом, формування міцеліальних агломератів за умов глибинного культивування обумовлено рядом факторів: кількістю та ступенем гомогенізації інокулюму, аерацією, складом та рН живильного середовища, частотою обертання (Michel et al., 1992; Pirt, 1966; Suijdam et al., 1982).

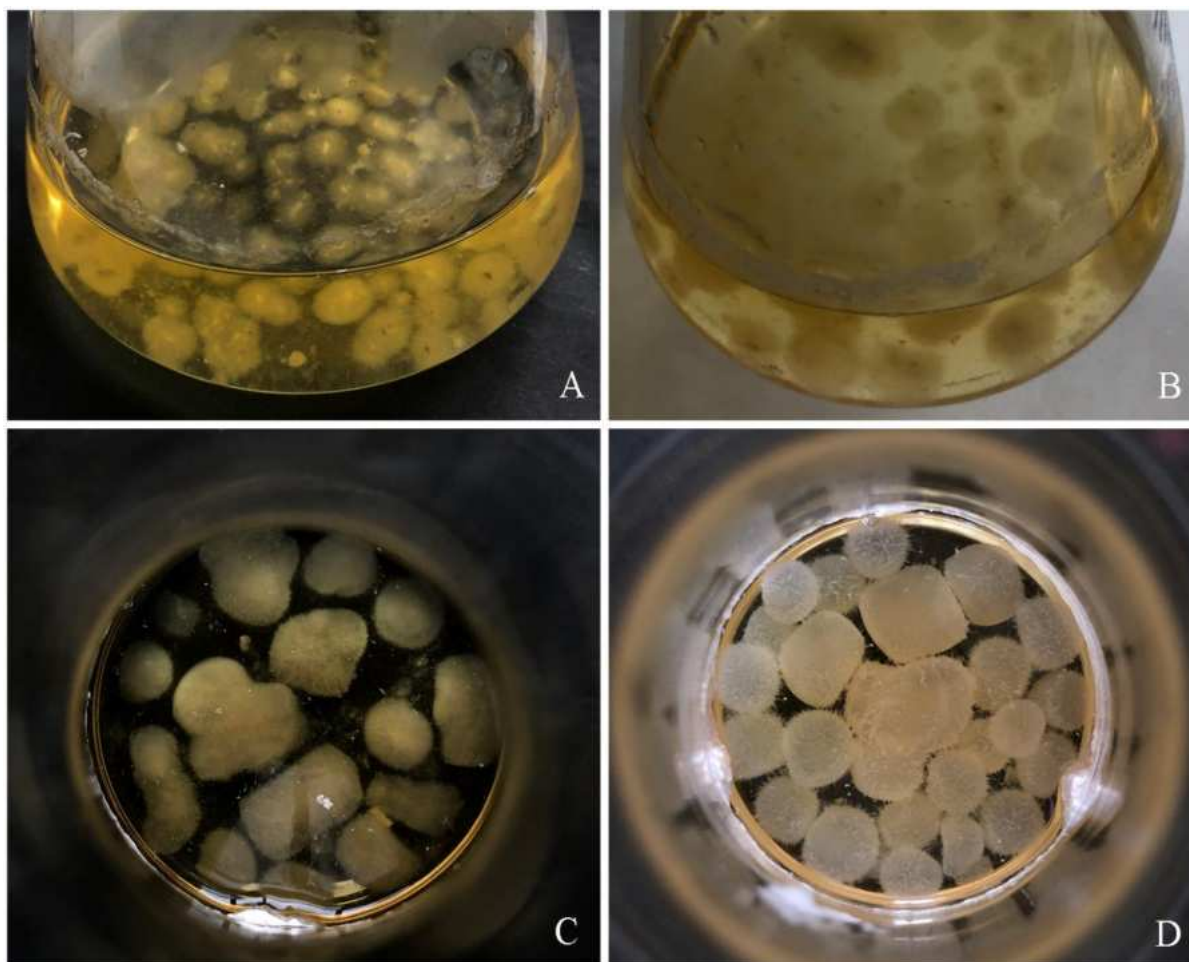


Рис. 6.1.1. Міцеліальні агломерати на 5-ту добу глибинного культивування на середовищі ГПД за температури $26\pm 1^\circ\text{C}$ та 120 об/хв: А – *X. longipes* IBK 2718, В – *X. longipes* IBK 2726, С – *X. polymorpha* IBK 2720, D – *X. polymorpha* IBK 2736.

Аналіз росту штамів *X. polymorpha* та *X. longipes* у глибинній культурі показав, що динаміка накопичення біомаси цими грибами підпорядковувалась загальним закономірностям росту і розвитку організмів (Бисько и др., 1983). При цьому для всіх штамів характерною була коротка лаг-фаза (до 3 діб), за якою

слідувала фаза експоненційного росту, пік накопичення біомаси та зниження її біосинтезу (рис. 6.1.2). Для більшості штамів максимальне значення біомаси фіксувалось на 9-ту добу культивування. Окрім штаму *X. longipes* ІВК 2726, який акумулював найбільшу кількість міцелію на 5-ту добу – $7,36 \pm 0,09$ г/л. *Xylaria polymorpha* ІВК 2736 відзначений як штам, що синтезував максимальну кількість біомаси, яка склала $11,07 \pm 0,04$ г/л. Цей показник практично не відрізнявся від значення для іншого штаму *X. polymorpha* – ІВК 2720 ($10,69 \pm 0,13$ г/л). Вдвічі меншу кількість біомаси – $5,60 \pm 0,05$ г/л синтезував штам *X. longipes* ІВК 2718 на ту ж добу культивування (рис. 6.1.2). Варто відмітити, що після досягнення піку, крива динаміки накопичення штамми біомаси різко йшла донизу, що може бути обумовлено нестачею джерела вуглецю, зростанням концентрації продуктів обміну у середовищі або погіршенням кисневого обміну (Бухало, 1988).

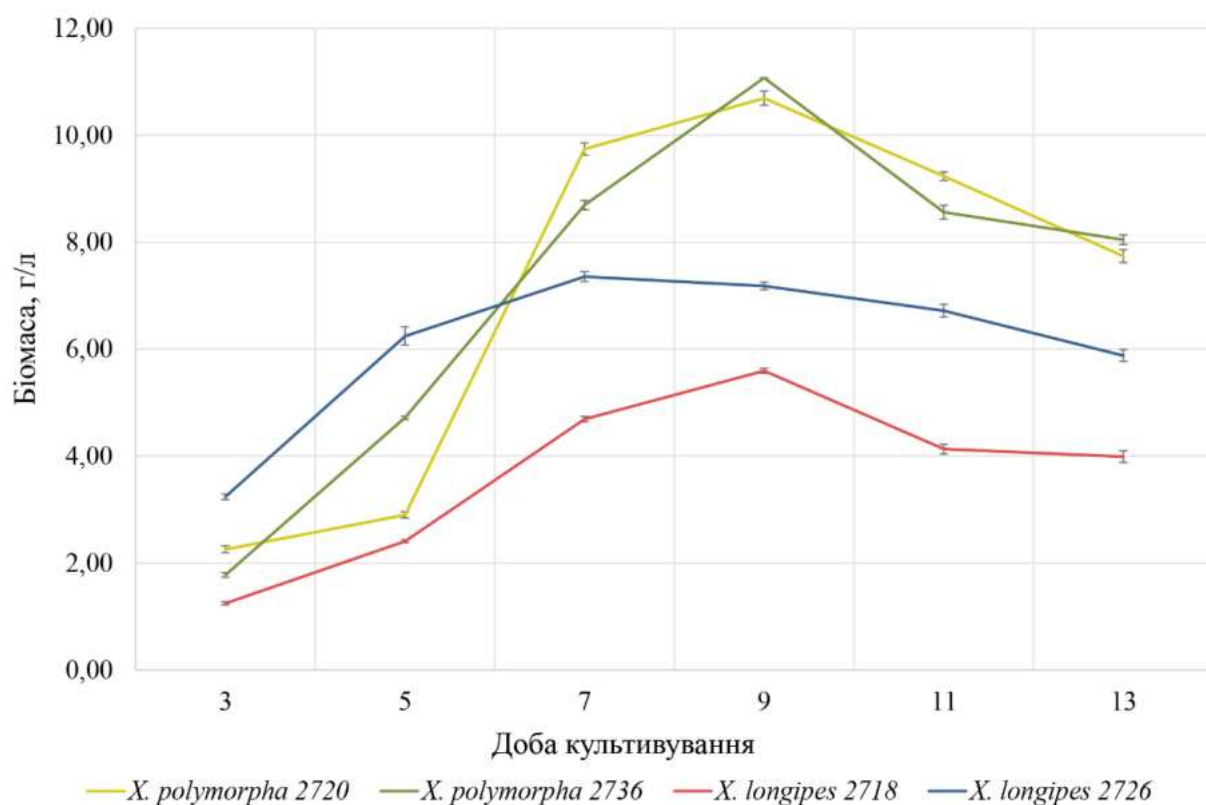


Рис. 6.1.2. Динаміка накопичення біомаси штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes* при глибинному культивуванні на середовищі ГПД за температури $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Штами виду *X. polymorpha* накопичували також більшу кількість ендо- та екзополісахаридів, порівняно зі штамми *X. longipes*, проте криві динаміки

накопичення біомаси та ендополісахаридів не співпадали. Величини максимальних кількостей ендополісахаридів були подібними для штамів *X. longipes* IBK 2718, IBK 2726 та *X. polymorpha* 2720 і на 5-ту добу культивування становили $97,00 \pm 2,00$ мг/г, $98,33 \pm 1,56$ мг/г та $103,71 \pm 0,86$ мг/г, відповідно. Водночас штам *X. polymorpha* IBK 2736 синтезував найбільшу кількість ендополісахаридів на 7-му добу культивування – $120 \pm 6,67$ мг/г (рис. 6.1.3).

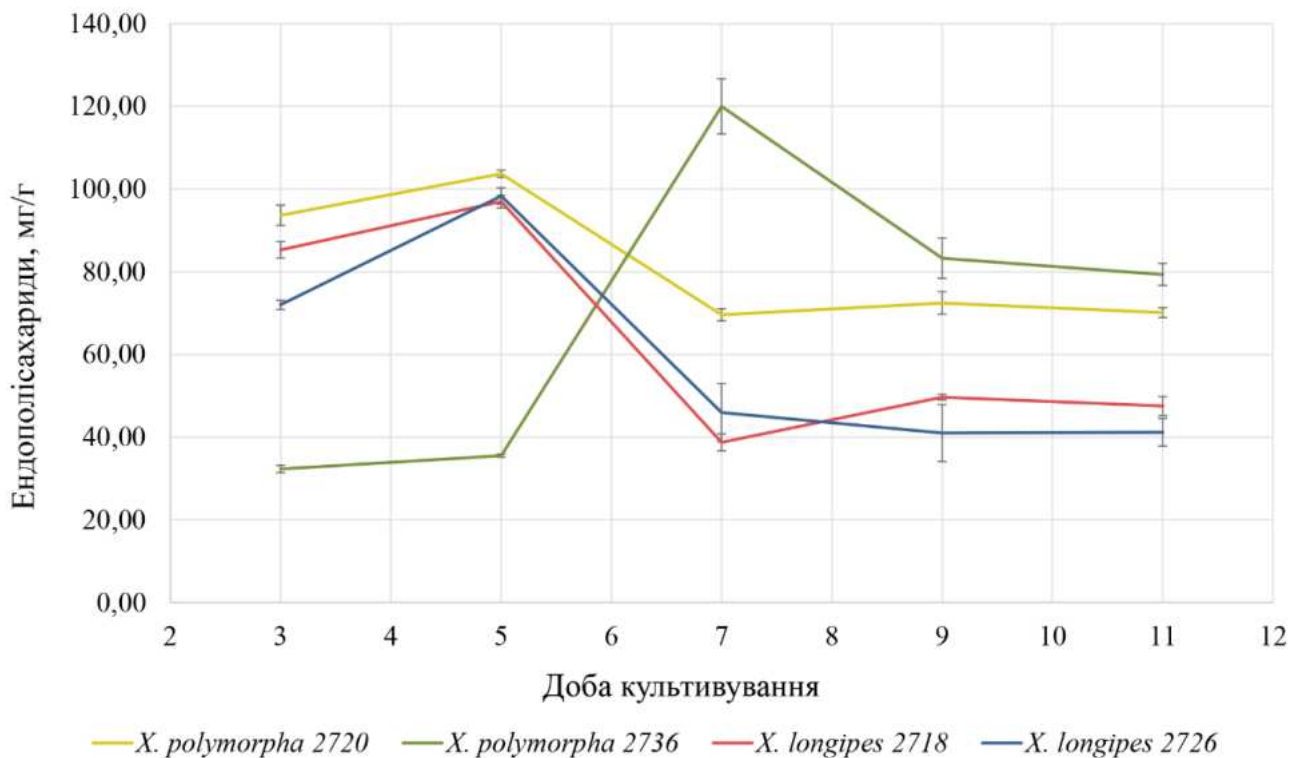


Рис. 6.1.3. Динаміка накопичення ендополісахаридів штамми видів *X. polymorpha* та *X. longipes* при глибинному культивуванні на середовищі ГПД за температури $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Виявлено відмінності у синхронності динаміки накопичення ендо- та екзополісахаридів для різних видів. Так, для штамів *X. polymorpha* IBK 2720 та IBK 2736 накопичення екзополісахаридів відбувалось паралельно з накопиченням біомаси, досягаючи максимуму на 9-ту добу культивування. При цьому максимальні значення вмісту екзополісахаридів у середовищі майже не відрізнялись і склали $0,97 \pm 0,05$ г/л та $0,93 \pm 0,10$ г/л для штамів IBK 2720 та IBK 2736, відповідно. Вміст екзополісахаридів при культивуванні штамів *X. longipes* був значно меншим, ніж у

випадку штамів *X. polymorpha* та знижувався з часом, що може обумовлюватись біологічними особливостями конкретних штамів, які використовують екзополісахариди у процесах життєдіяльності (рис. 6.1.4).

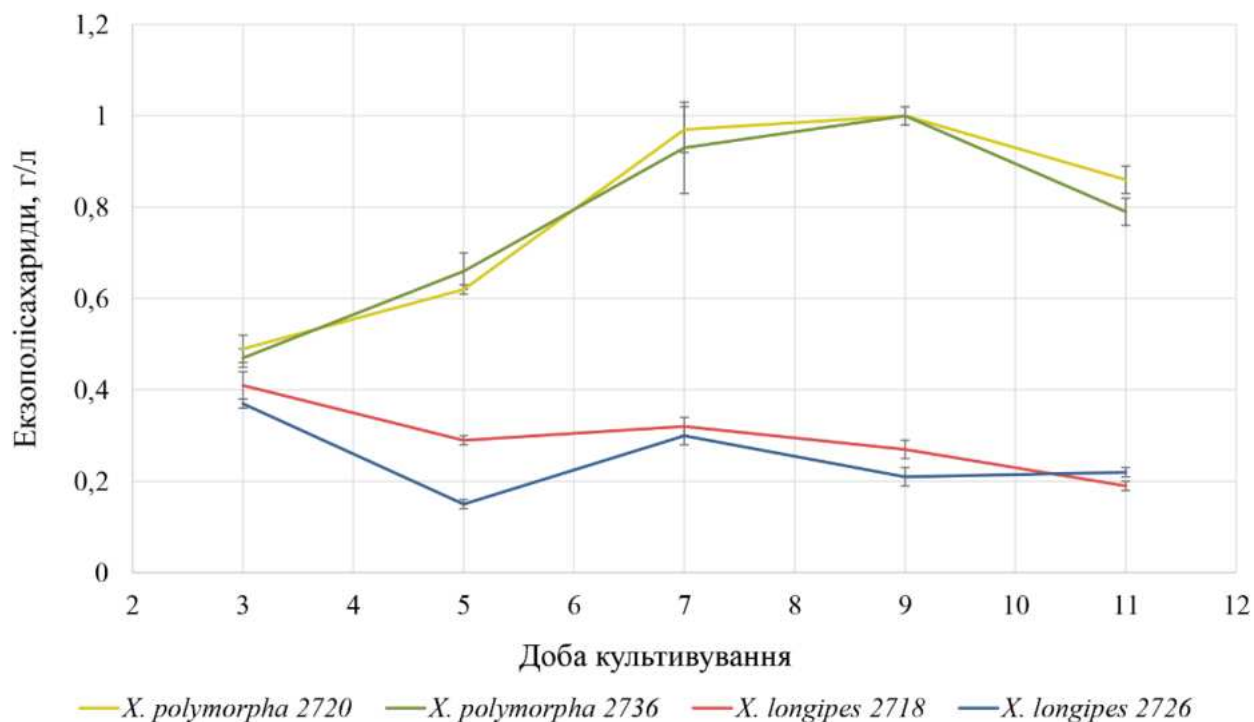


Рис. 6.1.4. Динаміка накопичення екзополісахаридів штамми видів *X. polymorpha* та *X. longipes* при глибинному культивуванні на середовищі ГПД за температури $26\pm 1^\circ\text{C}$.

Одним із важливих факторів, що впливають на біосинтетичну активність культур є концентрація йонів H^+ у живильному середовищі. Згідно літературних відомостей, більшість видів грибів здатні рости при широкому діапазоні значень рН, проте оптимальним для росту є діапазон 4,0–6,5 (Бухало, 1988; Бисько и др., 2011; Krupodorova et al., 2021). Найсприятливішими для накопичення міцеліальної біомаси різних видів роду *Xylaria* дослідники зазначають показники рН в діапазоні 5,5–6,5 (Ramesh et al., 2014; Ahmed & Jahan, 2018; Lopez et al., 2022). Отже, спираючись на літературні відомості, нами для культивування штамів видів роду *Xylaria* було обране початкове значення рН 6,0.

Дослідження динаміки рН в процесі культивування є важливим етапом, оскільки цей показник може впливати на властивості клітинних стінок, швидкість та характер росту міцелію, здатність засвоювати ті чи інші поживні речовини (Jennings, 1995; Gow et al., 2017). Отримані в ході нашого експерименту дані показали, що всі штами знижували початкове значення рН середовища до $4,35 \pm 0,36$ – $4,98 \pm 0,29$ (рис. 6.1.5). Підкислення культуральної рідини є характерним явищем при культивуванні макроміцетів на рідких середовищах і описане дослідниками для представників деяких видів грибів інших таксономічних груп (Ломберг, 2005; Круподьрова, 2009; Мукчайлова et al., 2017)

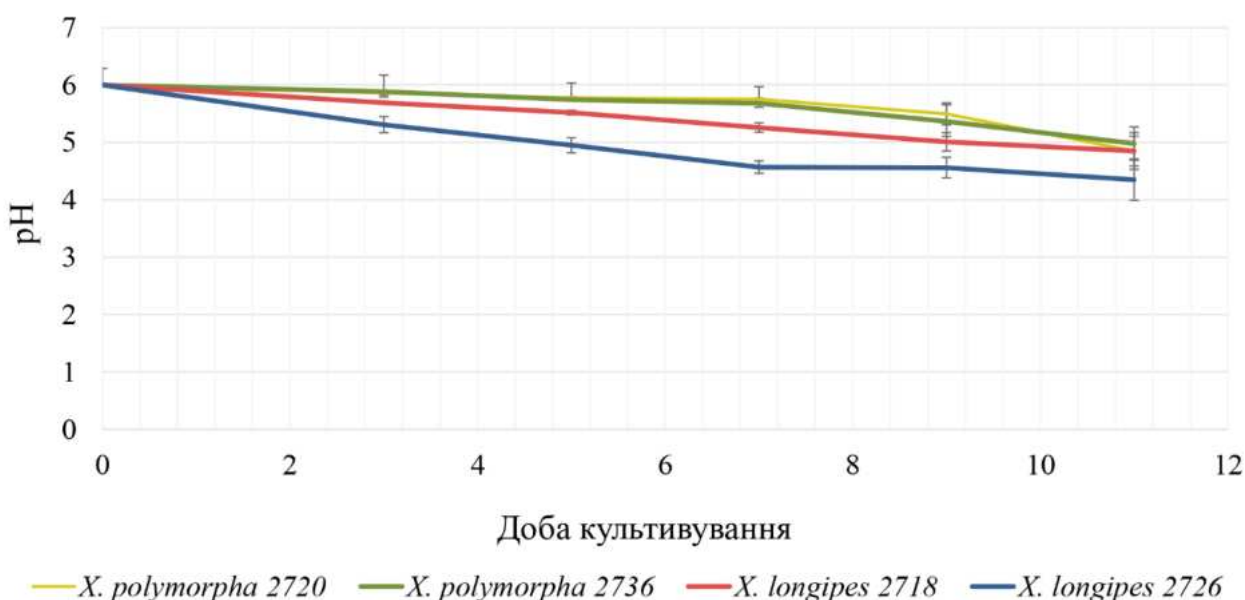


Рис. 6.1.5. Динаміка рН при культивуванні штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes* при глибинному культивуванні на середовищі ГПД за температури $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Отже, нами вперше було проведено детальне дослідження динаміки накопичення біомаси міцелію, ендо- та екзополісахаридів при глибинному культивуванні штамів *X. polymorpha* та *X. longipes*. У результаті виявлено різницю у морфології міцеліальних агломератів та у кінетиці перерахованих біосинтетичних процесів у залежності від виду та штаму. Аналіз динаміки дозволив встановити максимальні значення вмісту досліджуваних показників у часі, а також з'ясувати взаємозв'язок між їх накопиченням. Так, зіставлення динаміки синтезу біомаси,

ендо- та екзополісахаридів культурами *X. polymorpha* та *X. longipes* виявило відмінності у синхронності цих процесів для різних штамів. Максимальні значення акумульованої біомаси штамів *X. longipes* не співпадали у часі з накопиченням найбільших кількостей ендо- та екзополісахаридів і загалом були меншими, ніж аналогічні значення для штамів *X. polymorpha*. Під час культивування усіх штамів зафіксовано зниження початкових значень рН середовища на 1–1,5 одиниць. Отримані результати мають важливе значення для майбутнього практичного використання культур, оскільки дозволяють оцінити та порівняти продуктивність окремих штамів і відібрати найбільш перспективні для подальших досліджень.

6.2. Динаміка вмісту фенолів та антиоксидантної активності у біомасі та культуральній рідині при глибинному культивуванні

Фенольні сполуки (або поліфеноли) є однією з найчисленніших груп вторинних метаболітів, хімічна структура яких варіює від простих молекул (фенольні кислоти, фенілпропаноїди, флавоноїди) до високополімеризованих сполук (Bravo, 2009). Поліфеноли проявляють антиоксидантну здатність, вступаючи в реакцію з різними вільними радикалами. Механізми антиоксидантної дії пов'язані з перенесенням атома водню або одного електрона, послідовним перенесенням електрона з втратою протона та хелатуванням перехідних металів (Litwinienko & Ingold, 2007).

Метою дослідження було проаналізувати динаміку вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності під час глибинного культивування штамів видів роду *Xylaria*. Оскільки фенольні сполуки є одними з основних компонентів, що впливають на антиоксидантну активність грибів (Guo et al., 2012), особливий інтерес представляла кореляція між показниками вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності, як у біомасі, так і в культуральній рідині.

Отримані результати показали, що динаміка накопичення фенольних сполук відрізнялась у різних штамів в залежності від їх біологічних особливостей. Для штамів *X. polymorpha* IBK 2720 та IBK 2736 пік загального вмісту фенолів

спостерігався у біомасі на третю та сьому добу культивування, з показниками $0,92 \pm 0,05$ та $1,53 \pm 0,09$ мг ГКЕ/ г відповідно (рис. 6.2.1–6.2.4.)

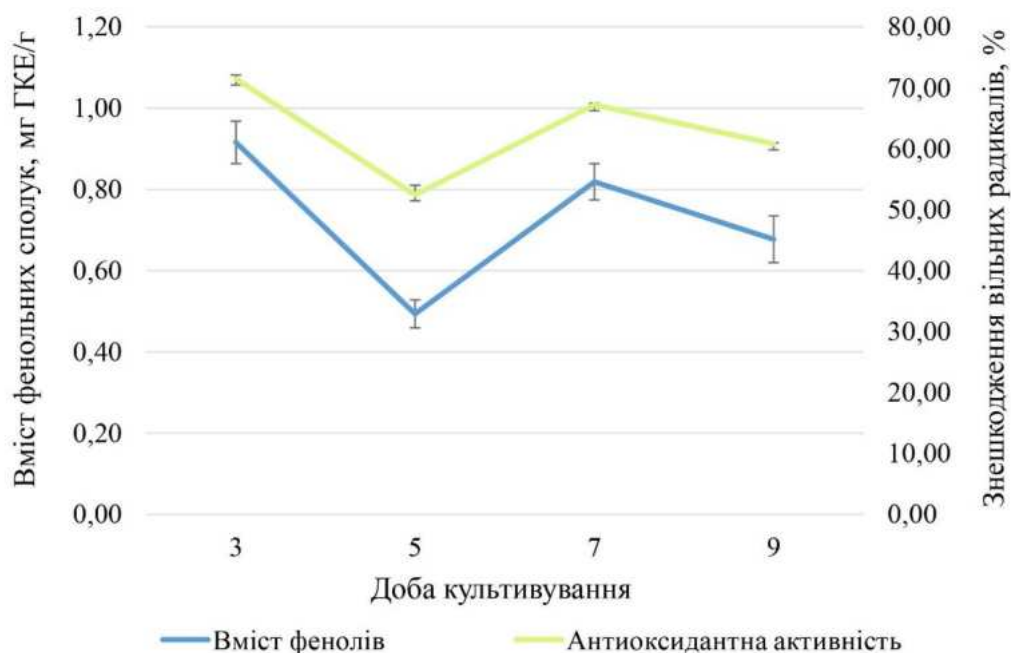


Рис.6.2.1. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у біомасі штаму *X. polymorpha* ІВК 2736, екстрагованої етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/г сухої ваги (мг ГКЕ/г). Похибки позначають стандартне відхилення.

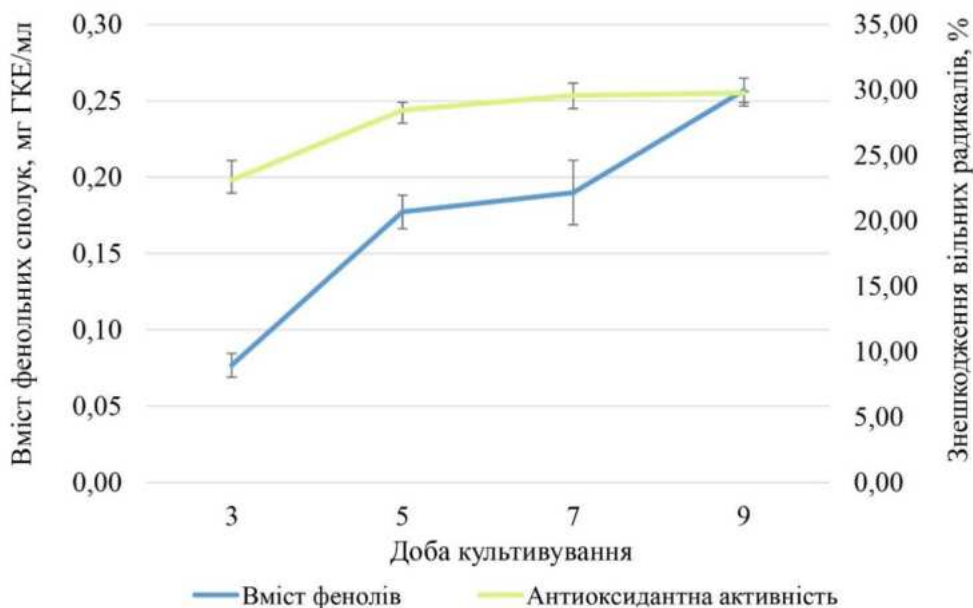


Рис. 6.2.2. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у культуральній рідині штаму *X. polymorpha* ІВК 2736, екстрагованій етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/мл живильного середовища (мг ГКЕ/мл). Похибки позначають стандартне відхилення.

Для штаму *X. longipes* ІВК 2726 найвище значення вмісту фенольних сполук було зафіксовано у біомасі на 5-ту добу культивування – $2,53 \pm 0,10$ мг ГКЕ/ г, що було найбільшим показником серед досліджених екстрактів біомаси та культуральної рідини. На противагу попередньому, для штаму *X. polymorpha* ІВК 2720 на ту ж добу культивування було зафіксовано найнижчий показник серед усіх екстрактів (рис. 6.2.3, 6.2.4).

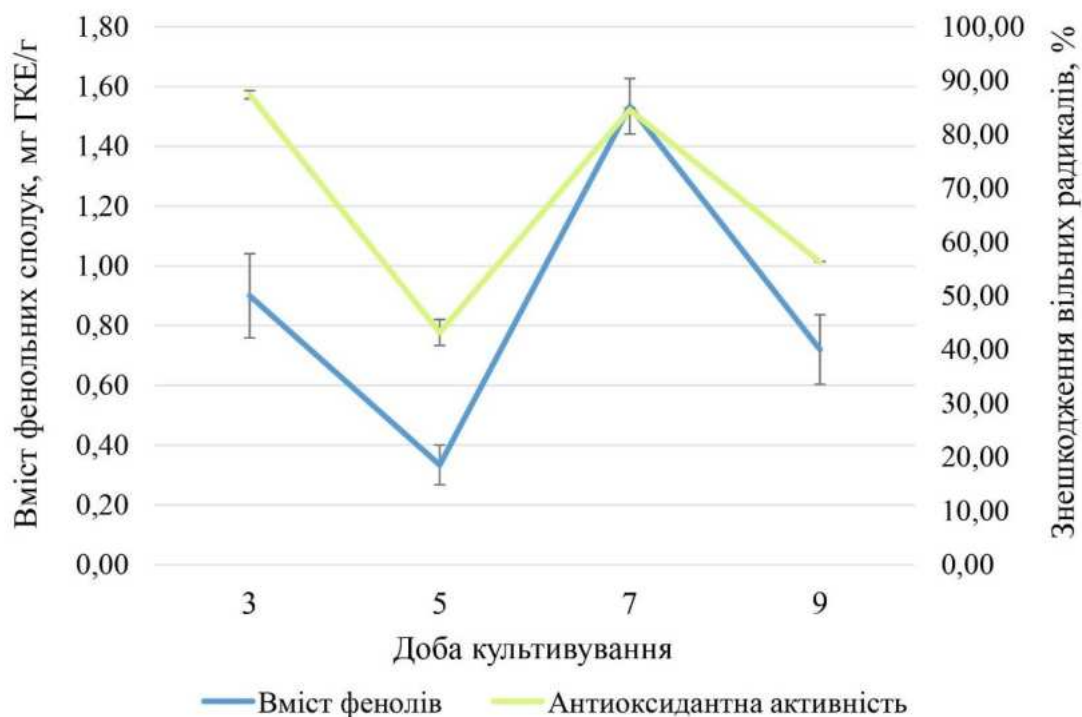


Рис. 6.2.3. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у біомасі штаму *X. polymorpha* ІВК 2720, екстрагованої етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/г сухої ваги (мг ГКЕ/г). Похибки позначають стандартне відхилення.

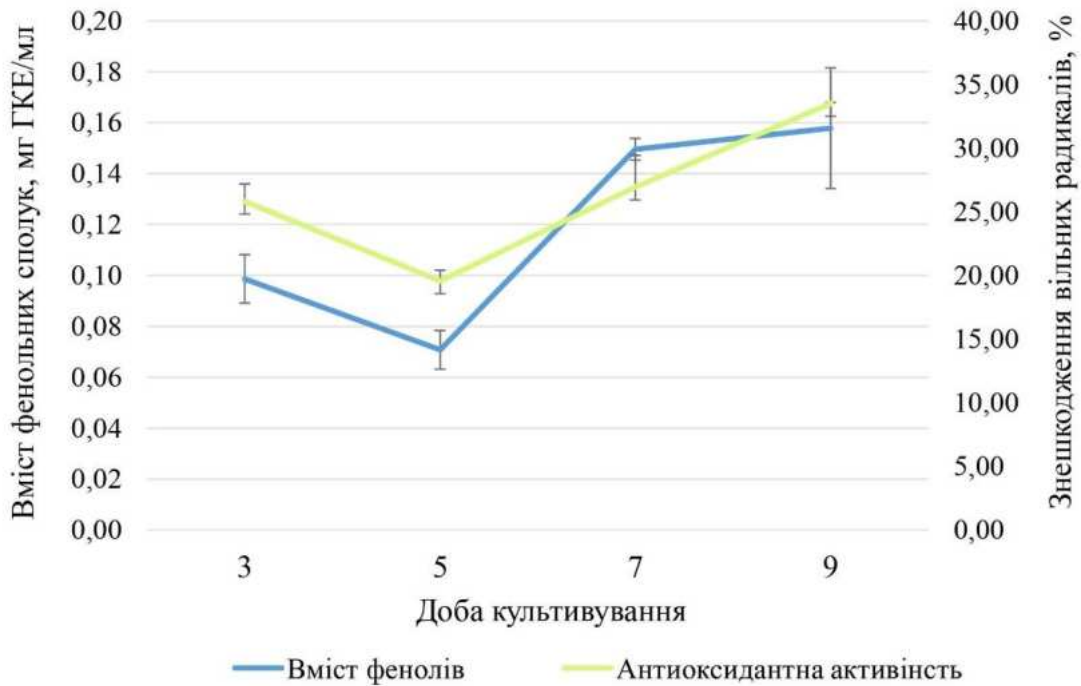


Рис. 6.2.4. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у культуральній рідині штаму *X. polymorpha* IBK 2720, екстрагованій етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/мл живильного середовища (мг ГКЕ/мл). Похибки позначають стандартне відхилення.

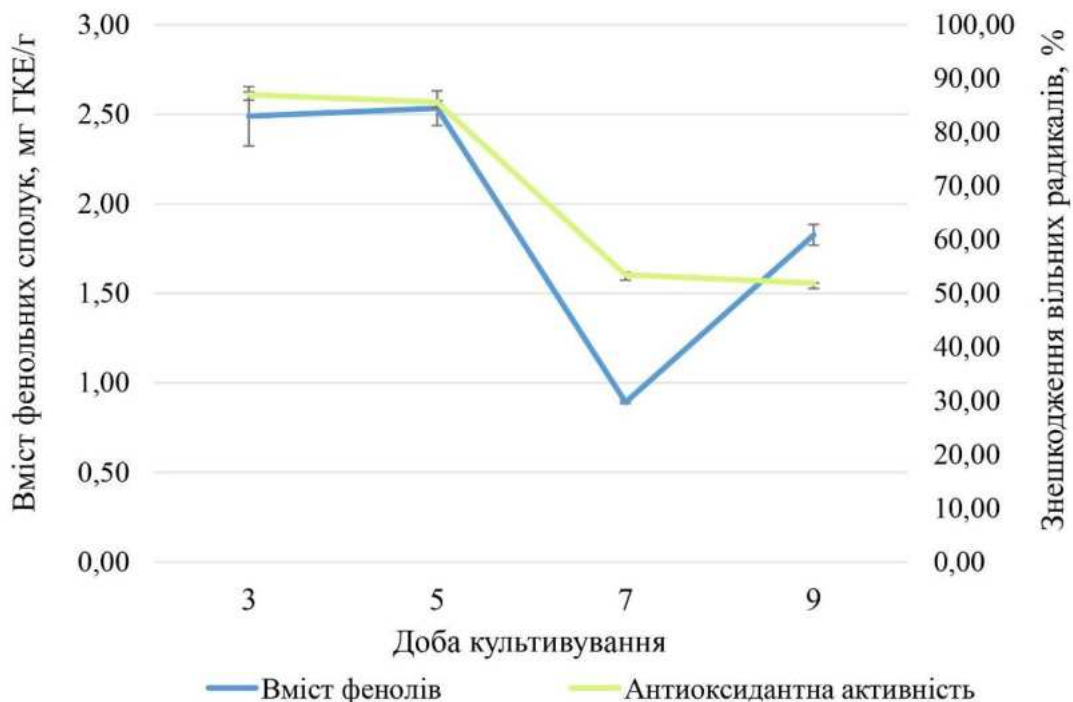


Рис. 6.2.5. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у біомасі штаму *X. longipes* ІВК 2726, екстрагованої етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/г сухої ваги (мг ГКЕ/г). Похибки позначають стандартне відхилення.

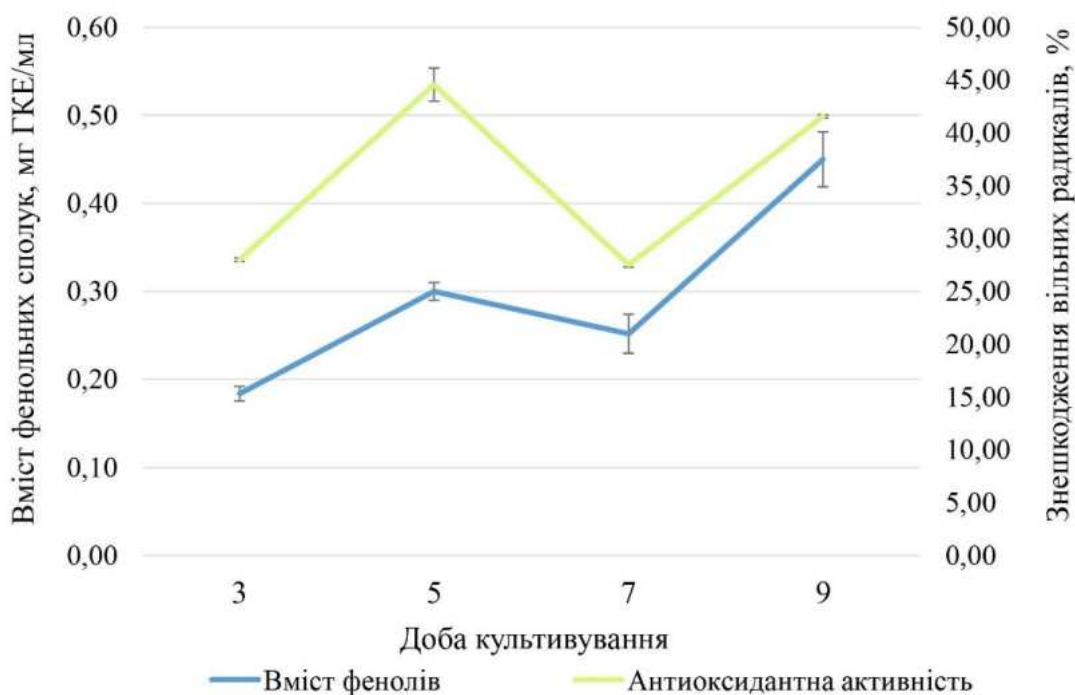


Рис. 6.2.6. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у культуральній рідині штаму *X. longipes* ІВК 2726, екстрагованій етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/мл живильного середовища (мг ГКЕ/мл). Похибки позначають стандартне відхилення.

Всупереч нашому припущенню, що зниження рівня вмісту фенолів з часом є результатом їх екстракції в культуральну рідину, отримані нами дані не підтверджують цю думку. Варто зазначити, що хоча застосований нами метод з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу дозволяє оцінити загальний вміст фенолів, він чутливий до різних факторів, які можуть впливати на одержані значення. При культивуванні грибів на концентрацію біологічно активних сполук

можуть впливати такі фактори, як склад живильного середовища при культивуванні об'єкта, вибір розчинника, методи екстракції тощо (Heleno et al., 2012).

Було відмічено, що динаміка вмісту фенолів у біомасі та в культуральній рідині зазнавала подібних коливань. Зокрема, вміст фенолів у екстрактах біомаси штаму *X. longipes* ІВК 2726 спочатку зріс на 5-ту добу культивування, зменшився майже втричі на 7-му добу і зменшився вдвічі на 9-ту добу культивування (рис. 6.2.5). Аналогічно, але з меншою амплітудою, змінювався вміст фенолів у культуральній рідині цього штаму (рис. 6.2.6). Схожу тенденцію спостерігали і при порівнянні вмісту фенолів у біомасі та культуральній рідині штаму *X. polymorpha* ІВК 2720. Однак у цьому випадку кількість фенолів спочатку зменшувалася, потім різко зростала і знову зменшувалась на 9-ту добу культивування (рис. 6.2.3, 6.2.4).

Загалом, екстракти культуральної рідини містили значно менші кількості фенольних сполук порівняно з біомасою. Найвищий показник вмісту фенольних сполук серед екстрактів культуральної рідини досліджених штамів спостерігався на 9-ту добу культивування штаму *X. longipes* ІВК 2726 – $0,45 \pm 0,03$ мг ГКЕ/мл (рис. 6.2.6).

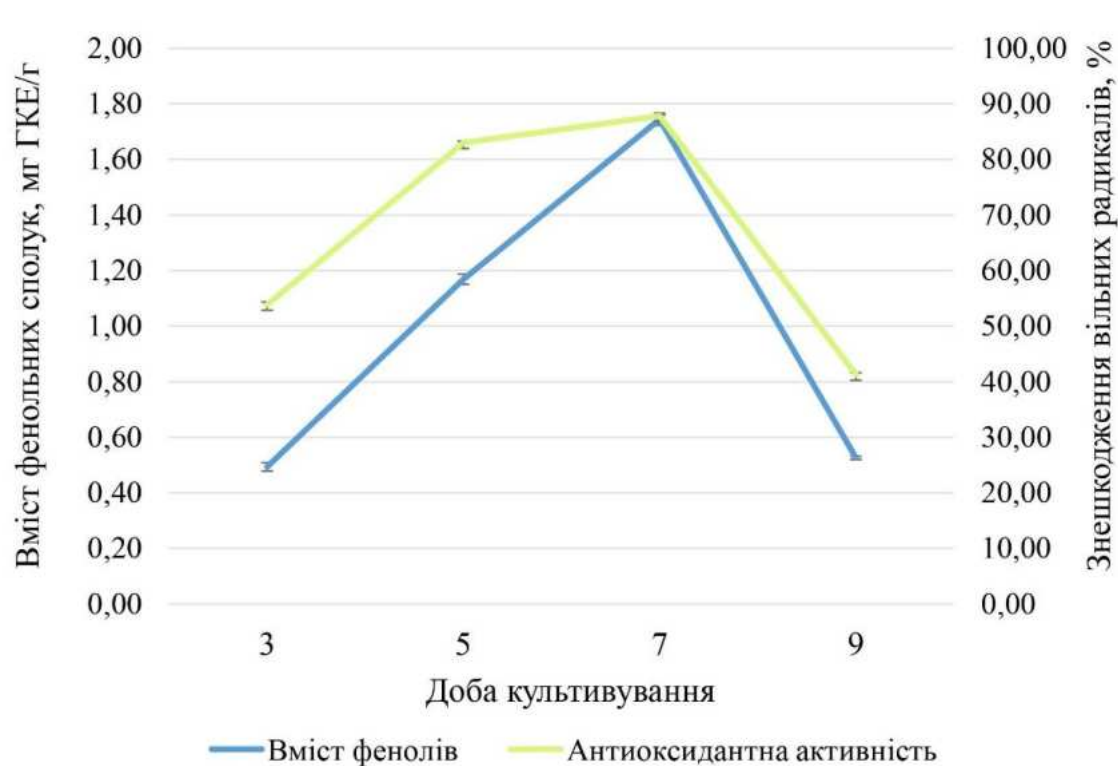


Рис. 6.2.7. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у біомасі штаму *X. longipes* ІВК 2718, екстрагованої етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/г сухої ваги (мг ГКЕ/г). Похибки позначають стандартне відхилення.

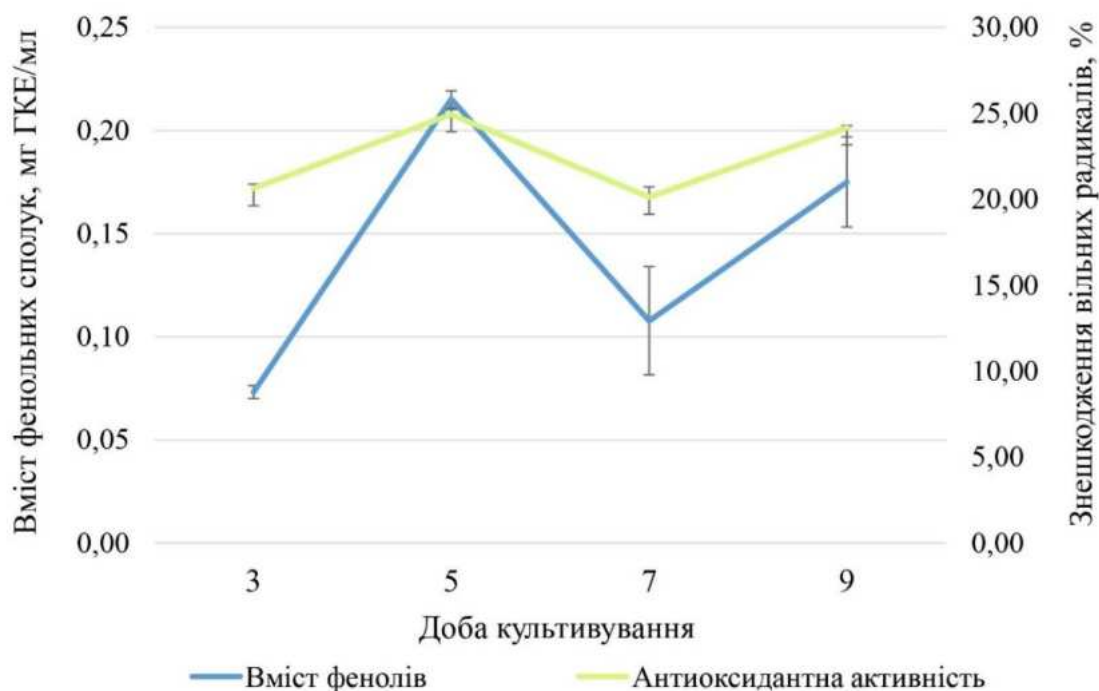


Рис.6.2.8. Динаміка вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у культуральній рідині штаму *X. longipes* ІВК 2718, екстрагованій етилацетатом. Результати є середнім значенням трьох повторів. Вміст фенолів виражений у мг еквіваленту галової кислоти/мл живильного середовища (мг ГКЕ/мл). Похибки позначають стандартне відхилення.

Варто відмітити, що досліджені нами штами продукували феноли в кількостях, співвідносних з іншими грибами, притому не тільки в межах своєї таксономічної групи. Наприклад, для плодових тіл їстівних грибів *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler та *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer кількість екстрагованих етилацетатом фенолів становила $0,03 \pm 0,01$ та $0,21 \pm 0,08$ мг ГКЕ/г сухої маси плодових тіл, відповідно (Cheung et al., 2003). Ці значення співвідносні з даними, отриманими нами для міцелію та культуральної рідини. Інші дослідники

підкреслюють, що зазвичай у плодових тілах концентрації фенольних сполук вищі у порівнянні з вегетативним міцелієм. Наприклад, визначення вмісту фенолів у одному з найбільш досліджуваних об'єктів біотехнологій серед грибів – *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. виявило, що найбільше цих сполук містилось у плодових тілах ($28,64 \pm 0,28$ мг ГКЕ/г), значно менше у споровій масі ($14,94 \pm 0,22$) та у вегетативному міцелії (від $3,17 \pm 0,26$ до $15,19 \pm 0,59$ мг ГКЕ/г, у залежності від методу культивування міцелію) (Heleno et al., 2012).

Екстракти біомаси всіх вивчених нами штамів продемонстрували високі показники знешкодження вільних радикалів. Максимальний показник був зафіксований для штаму *X. longipes* IBK 2718 – $87,82 \pm 0,19\%$ на 7-му добу культивування (рис. 6.2.7). Близьке до нього значення отримане для штаму *X. polymorpha* IBK 2720 – $87,37 \pm 0,75\%$, але на третю добу культивування (рис. 6.2.3). Варто зазначити, що порівняно з наявними літературними відомостями щодо антиоксидантної активності інших представників роду *Xylaria*, отримані нами значення є високими. Наприклад, антиоксидантна активність етилацетатних екстрактів біомаси *Xylaria* sp. – ендоефіту *Ginkgo biloba* L. становила $29,66 \pm 0,97\%$, що значно нижче отриманих нами показників для екстрактів біомаси (Liu et al., 2007).

Деякими авторами було відмічено, що вміст фенольних сполук у екстрактах рослин та грибів корелює з антиоксидантною активністю (Amarowicz et al., 2004; Lee et al., 2007; Nakajima et al., 2007). Це пов'язано з хімічною структурою фенольних сполук, а саме наявністю гідроксильних груп, які є донорами водню. Вони можуть вступати в реакції з активним киснем і активними формами азоту та переривати цикл генерації нових вільних радикалів. (Croft, 1998). Антиоксидантні властивості фенольних сполук також обумовлені їх здатністю до хелатування металів та до взаємодії з білками, що дозволяє їм пригнічувати такі ферменти, як ксантинооксидаза, ліпоксигеназа і циклооксигеназа (Cos et al., 1998; Soobrattee et al., 2005; Bhanja Dey et al., 2016). Кореляція загального вмісту фенолів з активністю знешкодження радикалів 2,2–дифеніл–1–пікрилгідразилу у екстрактах у нашому

дослідженні продемонстрована на рисунках 6.2.1–6.2.8, а розраховані коефіцієнти кореляції наведені в таблиці 6.2.1. Найбільший кореляційний зв'язок було відмічено для екстрактів біомаси штаму *X. polymorpha* ІВК 2736 з коефіцієнтом Пірсона 1,00 (табл. 6.2.1).

Таблиця 6.2.1

Коефіцієнти кореляції Пірсона між вмістом фенолів та антиоксидантною активністю в етилацетатних екстрактах біомаси та культуральної рідини штамів *X. longipes* та *X. polymorpha*

Вид	Штам	Екстракти біомаси	Екстракти культуральної рідини
<i>X. longipes</i>	2718	0,92	0,94
	2726	0,85	0,71
<i>X. polymorpha</i>	2720	0,82	0,89
	2736	1,00	0,93

Слід зазначити, що проведений кореляційний аналіз не враховує особливостей фенольних профілів, які можуть відрізнятися як якісно, так і кількісно, залежно від хімічної структури фенольних сполук у досліджених зразках. Нижчі показники кореляції між антиоксидантною активністю та загальним вмістом фенолів можна пояснити різними причинами. Наприклад, антиоксидантна активність екстракту може залежати не лише від кількості, але й від концентрації, а також від хімічної структури та співвідношення між поліфенолами. При цьому фенольні сполуки мають різну донорно-протонну ємність, яка визначає їхню антиоксидантну активність (Saeed et al., 2012). До того ж наявність комплексу різних класів хімічних сполук в екстракті ускладнює кількісне визначення кожного антиоксидантного компонента окремо. Присутність сполук з високою здатністю поглинати вільні

радикали може впливати на антиоксидантну здатність незалежно від вмісту фенольних сполук.

Результати підрозділу висвітлені у науковій публікації (Atamanchuk & Bisko, 2023a).

6.3. Вплив розчинників для екстракції на вміст фенолів та антиоксидантну активність

Процес екстракції антиоксидантних сполук може здійснюватися різними методами та розчинниками, при цьому кількість екстрагованих речовин та їх антиоксидантна ефективність залежить від полярності розчинника та від хімічної структури ізольованих сполук (Litwinienko & Ingold, 2007; Shabir et al., 2011). З літературних даних відомо, що етилацетат добре екстрагує низькомолекулярні фенольні сполуки та високомолекулярні поліфеноли і часто використовується для екстракції культуральної рідини (Sharvit et al., 2012; Yadav et al., 2014; Awad et al., 2018). Втім, зважаючи на роль розчинника у вищезгаданих процесах, актуальним є порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук та антиоксидантної активності у біомасі штамів *X. polymorpha* та *X. longipes* при екстракції різними розчинниками.

У результаті такого аналізу було виявлено, що вміст поліфенолів у екстрактах різнився в залежності від використаного розчинника. Так, метанольні екстракти біомаси усіх штамів продемонстрували найвищий вміст фенольних сполук, а екстракція етилацетатом призводила до значно менших кількостей поліфенолів (рис. 6.3.1). Найвищий вміст фенольних сполук – $21,64 \pm 0,03$ мг ГКЕ/г було зафіксовано для метанольного екстракту біомаси штаму *X. polymorpha* ІВК 2736. Близьке до нього значення ($20,40 \pm 0,02$ мг ГКЕ/г) було отримане при використанні метанолу для екстракції біомаси іншого штаму *X. polymorpha* – ІВК 2720. Водночас, аналогічні значення для штамів виду *X. longipes* були нижчими, а саме: $14,81 \pm 0,29$ мг ГКЕ/г та $16,60 \pm 0,04$ мг ГКЕ/г для штамів ІВК 2718 та ІВК 2726, відповідно.

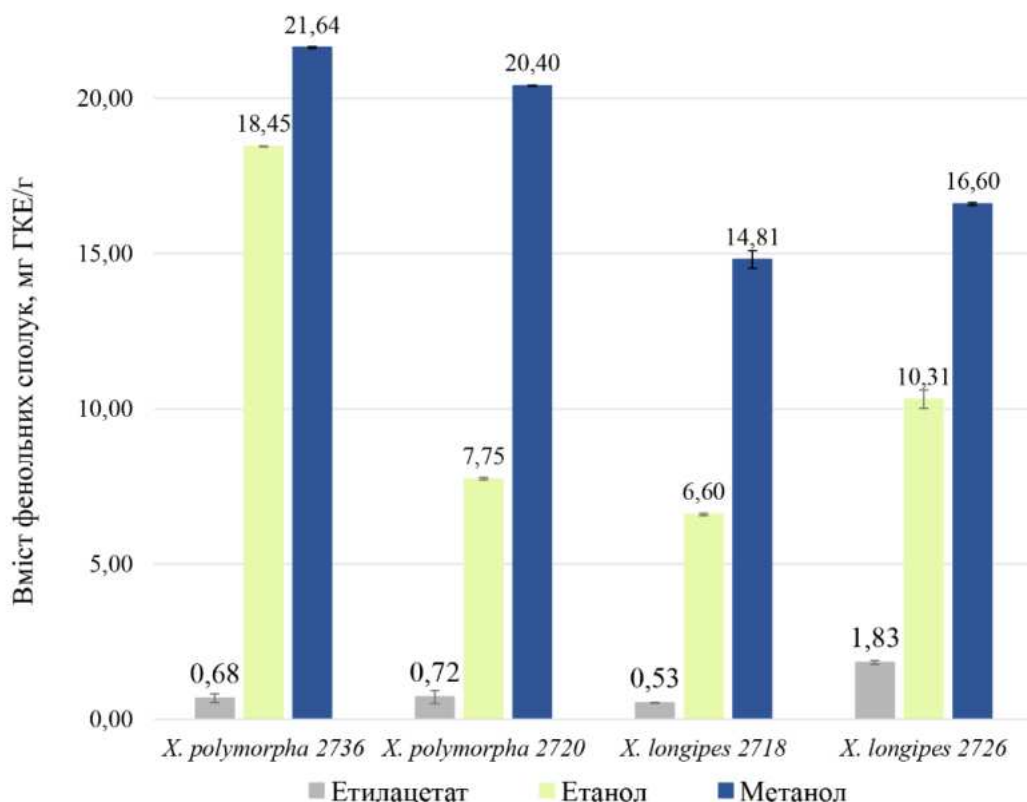


Рис. 6.3.1. Загальний вміст фенольних сполук в екстрактах біомаси штамів *X. polymorpha* та *X. longipes*, при використанні різних розчинників для екстракції. Результати є середнім значенням трьох повторів, вираженим у мг еквіваленту галової кислоти/г сухої ваги (мг ГКЕ/г). Похибки позначають стандартне відхилення.

Вміст поліфенолів у екстрактах біомаси *X. polymorpha* ІВК 2720 та *X. longipes* ІВК 2718 при екстракції етанолом був приблизно у два з половиною рази нижчим, ніж при екстракції метанолом. Для двох інших досліджуваних штамів значення для етанольних екстрактів також були нижчими відносно метанольних, проте різниця була не такою значною (рис. 6.3.1). Серед використаних розчинників етилацетат виявився найменш ефективним для екстракції фенольних сполук. Вміст поліфенолів у етилацетатних екстрактах біомаси *X. longipes* ІВК 2726 був найвищим $-1,83 \pm 0,06$ мг ГКЕ/г.

Ми провели порівняння отриманих нами результатів із літературними відомостями щодо вмісту фенольних сполук у представниках роду *Xylaria*. Автори,

що досліджували вміст поліфенолів у міцелії ендоефітного виду *Xylaria* sp. з *G. biloba*, повідомили про діапазон значень від 9,71 до 54,51 мг ГКЕ/г (Liu et al., 2007). Вони також виявили, що екстракція метанолом сприяла отриманню найвищих показників вмісту фенолів, тоді як екстракція гексаном – найнижчих значень. Значення $18,36 \pm 0,4$ мг/г було отримане іншими дослідниками, які використовували метанол для екстракції поліфенолів з *Xylaria feejeensis* (Berk.) Fr. (Rebbapragada & Kalyanaraman, 2016). Однак варто зазначити, що наш метод екстракції та експериментальний підхід до визначення загального вмісту фенолів дещо відрізнявся від згаданих досліджень. Крім того, ми досліджували інші види та штами, що може пояснити відмінності в отриманих результатах.

Отримані нами дані щодо вмісту фенольних сполук у метанольних та етанольних екстрактах досліджуваних штамів видів роду *Xylaria* виявились співвідносними з відомостями про вміст поліфенолів у деяких грибах з інших таксономічних груп та лікарських рослинах, відомих своїми антиоксидантними властивостями. Наприклад, для ефіроолійних рослин діапазон значень вмісту поліфенолів складав від 2,9 мг/г (для листа *Humulus lupulus* L.) до 28,2 мг/г (для листа *Geranium purpureum* Vill.) (Proestos et al., 2006). Інші дослідники також повідомляли про подібні значення, але в перерахунку на 100 грамів сухої речовини. Зокрема, від 34,5 мг/100 г у *Praecitrullus vulgaris* var. *fistulosius* (Stocks) Pangalo до 253,5 мг/100 г у *Chenopodium album* L. (Kaur & Kapoor, 2002). Щодо грибів, для *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. при використанні етанолу було одержано значення 102,78 мг/100 г, а метанолу – 100,45 мг/100 г (Garcia et al., 2020). Водночас, для *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler загальний вміст фенолів, отриманий в тому ж дослідженні, склав 81,83 мг/100 г при екстракції етанолом та 78,92 мг/100 г – етанолом.

Як вже було зазначено, фенольні сполуки становлять особливий інтерес як антиоксиданти, завдяки ефективності у знешкодженні вільних радикалів, особливо активних форм кисню (АФК), а отже виконують захисну функцію аеробних організмів від окислювального стресу (Villaño et al., 2007; Ali Al-Mamary & Moussa,

2021). Активність знешкодження вільних радикалів 2,2–дифеніл–1–пікрилгідрозилу для різних екстрактів біомаси штамів *X. polymorpha* та *X. longipes* у нашому дослідженні представлена на рисунку 6.3.2. Діаграма свідчить, що метанольні екстракти штамів *X. longipes*, які мали високий вміст поліфенолів, демонстрували також високу активність знешкодження радикалів 2,2–дифеніл–1–пікрилгідрозилу. Проте для штамів *X. polymorpha* вища антиоксидантна активність спостерігалась в етанольних екстрактах, а саме $84,24 \pm 0,07\%$ і $86,55 \pm 0,20\%$ для штамів ІВК 2736 і ІВК 2720, відповідно. Найнижчі значення були зафіксовані для етилацетатних екстрактів: від $41,28 \pm 0,33$ до $60,83 \pm 0,17\%$.

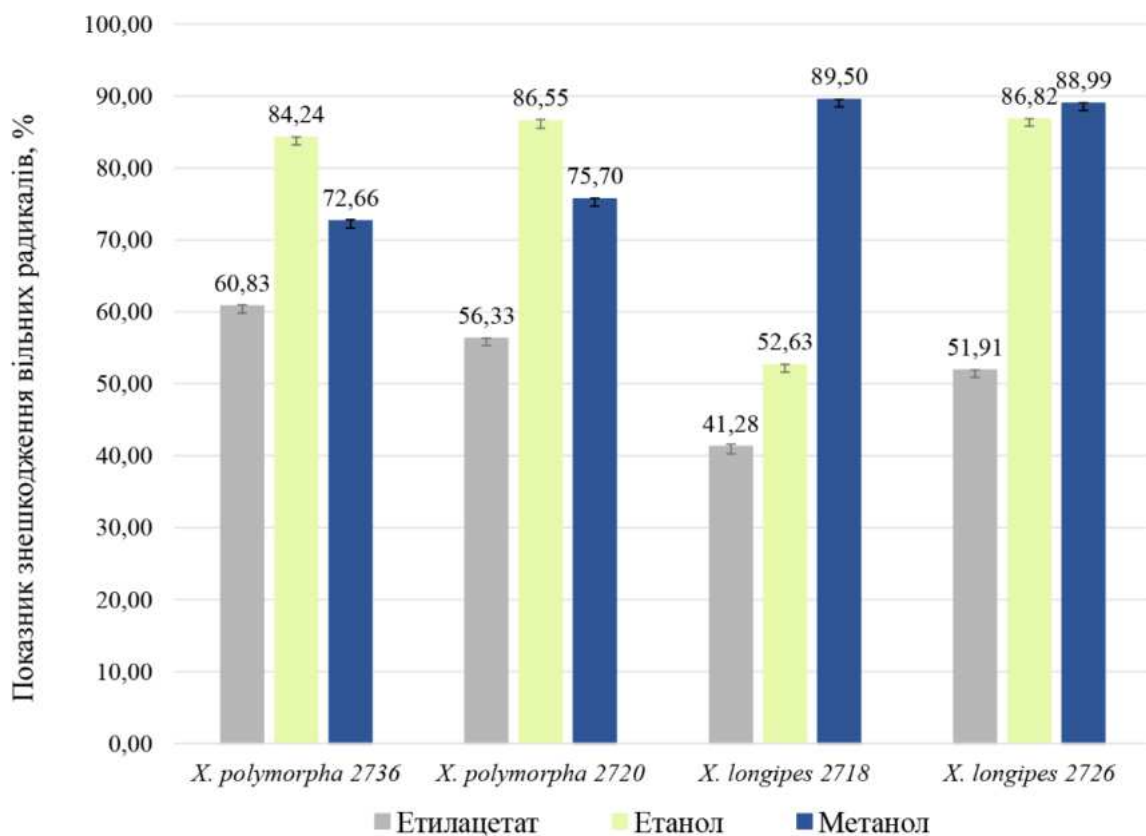


Рис. 6.3.2. Антиоксидантна активність екстрактів біомаси штамів *X. polymorpha* та *X. longipes*, при використанні різних розчинників для екстракції. Результати є середнім значенням трьох повторів, вираженим у відсотках знешкодження вільних радикалів 2,2–дифеніл–1–пікрилгідрозилу. Похибки позначають стандартне відхилення.

Екстракти штамів *X. polymorpha* та *X. longipes* продемонстрували вищу здатність знешкоджувати вільні радикали порівняно з іншими представниками роду, дослідженими за допомогою того ж методу. Наприклад, антиоксидантна активність міцелію *Xylaria* sp. при екстракції метанолом становила 66,29%, а при екстракції етанолом – 29,66% (Liu et al., 2007). Ці значення є нижчими, ніж отримані нами для штамів *X. polymorpha* та *X. longipes* з використанням аналогічних розчинників. Метанольний та етилацетатний екстракти *X. feejeensis* НМЖАУ22039 продемонстрували антиоксидантну активність 73,86% та 69,24% відповідно (Rebbaragada & Kalyanaraman, 2016), ці показники є близькими до отриманих нами для штамів *X. polymorpha*.

Отже, хімічний склад розчинника мав значний вплив на кількість екстрагованих фенольних сполук із біомаси штамів *X. polymorpha* та *X. longipes*. Метанол виявився найбільш ефективним для екстракції поліфенолів, порівняно з етанолом та етилацетатом. Загалом, усі досліджені нами штами проявили значний антиоксидантний потенціал, що підкреслює важливість подальших досліджень хімічних характеристик їхніх антиоксидантних компонентів.

Результати підрозділу висвітлені у науковій публікації (Atamanchuk & Bisko, 2023b).

6.4. Вміст меланінів у біомасі штамів *Xylaria polymorpha*

Меланін – гетерогенний полімер фенольної або індольної природи з широким спектром біологічної активності: радіо- та фотозахисної, антиоксидантної, антивірусної, антимікробної, цитотоксичної та імуностимулюючої (Mohagheghpour et al., 2000; Mednick et al., 2005; Cunha et al., 2010). З такими характеристиками меланін має значний потенціал для застосування у біомедицині, нанотехнологіях та матеріалознавстві. Разом з тим, актуальним залишається пошук організмів, що продукують природний меланін.

Протягом останнього десятиліття значна увага дослідників була прикута до грибів як продуцентів цієї групи пігментів, оскільки відносна простота технології

вирощування створює потенціал для економічно вигідного промислового виробництва. Зокрема, *Xylaria polymorpha* є продуцентом одного з характерних для грибів відділу Ascomycota типів меланінів – DHN-меланіну (Pombeiro-Sponchiado et al., 2017). Відомо, що пігмент у цих грибів виробляється не тільки у відповідь на стресові чинники, але й під час антагоністичних взаємодій з іншими грибами в процесі колонізації субстрату. Однак, до цього часу існує мало інформації про продукування меланіну грибами роду *Xylaria* в культурі.

Метою даного дослідження було виділити, охарактеризувати та порівняти продуктивність синтезу природного меланіну штамами *X. polymorpha* та визначити фізико-хімічні характеристики отриманих пігментів. Для визначення вмісту меланінів нами було обрано штами виду *X. polymorpha*, оскільки для них спостерігалась інтенсивна пігментація при культивуванні на агаризованому живильному середовищі та рідкому середовищі у стаціонарній культурі.

В результаті виявлено, що з усіх досліджених штамів найвища продуктивність синтезу пігментів – $180,32 \pm 4,16$ мг/л була зафіксована для штаму IBK 2737 (рис. 6.4.1).

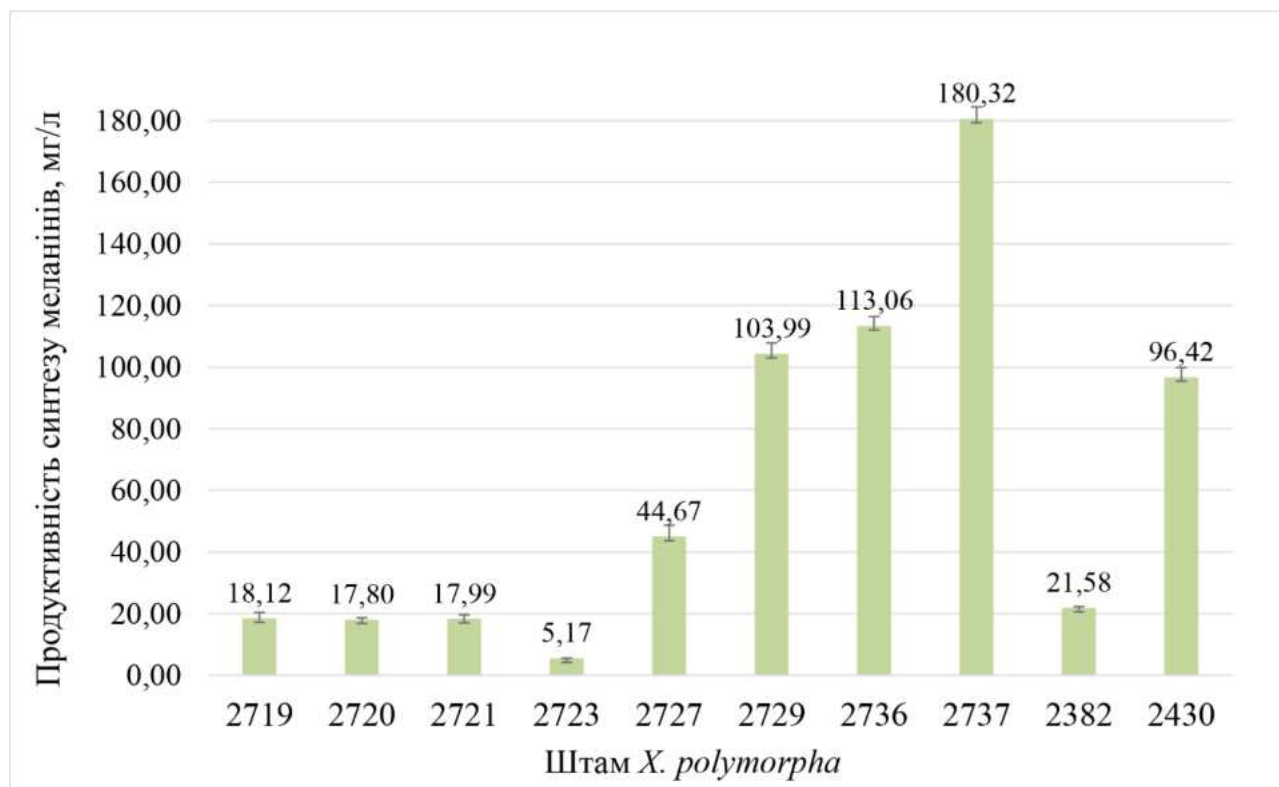


Рис. 6.4.1. Продуктивність синтезу меланінів штамами *X. polymorpha* на 30-ту добу стаціонарного культивування на середовищі ГПД за температури $26,0 \pm 1$ °С. Продуктивність розрахована як сума меланіну, екстрагованого з біомаси, що міститься в 1 л культуральної рідини.

Найнижча продуктивність синтезу спостерігалась для штаму ІВК 2723 – $5,17 \pm 0,36$ мг/л, хоча цей штам накопичував більше біомаси, а саме $14,78 \pm 0,01$ г/л проти $12,22 \pm 0,21$ г/л, накопичених штамом ІВК 2737 (табл. 6.4.1). Проте у цих штамів не було виявлено суттєвих відмінностей у морфології колоній та пігментації. Це свідчить про те, що синтез меланіну залежить від біологічних особливостей певного штаму. Тому доцільним є скринінг різних штамів для пошуку серед них продуцентів більшої кількості метаболітів, характеристики яких також можуть відрізнятися.

Таблиця 6.4.1

Кількісні показники меланіногенезу штамів *X. polymorpha* за умов стаціонарного культивування протягом 30 діб на рідкому живильному середовищі ГПД за температури 26 ± 1 °С

Штам	Кількість біомаси (г/л)	Значення рН *	Вміст меланіну у біомасі (мг/г)
2382	$10,35 \pm 0,10$	$6,86 \pm 0,13$	$3,00 \pm 0,09$
2430	$8,56 \pm 0,08$	$8,12 \pm 0,09$	$14,67 \pm 0,56$
2719	$13,37 \pm 0,07$	$6,52 \pm 0,09$	$2,33 \pm 0,29$
2720	$12,39 \pm 0,03$	$6,90 \pm 0,04$	$2,33 \pm 0,11$
2721	$12,63 \pm 0,17$	$6,86 \pm 0,05$	$2,33 \pm 0,22$
2723	$14,78 \pm 0,01$	$6,40 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,04$
2727	$11,93 \pm 0,08$	$6,73 \pm 0,02$	$6,00 \pm 0,57$
2729	$10,31 \pm 0,05$	$7,23 \pm 0,07$	$14,00 \pm 0,53$
2736	$8,74 \pm 0,06$	$8,09 \pm 0,06$	$15,33 \pm 0,43$
2737	$12,22 \pm 0,21$	$7,25 \pm 0,13$	$25,33 \pm 0,57$

Примітки: * Значення рН живильного середовища наприкінці культивування. Початкове значення рН – 6,0. Всі результати представлені як середнє значення трьох повторів \pm стандартне відхилення.

Одночасно з кількістю біомаси та пігментів наприкінці інкубаційного періоду вимірювали значення рН культуральної рідини. Результати демонструють зростання рН у процесі культивування. Найбільша різниця між початковим і кінцевим значеннями рН спостерігалась для штамів ІВК 2736 та ІВК 2430 (табл. 6.4.1). Відмічене нами зростання значень рН узгоджується з даними щодо культивування *X. polymorpha* за інших умов, наведеними в літературі, зокрема, з відомостями стосовно культивування штаму *X. polymorpha* на двох комплексних рідких середовищах різного складу: на основі томатного соку (ТJM) та соєвого шроту (SBS). Рівень рН зростав з від 6,2 до 8,6 та від 4,8 до 8,8 у процесі культивування на середовищах SBS та ТJM, відповідно (Liers et al., 2006). Подібне підвищення значень рН спостерігалось іншими дослідниками при вирощуванні *X. polymorpha* на дерев'яних блоках: від 4,3 до 5,7 на деревині бука та від 4,7 до 5,6 на деревині клена (Tudor et al., 2013).

Для підтвердження належності пігментів, що утворюються штамми *X. polymorpha* у процесі стаціонарного культивування, до меланінів ми застосовували комплексний підхід у вивченні їхніх фізико-хімічних властивостей, що включав хімічні тести на розчинність, якісні реакції та спектрометричні дослідження. Було з'ясовано, що одержані нами пігменти мають всі фізико-хімічні властивості, характерні для меланінів, а експериментальні дані, отримані нами узгоджуються з літературними. Результати діагностичних тестів пігменту, отриманого нами з біомаси *X. polymorpha*, у порівнянні з синтетичним L-ДОФА меланіном наведені в таблиці 6.4.2.

Таблиця 6.4.2

Фізико-хімічні властивості меланіну, екстрагованого з міцелільної біомаси штамів *X. polymorpha*, та синтетичного L-ДОФА меланіну

Реагент	L-ДОФА меланін (контроль)	Меланін з <i>X. polymorpha</i>
Вода дистильована	Нерозчинний	Нерозчинний
1М NaOH	Розчинний	Розчинний
1М HCl	Нерозчинний	Нерозчинний
Метанол	Нерозчинний	Нерозчинний
Етанол	Нерозчинний	Нерозчинний
Етилацетат	Нерозчинний	Нерозчинний
Хлороформ	Нерозчинний	Нерозчинний
Ацетон	Нерозчинний	Нерозчинний
ДМСО	Нерозчинний	Нерозчинний
1% FeCl ₃	Преципітація	Преципітація
1N HCl	Преципітація	Преципітація
1N H ₂ SO ₄	Преципітація	Преципітація
50% H ₂ O ₂	Окислення	Окислення
1%KMnO ₄	Окислення	Окислення

Одним із критеріїв належності пігменту до меланінів є його нерозчинність в органічних розчинниках і у воді в поєднанні з розчинністю в лужних розчинах (за винятком деяких типів меланінів) (Bell & Wheeler, 2003; Cao et al., 2021). Виділений нами пігмент розчинявся у NaOH і частково розчинявся у HCl, тоді як в органічних розчинниках (метанол, етанол, етилацетат, хлороформ, ацетон, ДМСО) розчинності не спостерігалось. Окрім того, розчини екстрагованого пігменту у концентрації 0,1 мг/мл в 1М NaOH окислювались і знебарвлювались з додаванням 50% H₂O₂. При додаванні KMnO₄ колір розчинів змінювався від коричневого до зеленого з подальшим знебарвленням і утворенням осаду. Додавання 1% FeCl₃ призводило до утворення коричневого осаду (рис. 6.4.2).

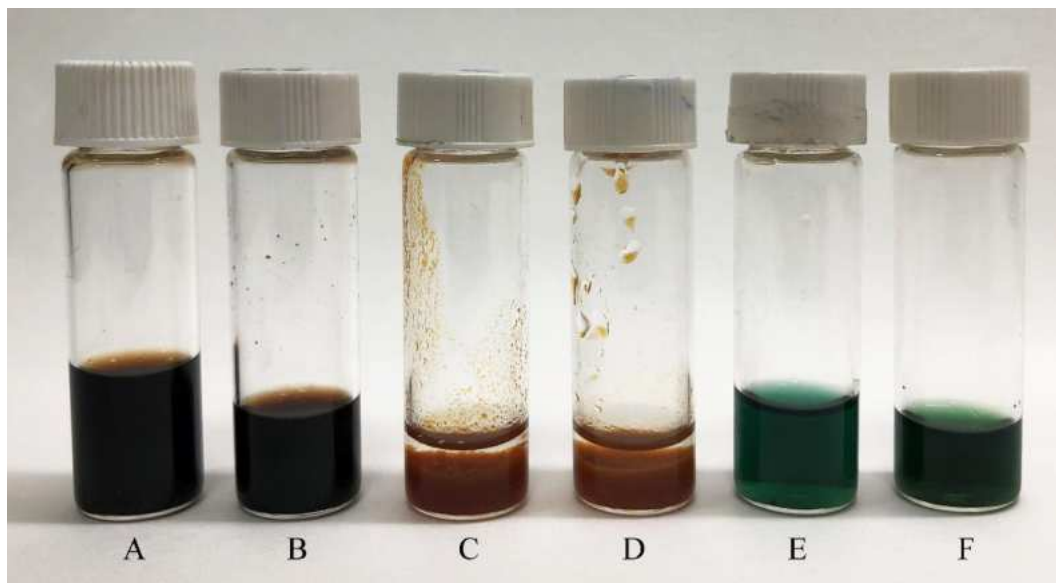


Рис. 6.4.2. Фізико-хімічні властивості меланінів: розчин меланіну, екстрагованого з біомаси *X. polymorpha* IBK 2737 (A) та L-ДОФА меланіну (B) у 1М NaOH у концентрації 0,1 мг/мл; утворення коричневого осаду при додаванні 1% FeCl₃ до розчину меланіну, екстрагованого з біомаси *X. polymorpha* IBK 2737 (C) та L-ДОФА меланіну (D); зміна забарвлення при додаванні 50% KMnO₄ до розчинів екстрагованого меланіну (E) та L-ДОФА меланіну (F).

Спектрофотометрія пігменту, екстрагованого з біомаси *X. polymorpha* IBK 2737, показала широкосмугове поглинання світла від 300 до 900 нм. Такий спектр є типовим профілем поглинання більшості меланінів, включаючи синтетичний L-ДОФА меланін, використаний нами у якості стандарту (рис. 6.4.3). Максимум поглинання спостерігався при 300 нм, після чого значення оптичної густини поступово зменшувались зі збільшенням довжини хвилі. Ці результати подібні до наведених у літературі, де найвищий рівень поглинання меланіну з грибів спостерігався в УФ-частині спектру в діапазоні 200–300 нм і зменшувався у напрямку до видимої частини спектру (Ellis & Griffiths, 1974; Singla et al., 2021; Doan et al., 2023).

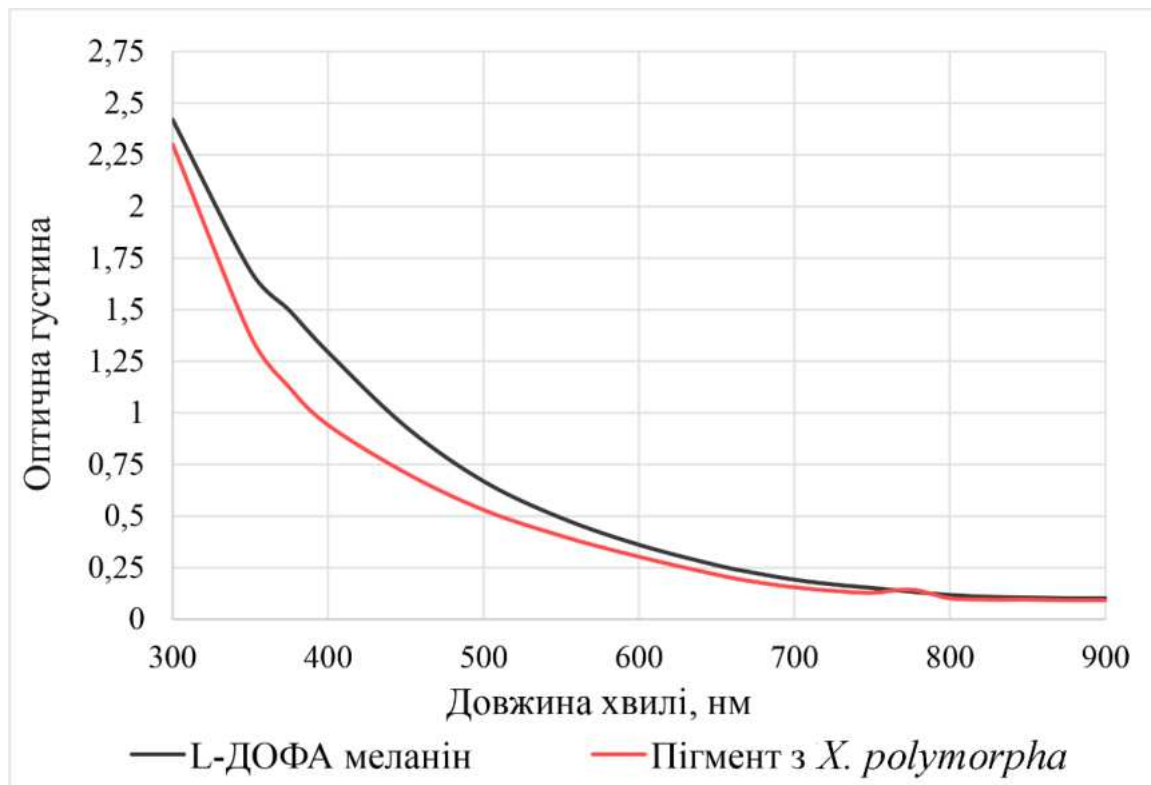


Рис. 6.4.3. Спектри поглинання пігменту, екстрагованого з біомаси *X. polymorpha* ІВК 2737 та синтетичного L-ДОФА-меланіну в 1М розчині NaOH (0,1 мг/мл) в УФ-та видимій частині спектру.

Окрім ультрафіолетової спектроскопії для дослідження хімічної природи виділеного пігменту нами був застосований метод Раман спектроскопії, який є сучасним аналітичним інструментом для якісної та кількісної оцінки неорганічних і органічних сполук. Метод заснований на ефекті комбінаційного розсіювання, що виникає при опроміненні монохроматичним лазером та пов'язаний із заповненням молекулярних обертальних і коливальних енергетичних рівнів. Спектр комбінаційного розсіювання відображає молекулярні переходи і містить смуги комбінаційного розсіювання, хвильове число яких зміщується від хвильового числа лазерного збурення, що вказує на певні хімічні зв'язки, молекулярні взаємодії та загальну молекулярну структуру (Jehlička et al., 2014; Tauber et al., 2018). Метод раманівської спектроскопії не вважається високочутливим методом аналізу молекулярного розсіювання порівняно з деякими іншими методами, проте є доступним і має ряд переваг при роботі з біологічними об'єктами.

У нашому дослідженні виділеного з біомаси штаму *X. polymorpha* ІВК 2737 пігменту з використанням Раман спектроскопії було зафіксовано три основні піки: $\nu_1 = 1240 \text{ см}^{-1}$, $\nu_2 = 1310 \text{ см}^{-1}$ та $\nu_3 = 1620 \text{ см}^{-1}$ (рис. 6.4.4), які згідно з літературними даними є характерними для меланінів, екстрагованих з грибів.

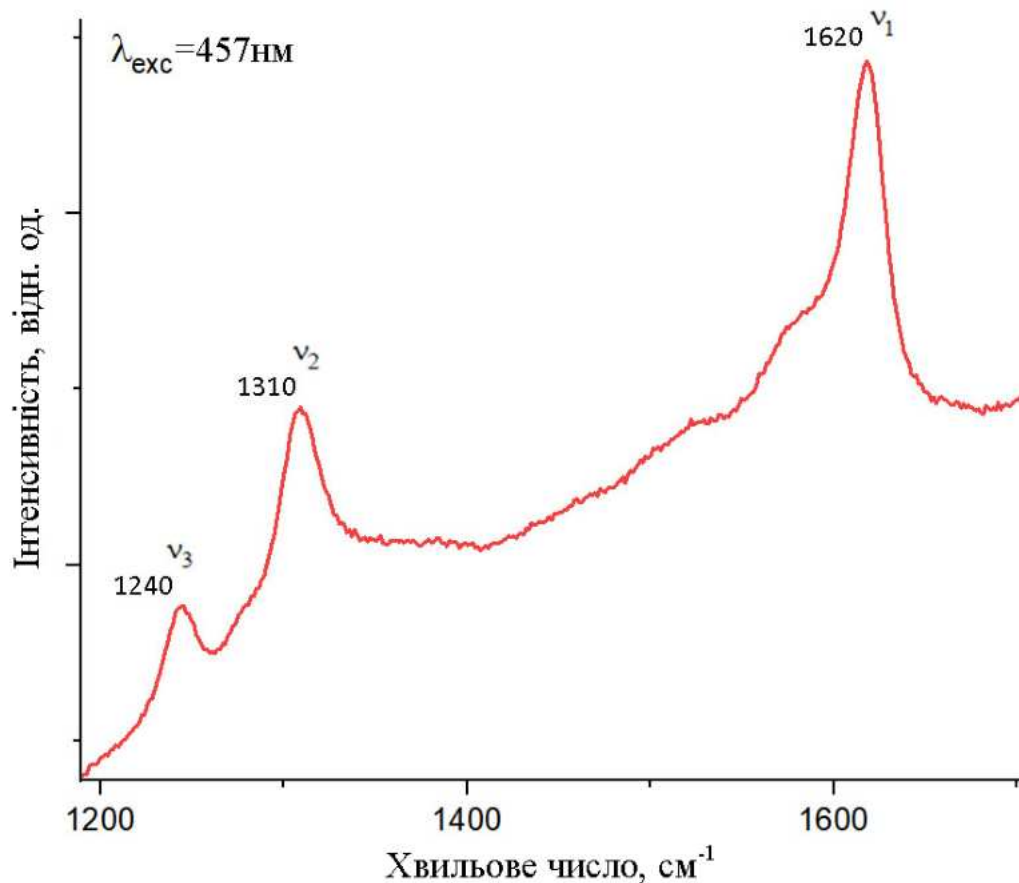


Рис. 6.4.4. Спектр комбінаційного розсіювання екстрагованого з біомаси штаму *X. polymorpha* ІВК 2737 пігменту. Зразок записаний при $\lambda_{\text{exc}}=457\text{нм}$. На рисунку зазначено частоту основних коливальних піків.

З літературних даних відомий спектр меланіну, екстрагованого з *Exidia nigricans* (With.) P. Roberts, для якого характерні два інтенсивні та широкі піки при $\nu_1 = 1640 \text{ см}^{-1}$ та $\nu_2 = 1240 \text{ см}^{-1}$ (для неочищеного меланіну) та $\nu_1 = 1620 \text{ см}^{-1}$ і $\nu_2 = 1230 \text{ см}^{-1}$ (для очищеного меланіну). Ці піки автор інтерпретує як такі, що виникають внаслідок коливання С-С зв'язків всередині ароматичних кілець, разом з С-Н коливаннями в метильних і метиленових групах (Łopusiewicz, 2018).

Отриманий нами спектр також дуже подібний до спектру комбінаційного розсіювання для меланіну, екстрагованого з грибів *Ochroconis lascauxensis* A. Nováková & P.M. Martin-Sanchez та *Ochroconis tshawytschae* (Doty & D.W. Slater) Kiril. & Al-Achmed (De La Rosa et al., 2017). Автори дослідження зазначають піки при $\nu_1 = 1608 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_2 = 1305 \text{ cm}^{-1}$ та $\nu_3 = 1250 \text{ cm}^{-1}$, які пов'язують з коливаннями груп C=O, C-C в ароматичних сполуках та коливаннями C-O гідроксильних груп, відповідно. Варто зауважити, що фактичний розподіл основних смуг меланіну залишається неузгодженим, оскільки, як уже зазначалось раніше, хімічна характеристика меланіну є комплексним складним завданням. Варто наголосити, що ідентичних структур меланіну в природі не існує, а їхній склад залежить не тільки від різноманітних мономерних одиниць, але й від процесу полімеризації (Culka et al., 2017). Проте Раман спектроскопія є цінним інструментом, який дозволяє встановити основні функціональні групи в хімічній структурі досліджуваних сполук та полегшити їх класифікацію.

Отже, за фізико-хімічними властивостями згідно якісних реакцій та спектрометричних досліджень, екстрагований нами пігмент із міцеліальної біомаси штамів *X. polymorpha* належить до меланінів. Найбільшу кількість пігменту синтезував штам *X. polymorpha* IBK 2737 – $25,33 \pm 0,57$ мг/г сухої біомаси.

Результати підрозділу висвітлено у науковій публікації (Atamanchuk & Bisko, 2024).

6.5. Антибактеріальна активність екстрактів біомаси та культуральної рідини штамів видів роду *Xylaria*

Зростаюча резистентність патогенних мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів є однією з глобальних проблем сучасності. Затверджений Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) перелік пріоритетних бактеріальних патогенів, проти яких є актуальним пошук нових антимікробних сполук, включає стійкі до антибіотиків мікроорганізми, які класифіковані за трьома рівнями: критичний, високий і середній (Tascionelli et al., 2018). Найбільш критичною є група

мультирезистентних бактерій, до яких належать *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* та різні бактерії з родини Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) (Theuretzbacher, 2013). Існує гостра потреба у пошуку нових антимікробних препаратів проти цих мікроорганізмів, і необхідним кроком у ньому є ідентифікація потенційних продуцентів біологічно активних речовин.

Гриби роду *Xylaria* є відомими продуцентами таких сполук, а їх тестування проти різних патогенних бактерій виявило значну антимікробну активність (Liu et al., 2008; Ramesh et al., 2012; Indarmawan et al., 2016; Suryelita et al., 2021; Yong et al., 2023; Santiago et al., 2021).

У нашому дослідженні в процесі визначення антибактеріальної дії різних екстрактів біомаси та культуральної рідини штамів видів роду *Xylaria* методом дифузії в агар нами було встановлено різну їх активність щодо таких тест-культур: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

У результаті було виявлено, що етилацетатні екстракти культуральної рідини досліджених штамів видів *Xylaria* проявляли більш виражений антибактеріальний ефект у порівнянні з метанольними екстрактами біомаси (табл. 6.5.1). Серед досліджених екстрактів біомаси різних видів лише для штамів *X. polymorpha* було зафіксовано інгібування росту тестових мікроорганізмів. Екстракти біомаси 6 штамів *X. polymorpha* проявляли антибактеріальну активність щодо *B. subtilis*, *P. aeruginosa* та *K. pneumoniae*. Зафіксовані зони затримки росту тест-культур складали від 10 до 14 мм (табл. 6.5.1).

Таблиця 6.5.1

Антибактеріальна активність метанольних екстрактів біомаси штамів
X. polymorpha щодо тест-культур мікроорганізмів

Штам	Діаметр зони затримки росту тест-культур (мм)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
2430	11±0,42	10±0,49	12±0,55
2720	12±0,52	10±0,52	12±0,41
2723	-	11±0,52	11±0,41
2727	11±0,49	14±0,42	-
2736	11±0,20	13±0,41	13±0,38
2737	11±0,31	13±0,26	12±0,42

Примітки: «-» – відсутність зон затримки росту мікроорганізмів. Вказані значення зон затримки росту включають діаметр диска (6 мм) та є середніми значеннями трьох незалежних експериментів ± стандартне відхилення.

Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які фіксували антимікробну дію етанольних екстрактів плодових тіл *X. polymorpha* проти *E. coli* ATCC 11230, *S. aureus* ATCC 6538P і *P. aeruginosa* ATCC 27853 із зонами затримки росту 14,6 мм, 13,8 мм та 12,6 мм, відповідно (Nacioglu et al., 2011). Зафіксовані нами зони інгібування росту мікроорганізмів також подібні до наведених у літературі для метанольних екстрактів плодових тіл *X. curta* (Ramesh et al., 2012). Автори фіксували такі зони затримки росту: *P. aeruginosa* MTCC 2488 – 11,5 мм, *S. aureus* MTCC 3160 – 12,5 мм, *E. coli* MTCC 4296 – 11,1 мм та *B. subtilis* (MTCC 619) – 10,0 мм.

У нашому дослідженні, на відміну від екстрактів біомаси, для екстрактів культуральної рідини антибактеріальна активність була зафіксована не лише для штамів *X. polymorpha*, а і для інших видів. До того ж екстракти культуральної рідини деяких штамів пригнічували ріст *E. coli* та *S. aureus* (табл. 6.5.2).

Таблиця 6.5.2

Антибактеріальна активність етилацетатних екстрактів культуральної рідини штамів видів роду *Xylaria* щодо тест-культур мікроорганізмів

Вид, штам	Діаметр зони затримки росту тест-культур (мм)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>X. carpophila</i> 2788	-	12±0,42	16±0,41	-	12±0,41
<i>X. ellisii</i> 2724	-	12±0,41	15±0,41	-	-
<i>X. hypoxylon</i> 2725	15±0,52	13±0,41	17±0,26	15±0,52	14±0,32
<i>X. longipes</i> 2716	12±0,41	11±0,38	12±0,27	-	-
<i>X. polymorpha</i> 2720	16±0,49	-	15±0,55	10±0,32	-
2723	-	-	-	-	-
2727	-	-	14±0,52	-	-
2736	11±0,41	-	15±0,41	-	10±0,20
2737	-	-	-	-	-
2430	-	-	-	-	-

Примітки: «-» – відсутність зон затримки росту мікроорганізмів. Вказані значення зон затримки росту включають діаметр лунки (6 мм) та є середніми значеннями трьох незалежних експериментів ± стандартне відхилення.

Слід відзначити штам *X. hypoxylon* ІВК 2725, екстракти культуральної рідини якого пригнічували ріст усіх тест-культур із зонами інгібування від 13±0,41 мм (*S. aureus*) до 17±0,26 мм (*P. aeruginosa*). У той же час для екстрактів біомаси цього штаму жодної активності зафіксовано не було. Можна припустити, що діючі речовини накопичуються у культуральній рідині при культивуванні даного об'єкту. Виявлена різниця антибактеріальної активності міцелію та культуральної рідини обумовлена, ймовірно, біосинтезом антибактеріальних сполук різної хімічної природи та/або їх концентрацією. Як відомо, *X. hypoxylon* є продуцентом ряду біологічно активних сполук, частина яких була виділена саме з культуральної

рідини. Наприклад, цитохалазини, похідні тетралону та α -пірони (Espada et al., 1997; Schüffler et al., 2007; Gu & Ding, 2008).

З літературних даних відомо також, що етанольні екстракти плодових тіл *X. hypoxylon* проявляли антимікробну активність проти 23 патогенних мікроорганізмів, у тому числі проти *B. subtilis* ATCC6633 та DSMZ1386, *E. coli* ATCC25922 та CFAI, *K. pneumonia*, *S. aureus* ATCC25923. Зони затримки росту мікроорганізмів у цьому дослідженні склали від 7 до 16 мм (Canli et al., 2016).

Існують дані про тритерпенові глікозиди, виділені з субстрату, ферментованого грибом *Xylaria* sp., який було виділено у культуру зі зразка, зібраного у Кайлуа (Гаваї). Ці сполуки проявляли активність проти *B. subtilis* ATCC 6051 та *S. aureus* ATCC 29213 із зонами інгібування 16 та 12 мм, відповідно. Втім з двох виділених сполук (названих колокозиди 1 та 2), лише перша проявляла антибактеріальну активність проти зазначених мікроорганізмів (Deugur et al., 2007). Інші автори повідомляють про біологічно активний кумарин, виділений із культуральної рідини в процесі культивування штаму ендоефітного виду *Xylaria* з *G. biloba*. Аміно-4-метилкумарин проявив значну інгібуючу активність проти *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia* sp., *Shigella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*. Найвищу ефективність ця сполука мала проти грам-негативної бактерії *Aeromonas hydrophila* зі значенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) 4 мг/мл (Liu et al., 2008).

Метанольні екстракти біомаси та етилацетатні екстракти культуральної рідини різних видів у нашому дослідженні були найбільш ефективними проти *P. aeruginosa* (за зонами затримки росту патогену та кількістю штамів видів роду *Xylaria*, що проявили антибактеріальну активність). Найбільші зони затримки росту *P. aeruginosa* для екстрактів культуральної рідини та біомаси склали $17 \pm 0,26$ мм для *X. hypoxylon* ІВК 2725 та $14 \pm 0,42$ мм для *X. polymorpha* ІВК 2727, відповідно (рис. 6.5.1).

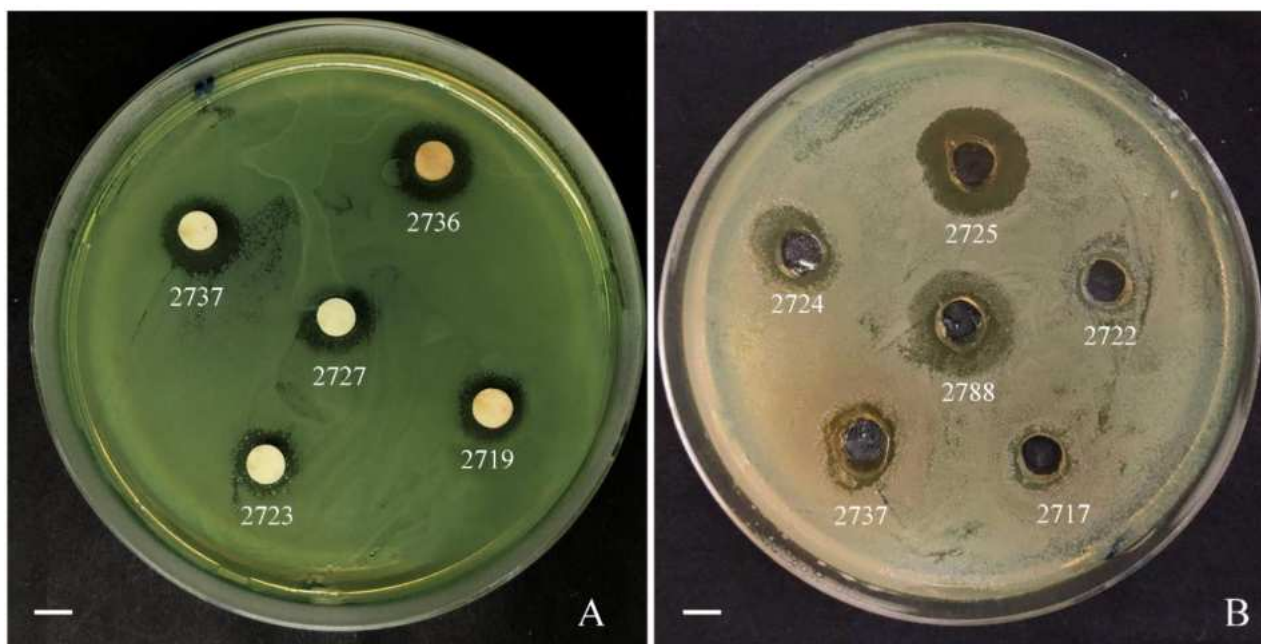


Рис. 6.5.1. Антибактеріальна активність метанольних екстрактів біомаси (А) та етилацетатних екстрактів культуральної рідини (В) штамів видів роду *Xylaria* проти *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Цифрами на рисунку позначені номери штамів. Довжина штрихів – 5 мм.

Ці результати є важливими з огляду на те, що *P. aeruginosa* має високу стійкість до більшості наявних антибіотиків, оскільки для цього мікроорганізму характерні практично всі відомі механізми антимікробної резистентності: знижена експресія хромосомної цефалоспориномицини *AmpC*; продукція плазмідних або інтегрон-опосередкованих β -лактамаз різних молекулярних класів (карбеніцилінази та β -лактамази розширеного спектру дії, що належать до класу А, оксацилінази класу D та карбапенем-гідролізуючих ферментів класу В); зниження проникності зовнішньої мембрани (втрата білків *OprD*); гіперекспресія активних ефлюксних систем з широким профілем субстратів; синтез ферментів, що модифікують аміноглікозиди (фосфорилтрансферази, ацетилтрансферази та аденілтрансферази); структурні зміни топоізомераз II і IV, що визначають стійкість до хінолонів (Strateva & Yordanov, 2009). Часто ці механізми діють одночасно, тим самим надаючи штамам *P. aeruginosa* мультирезистентності.

Враховуючи, що тест-культури у нашому дослідженні відносяться до групи мікроорганізмів з критичним і високим рівнем пріоритету щодо розробки нових ефективних і безпечних лікарських засобів антимікробної дії, отримані нами дані є важливими, а подальше поглиблення цього напрямку дослідження актуальним.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено культурально-морфологічні, фізіологічні та біосинтетичні характеристики 28 штамів 7 видів роду *Xylaria*, у тому числі 26 штамів, виділених здобувачем зі стром, зібраних у різних регіонах на території України. До Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (ІВК) депоновано 26 нових штамів 7 видів роду *Xylaria*.
2. Підтверджено видову приналежність 10 штамів 6 видів роду *Xylaria* з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) із застосуванням молекулярно-генетичних методів досліджень на основі нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера ядерної рДНК та генів, що кодують β -тубулін і другу субодиницю ДНК-залежної РНК-полімерази II. Результати молекулярно-філогенетичного аналізу узгоджуються з висновками, отриманими в результаті проведених досліджень морфологічних особливостей цих видів. Секвеновані послідовності генів усіх досліджених штамів було депоновано до бази даних GenBank.
3. Вивчення культурально-морфологічних особливостей 28 штамів 7 видів роду *Xylaria* на живильних середовищах різного складу дозволило встановити основні характеристики міцеліальних колоній та виявити їх значну штамову варіабельність. Видоспецифічними виявились такі характеристики колоній як текстура, край, пігментація колонії та реверзumu, форма та розміри строматичних утворень. Було встановлено, що морфологія колоній та швидкість радіального росту штамів у залежності від складу середовища істотно не змінювалась. За параметрами швидкості росту усі культури належали до повільно зростаючих.
4. У результаті дослідження впливу підвищених температур на життєздатність міцелію штамів видів роду *Xylaria* встановлено, що більшість штамів відновлювали ріст після інкубації за температури $36 \pm 0,1$ °C. Менше половини зберігало життєздатність після впливу температури $38 \pm 0,1$ °C. Штами *X. hypoxylon* були найменш стійкими до високих температур (міцелій не відновлював життєздатність

після інкубації за температури $36\pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Найбільш стійким виявився штам *X. ellisii* IBK 2724, який зберігав життєздатність після впливу температури $40\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

5. Вперше виявлено антагоністичну активність штамів видів роду *Xylaria* проти тест-культур *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium polonicum* та *Trichoderma viride*. Під час міжвидової взаємодії з *F. solani*, *M. plumbeus* і *C. albicans* більшість штамів видів роду *Xylaria* проявляли значну антагоністичну активність, частково або повністю обростаючи колонії зазначених грибів. Антагонізм штамів видів роду *Xylaria* щодо *A. niger* та *P. polonicum* у більшості випадків проявлявся у зупинці росту при безпосередньому контакті культур або на відстані. Найвищий індекс антагонізму за рейтинговою шкалою по відношенню до всіх тест-культур був зафіксований для штаму *X. polymorpha* IBK 2720 – 20 балів, найнижчий – для штаму *X. oxyacanthae* – 7,5 балів.

6. Аналіз динаміки синтезу біомаси, ендо- та екзополісахаридів культурами *X. polymorpha* та *X. longipes* виявив відмінності у синхронності цих процесів для різних штамів. Більшість штамів накопичувало найбільші кількості ендополісахаридів на 5-ту добу глибинного культивування. Проте найбільшу кількість ендополісахаридів серед усіх штамів було синтезовано на 7-му добу культивування штамом *X. polymorpha* IBK 2736 – $120\pm 6,67$ мг/г. Найвищий вміст екзополісахаридів – 1 г/л зафіксований для штамів *X. polymorpha* IBK 2720 та IBK 2736 на 9-ту добу глибинного культивування. Загалом штами *X. polymorpha* накопичували більшу кількість як ендо- так і екзополісахаридів, порівняно зі штамми *X. longipes*.

7. Вперше визначено динаміку вмісту фенольних сполук у біомасі та культуральній рідині штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes* при глибинному культивуванні. Найбільший вміст фенолів виявлено у метанольних екстрактах біомаси штаму *X. polymorpha* IBK 2736 на 9-ту добу культивування ($21,64\pm 0,03$ мг ГКЕ/г), найнижчий – у етилацетатних екстрактах культуральної рідини *X. polymorpha* IBK 2720 на 5-ту добу культивування ($0,07\pm 0,00$ мг ГКЕ/мл).

8. Досліджено вплив розчинників для екстракції на кількість екстрагованих фенольних сполук із біомаси штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes*. Метанол

виявився найбільш ефективним для екстракції поліфенолів, порівняно з етанолом та етилацетатом. Метанольні екстракти штамів *X. longipes*, які мали високий вміст фенольних сполук, демонстрували також високу активність знешкодження радикалів 2,2–дифеніл–1–пікрілгідразилу.

9. Вперше отримано дані щодо динаміки антиоксидантної активності різних екстрактів біомаси та культуральної рідини штамів видів *X. polymorpha* та *X. longipes* за умов глибинного культивування. Найвищий показник зафіксований у біомасі *X. longipes* ІВК 2718, екстрагованій метанолом на 9-ту добу культивування ($89,50 \pm 0,03\%$). Найнижчу антиоксидантну активність проявляв екстракт культуральної рідини *X. polymorpha* ІВК 2720 ($19,57 \pm 0,65\%$) на 5-ту добу культивування. Загалом, екстракти біомаси усіх досліджених штамів проявили значний антиоксидантний потенціал.

10. Виявлено значну кореляцію між антиоксидантною активністю та вмістом фенолів як у екстрактах біомаси, так і культуральної рідини кожного з досліджених штамів. Максимальне значення коефіцієнту кореляції Пірсона було відмічено для штаму *X. polymorpha* ІВК 2736 – 1.

11. Вперше отримано дані щодо вмісту та продуктивності синтезу меланінів штамами *X. polymorpha* за умов стаціонарного культивування. Найвища продуктивність синтезу цього пігменту була зафіксована для штаму ІВК 2737 і становила $180,32 \pm 4,16$ мг/л. Найнижча продуктивність синтезу спостерігалась для штаму ІВК 2723 – $5,17 \pm 0,36$ мг/л.

12. У результаті дослідження антибактеріальної активності штамів видів роду *Xylaria* з'ясовано, що етилацетатні екстракти культуральної рідини проявляли більш виражений антибактеріальний ефект у порівнянні з метанольними екстрактами біомаси. Екстракти біомаси 6 із 10 штамів *X. polymorpha* (ІВК 2720, 2723, 2727, 2736, 2737 та 2430) проявляли антибактеріальну активність щодо тест-культур *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* та *Pseudomonas aeruginosa*. Серед екстрактів культуральної рідини антибактеріальна активність була зафіксована не лише для перерахованих штамів *X. polymorpha*, а і для штамів *X. ellisii* ІВК 2724, *X. hypoxylon* ІВК 2725, *X. carpophila* ІВК 2788, *X. longipes* ІВК 2716. До того ж екстракти

культуральної рідини деяких штамів пригнічували ріст *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Найбільші зони затримки росту бактеріальних колоній відмічено для штаму *X. hyrochylon* ІВК 2725, екстракти культуральної рідини якого пригнічували ріст усіх перелічених мікроорганізмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акулов, О. Ю., & Гуков, В. С. (2015). Нові відомості про аскомікотові гриби Карпатського біосферного заповідника. *Матеріали наукової конференції «Історичні і сучасні аспекти вивчення біоти Карпат» присвяченої 60-річчю Високогірного біологічного стаціонару Львівського національного університету імені Івана Франка* (ст. 53–55). ЛНУ
2. Антоняк, Г. Л., Калинець-Мамчур, З. І., Дудка, І. О., Бабич, Н. О., & Панас, Н. Є. (2013). *Екологія грибів*. ЛНУ
3. Атаманчук, А. (2022). Антагоністичні властивості *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. проти *Aspergillus niger* Tiegh., *Mucor racemosus* Fresen. та *Penicillium polonicum* K.W. Zaleski. «Актуальні проблеми ботаніки та екології»: матеріали міжнародної конференції молодих учених (с.55). LAT & K
4. Атаманчук, А. (2023). Культурально-морфологічна характеристика та антагоністичні властивості *Xylaria carpophila* (Pers.) Fr (Pers.) Fr. «Актуальні проблеми ботаніки та екології»: матеріали міжнародної конференції молодих учених (с.47). Супрун В.П.
5. Билай, В. И. (1982). *Методы экспериментальной микологии*. Наукова думка.
6. Бисько, Н. А., Бабицкая, В. Г., Бухало, А. С., Круподерова, Т. А., Ломберг, М. Л., Михайлова, О. Б., Пучкова, Т. А., Соломко, Э. Ф., & Щерба, В. В. (2011). *Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре* (т.1–2). Альтерпрес.
7. Бисько, Н. А., Бухало, А. С., Вассер, С. П., Дудка, И. А., Кулеш, М. Д., Соломко, Э. Ф., & Шевченко, С. В. (1983). *Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре*. Наукова думка.
8. Бухало, А. (1988). *Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре*. Наукова думка.
9. Гуков, В. С. (2017). Перші відомості про поширення *Xylaria vasconica* J. Fourn. Et M. Stadler в Україні. *Матеріали XII Міжнародної наукової конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*(с.158-159). ФОП Шаповалова Т.М.

10. Дудка, І. О., Гелюта, В. П., Андріанова, Т. В., Гайова, В. П., Тихоненко, Ю. Я., Придюк, М. П., Голубцова, Ю. І., Кривомаз, Т. І., Джаган, В. В., Леонтьєв, Д. В., Акулов, О. Ю., & Сивоконь, О. В. (2009). *Гриби заповідників та національних природних парків Лівобережної України*. Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України.
11. Дудка, І. О., Придюк, М. П., Литвиненко, Ю., Андріанова, Т. В., & Карпенко, К. К. (2009). *Гриби та грибоподібні організми Національного природного парку «Деснянсько-Старогутський»*. Університетська книга.
12. Жданова, Н. Н., & Василевская, А. И. (1982). *Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте*. Наукова думка.
13. Круподьрова, Т. А. (2009). *Біологічні особливості *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. Та *G. lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. В культурі* [Дс. канд. біол. наук]. Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.
14. Ломберг, М. Л. (2005). *Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі*. [Дис.канд.біол.наук]. Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.
15. Ломберг, М. Л. (2017). *Морфолого-культуральні властивості рідкісних видів грибів *Hericium coralloides* та *Hericium alpestre* (Hericiaceae) з Покутських Карпат*. 237–243.
16. Медведєв, Д. Г. (2020). *Біологія деяких видів роду *Huromyces* (Fr.) Tul. & C. Tul. Та його анаморф *Cladobotryum* – збудників павутинної цвілі печериці в Україні* [Дис. канд. біол. наук]. Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.
17. Михайлова, О. Б., & Бухало, А. С. (2005). *Мікроструктури міцелію представників Morchellaceae (Ascomycota)*. *Український Ботанічний Журнал*, 62(6), 790–796.
18. Михайлова, О. Б., Григанський, А. П., Ломберг, М. Л., & Бісько, Н. А. (2017). *Морфолого-культуральні властивості рідкісного лікарського гриба *Sparassis crispa* (Sparassidaceae, Polyporales)*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 550–558. https://doi.org/10.15421/2017_159
19. Молотов, А. С. (1965). *Элементы вариационной статистики*. Колос.

20. Морочковський, С. Ф., Зерова, М. Я., Лавітська, З. Г., & Сміцька, М. Ф. (1969). *Визначник грибів України* (т. 2). Наукова думка.
21. Смицкая, М. Ф., Смык, Л. В., & Мережко, Т. А. (1986). *Определитель пиреномицетов УССР*. Наукова думка.
22. Соломко, Е. Ф., Ломберг, М. Л., & Митропольська, Н. Ю. (2000). Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на середовищах різного складу. *Український Ботанічний Журнал*, 57(2), 119–126.
23. Эбрахимзаде, М. А., Халили, М., & Депур, А. А. (2019). Экстракты этилацетата и метанола из трех морских водорослей и их потенциальная антиоксидантная активность *in vitro*. *Algologia*, 29(1), 30–39. <https://doi.org/10.15407/alg29.01.030>
24. Abate, D., Abraham, W.-R., & Meyer, H. (1997). Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*. *Phytochemistry*, 44(8), 1443–1448. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00780-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00780-7)
25. Adeboya, M., Edwards, R. L., Laessoe, T., Maitland, D. J., & Whalley, A. S. J. (1995). Cheminform abstract: metabolites of the higher fungi. part 28. globoscinic acid and globoscin, a labile acid-lactone system from *Xylaria globosa* and *Xylaria obovata*. *ChemInform*, 26(51). <https://doi.org/10.1002/chin.199551281>
26. Adnan, M., Patel, M., Reddy, M. N., & Alshammari, E. (2018). Formulation, evaluation and bioactive potential of *Xylaria primorskensis* terpenoid nanoparticles from its major compound xylaranic acid. *Scientific Reports*, 8(1), 1740. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20237-z>
27. Ahmed, F. A., & Jahan, N. (2018). Optimization of culture condition, phytoconstituents and cytotoxicity of *Xylaria hypoxylon* (L.) Grev. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 6(2), 1–9. <https://doi.org/10.3329/jujbs.v6i2.36585>
28. Ali Al-Mamary, M., & Moussa, Z. (2021). Antioxidant activity: the presence and impact of hydroxyl groups in small molecules of natural and synthetic origin. In V.

Waisundara (Ed.), *Antioxidants—Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95616>

29. Amarowicz, R., Troszyńska, A., Baryłko-Pikielna, N., & Shahidi, F. (2004). Polyphenolics extracts from legume seeds: Correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*, 11(4), 278–286. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2004.01143.x>

30. Atamanchuk, A. (2023). Antioxidant activity of biomass extracts of *Xylaria longipes* Nitschke strains under submerged conditions. “*Biotechnology of the 21st century*”: materials of the 17th International scientific and practical conference (pp. 32–34). Igor Sikorsky KPI

31. Atamanchuk, A., & Bisko, N. (2022a). Dynamics of biomass and exopolysaccharides production by *Xylaria polymorpha* in submerged culture. In O. Vasyliuk (Ed.), “*Youth and modern problems of microbiology and virology*”: materials of the IV young scientists conference (p.6). Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine

32. Atamanchuk, A., & Bisko, N. (2022b). Cultural and morphological characteristics of wood-inhabiting *Xylaria* species from Ukraine. *Plant & Fungal Research*, 5(2), 11–19. <https://doi.org/10.30546/2664-5297.2022.2.11>

33. Atamanchuk, A., & Bisko, N. (2023a). Dynamics of the phenolic constituents and antioxidant activity in submerged cultures of *Xylaria* species. *Biotechnologia Acta*, 16(6), 82–87. <https://doi.org/10.15407/biotech16.06.082>

34. Atamanchuk, A., & Bisko, N. (2023b). Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant capacity in *Xylaria polymorpha* and *Xylaria longipes* strains. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology*, 94(3), 5–9. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.5-9>

35. Atamanchuk A., & Bisko, N. (2023c). Growth of *Xylaria polymorpha* in submerged culture. “*Modern approaches in the study of the plant kingdom*”: materials of the international scientific-practical conference dedicated to the “*Year of Heydar Aliyev*” (pp.

114–115). Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan Institute of Botany.

36. Atamanchuk, A. R., & Bisko, N. A. (2024). Isolation and characterisation of melanin pigment from mycelial cultures of *Xylaria polymorpha* (Ascomycota). *Ukrainian Botanical Journal*, *81*(1), 8–15. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj81.01.008>
37. Atamanchuk, A., Bisko, N., & Al-Maali, G. (in press). Antagonistic activity of wood-inhabiting *Xylaria* species against other fungi in dual culture experiments. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9529>
38. Auerswald, B. (1868). *Xylaria fuckelii* Nke. *Hedwigia*, 135–136.
39. Awad, N. E., Kassem, H. A., Hamed, M. A., El-Feky, A. M., & El-Naggar, M. A. A. (2018). Hepatoprotective evaluation and isolation of the major secondary metabolites from the ethyl acetate extract of liquid culture filtrate of *Chaetomium globosum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.120>
40. Babitskaya, V. G., Shcherba, V. V., & Lkonnikova, N. V. (2000). Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *36*(4), 377–381. <https://doi.org/10.1007/BF02738046>
41. Badalyan, S., Innocenti, G., & Garibyan, N. (2002). Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*, *41*, 220–225.
42. Badalyan, S., Innocenti, G., & Garibyan, N. (2004). Interactions between xylotrophic mushrooms. *Phytopathologia Mediterranea*, *43*, 44–48.
43. Bell, A. A., & Wheeler, M. (2003). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, *24*, 411–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>
44. Bhanja Dey, T., Chakraborty, S., Jain, K. Kr., Sharma, A., & Kuhad, R. C. (2016). Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *53*, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.007>

45. Bisko, N., Lomberg, M., Mykchaylova, O., & Mytropolska, N. (2023). *IBK Mushroom Culture Collection* [dataset]. The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany. <https://doi.org/10.15468/DZDSQU>
46. Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., & Kauserud, H. (2013). ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, *13*(2), 218–224. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>
47. Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, *31*(3), 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683.x>
48. Bohni, N., Schumpp, O., Schnee, S., Bertrand, S., Gindro, K., & Wolfender, J. (2013). Targeted isolation of induced and bioactive metabolites from fungal co-cultures. *Planta Medica*, *79*(13). <https://doi.org/10.1055/s-0033-1351867>
49. Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (2001). Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*. *Journal of Natural Products*, *64*(7), 965–967. <https://doi.org/10.1021/np000291p>
50. Bravo, L. (2009). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
51. Brunner, F., & Petrini, O. (1992). Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. *Mycological Research*, *96*(9), 723–733. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80440-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80440-1)
52. Buchalo, A., & Didukh, M. (2005). Micromorphological characteristics of culinary-medicinal mushroom and fungi cultures. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *7*, 249–262. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v7.i12.240>
53. Buchalo, A. S., Mykchaylova, O. B., Lomberg, M. L., & Wasser, S. P. (2009). *Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure cultures*. Alterpress
54. Callan, B. E., & Rogers, J. D. (1993). *A synoptic key to Xylaria species from continental United States and Canada based on cultural and anamorphic features*. *46*, 141–154.

55. Campbell, Alex. H. (1933). Zone lines in plant tissues. I. The black lines formed by *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. in hardwoods. *Annals of Applied Biology*, 20(1), 123–145. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1933.tb07431.x>
56. Canli, K., Akata, I., & Altuner, E. M. (2016). *In vitro* antimicrobial activity screening of *Xylaria hypoxylon*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4), 42–46. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.7>
57. Cañón, E. R. P., De Albuquerque, M. P., Alves, R. P., Pereira, A. B., & Victoria, F. D. C. (2019). Morphological and molecular characterization of three endolichenic isolates of *Xylaria* (*Xylariaceae*), from *Cladonia curta* Ahti & Marcelli (*Cladoniaceae*). *Plants*, 8(10), 399. <https://doi.org/10.3390/plants8100399>
58. Cao, W., Zhou, X., McCallum, N. C., Hu, Z., Ni, Q. Z., Kapoor, U., Heil, C. M., Cay, K. S., Zand, T., Mantanona, A. J., Jayaraman, A., Dhinojwala, A., Deheyn, D. D., Shawkey, M. D., Burkart, M. D., Rinehart, J. D., & Gianneschi, N. C. (2021). Unraveling the structure and function of melanin through synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 143(7), 2622–2637. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12322>
59. Castillo, G., Nihoul, A., & Demoulin, V. (2004). Correlation between the *in vitro* growth response to temperature and the habitat of some lignicolous fungi from Papua New Guinea coastal forests. *Cryptogamie mycologie*, 57–81.
60. Chacko, R. J., & Rogers, J. D. (1981). Cultural characteristics of some species of *Xylaria*. *Mycologia*, 73(3), 415–428. <https://doi.org/10.1080/00275514.1981.12021364>
61. Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact: Second edition. In *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact* (p. 451).
62. Chen, J., Zhang, L.-C., Xing, Y.-M., Wang, Y.-Q., Xing, X.-K., Zhang, D.-W., Liang, H.-Q., & Guo, S.-X. (2013). Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (*Orchidaceae*). *Plos One*, 8(3), 58268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058268>
63. Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., & Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00419-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00419-3)

64. Chou, K., Liu, J., Hsiao, H.-I., & Lu, X. (2023). *Quantitative microbial spoilage risk assessment of Aspergillus niger in white bread supply chain* [Preprint]. SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4455131>
65. Chun, J., So, K.-K., Ko, Y.-H., Kim, J.-M., & Kim, D.-H. (2019). Comparative transcriptomic analysis of MAPK-mediated regulation of sectorization in *Cryphonectria parasitica*. *Molecules and Cells*, 42(4), 363–375. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0019>
66. Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
67. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M., & Falkinham. (2004). *Collins and Lyne's microbiological methods* (8th ed). Arnold.
68. Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., & Berghe, D. V. (1998). Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1), 71–76. <https://doi.org/10.1021/np970237h>
69. Croft, K. D. (1998). The Chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 435–442. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
70. Culka, A., Jehlička, J., Ascaso, C., Artieda, O., Casero, C. M., & Wierzechos, J. (2017). Raman microspectrometric study of pigments in melanized fungi from the hyperarid Atacama desert gypsum crust. *Journal of Raman Spectroscopy*, 48(11), 1487–1493. <https://doi.org/10.1002/jrs.5137>
71. Dagne, E., Gunatilaka, A. A. L., Asmellash, S., Abate, D., Kingston, D. G. I., Hofmann, G. A., & Johnson, R. K. (1994). Two new cytotoxic cytochalasins from *Xylaria obovata*. *Tetrahedron*, 50(19), 5615–5620. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)85632-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)85632-5)
72. Davis, E. C., Franklin, J. B., Shaw, A. J., & Vilgalys, R. (2003). Endophytic *Xylaria* (*Xylariaceae*) among liverworts and angiosperms: Phylogenetics, distribution, and

- symbiosis. *American Journal of Botany*, 90(11), 1661–1667.
<https://doi.org/10.3732/ajb.90.11.1661>
73. De La Rosa, J. M., Martin-Sanchez, P. M., Sanchez-Cortes, S., Hermosin, B., Knicker, H., & Saiz-Jimenez, C. (2017). Structure of melanins from the fungi *Ochroconis lascauxensis* and *Ochroconis anomala* contaminating rock art in the Lascaux Cave. *Scientific Reports*, 7(1), 13441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13862-7>
74. Doan, L., Vo, N. K. H., & Tran, H. T. M. (2023). Initial study on physiochemical property and antibacterial activity against skin-infecting bacteria of silver nanoparticles biologically produced using crude melanin from *Xylaria* sp. *Cosmetics*, 10(6), 150. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10060150>
75. Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135(3), 950–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.058>
76. Dullah, S., Hazarika, D. J., Parveen, A., Kakoti, M., Borgohain, T., Gautom, T., Bhattacharyya, A., Barooah, M., & Boro, R. C. (2021). Fungal interactions induce changes in hyphal morphology and enzyme production. *Mycology*, 12(4), 279–295. <https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1932627>
77. Elias, L. M., Fortkamp, D., Sartori, S. B., Ferreira, M. C., Gomes, L. H., Azevedo, J. L., Montoya, Q. V., Rodrigues, A., Ferreira, A. G., & Lira, S. P. (2018). The potential of compounds isolated from *Xylaria* spp. As antifungal agents against anthracnose. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.03.003>
78. Ellis, D. H., & Griffiths, D. A. (1974). The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 20(10), 1379–1386. <https://doi.org/10.1139/m74-212>
79. Ellis, J. B., & Everhart, B. M. (Benjamin M. (1892). *The North American Pyrenomycetes. A contribution to mycologic botany.* Ellis & Everhart. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/64201>

80. Espada, A., Rivera-Sagredo, A., De La Fuente, J. M., Hueso-Rodríguez, J. A., & Elson, S. W. (1997). New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. *Tetrahedron*, 53(18), 6485–6492. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00305-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00305-0)
81. Falconer, R., Bown, J., White, N., & Crawford, J. (2007). Modelling interactions in fungi. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 5, 603–615. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.1210>
82. Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783. <https://doi.org/10.2307/2408678>
83. Fenwick, G. A. (1994). *Xylaria polymorpha* in laboratory culture. *Mycologist*, 8, 166–168.
84. Fernando, M. D. M., Wijesundera, R. L. S., Soysa, S. S. B. D. P., De Silva, E. D., & Nanayakkara, S. M. (2017). Antioxidant potential and content of the polyphenolic secondary metabolites of white rot macrofungi; *Flavodon flavus* (Klotzsch.) and *Xylaria feejeensis* (Berk.). *SDRP Journal of Plant Science*, 1(1). <https://doi.org/10.25177/JPS.1.1.2>
85. Filotas, M. J., & Hajek, A. E. (2007). Variability in thermal responses among *Furia* gastropachae isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.03.002>
86. Fogarty, W. M. (1994). Enzymes of the genus *Aspergillus*. In J. E. Smith (Ed.), *Aspergillus* (pp. 177–218). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2411-3_7
87. Fournier, J., Flessa, F., Peršoh, D., & Stadler, M. (2011). Three new *Xylaria* species from southwestern Europe. *Mycological Progress*, 10(1), 33–52. <https://doi.org/10.1007/s11557-010-0671-8>
88. Fries, E. (1821). *Systema mycologicum: Sistens fungorum ordines, genera et species, huc usque cognitae, quas ad normam methodi naturalis determinavit*. Ex Officina Berlingiana,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5378>
89. Fries, E. (1851). *Novae symbolae mycologicae: In peregrinis terris a botanicis danicis collectae*. Excudit C.A. Leffler Reg. Acad. Typographus,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.112967>

90. Frisvad, J. C., Andersen, B., & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112(2), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.018>
91. Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygodlo, J., & Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(6), 348–354.
92. Garcia, I. M., S., A. R., Montero, D., & Arellano, M. (2020). Evaluation of total polyphenols and antioxidant capacity in mushroom extracts *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 96–99. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2020v12i2.37499>
93. Gautam, A. K., Sharma, S., Avasthi, S., & Bhadauria, R. (2011). Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: An important spoilage fungi. *Research Journal of Microbiology*, 6(3), 270–280. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.270.280>
94. Gloer, J. B. (1995). The chemistry of fungal antagonism and defense. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1265–1274. <https://doi.org/10.1139/b95-387>
95. Goodman, S., & Zimmer, W. (2007). Cytoskeleton. *Medical Cell Biology: Third Edition*, 59–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370458-0.50008-6>
96. Gow, N. A. R., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 5.3.01. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
97. Gu, W., & Ding, H. (2008). Two new tetralone derivatives from the culture of *Xylaria hypoxylon* AT-028. *Chinese Chemical Letters*, 19(11), 1323–1326. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2008.09.006>
98. Gugnani, H. C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Frontiers in Bioscience*, 8(6), s346-357. <https://doi.org/10.2741/1002>
99. Guilhermetti, E., Takahachi, G., Shinobu, C. S., & Svidzinski, T. I. E. (2007). *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *International Journal of Dermatology*, 46(8), 822–826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03120.x>

100. Guo, Y.-J., Deng, G.-F., Xu, X.-R., Wu, S., Li, S., Xia, E.-Q., Li, F., Chen, F., Ling, W.-H., & Li, H.-B. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food & Function*, 3(11), 1195. <https://doi.org/10.1039/c2fo30110e>
101. Hacıoglu, N., Akata, I., & Dulger, B. (2011). Antimicrobial potential of *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 728–730. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.582>
102. Hamzah, T. N. T., Lee, S. Y., Hidayat, A., Terhem, R., Faridah-Hanum, I., & Mohamed, R. (2018). Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01707>
103. Hansen, L., & Knudsen, H. (2000). *Nordic Macromycetes. Vol. 1. Ascomycetes*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83792425>
104. Hashemi, S. A., Zare, R., Khodaparast, S. A., & Elahinia, S. A. (2015). A new *Xylaria* species from Iran. *Mycologia Iranica*, 2(1). <https://doi.org/10.22043/mi.2015.13603>
105. Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Fruiting body, spores and *in vitro* produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International*, 46(1), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.009>
106. Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 125–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2>
107. Hsieh, H.-M., Lin, C.-R., Fang, M.-J., Rogers, J. D., Fournier, J., Lechat, C., & Ju, Y.-M. (2010). Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily *Xylarioideae* (*Xylariaceae*) and phylogeny of the taxa involved in the

- subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(3), 957–969. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.12.015>
108. Hu, Z., Li, Y., Huang, Y., Su, W., & Shen, Y. (2008). Three new sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*, 91(1), 46–52. <https://doi.org/10.1002/hlca.200890011>
109. Humphris, S. N., Wheatley, R. E., & Bruce, A. (2001). The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. *Holzforschung*, 55(3), 233–237. <https://doi.org/10.1515/HF.2001.038>
110. Ibrahim, A., Tanney, J. B., Fei, F., Seifert, K. A., Cutler, G. C., Capretta, A., Miller, J. D., & Sumarah, M. W. (2020). Metabolomic-guided discovery of cyclic nonribosomal peptides from *Xylaria ellisii* sp. nov., a leaf and stem endophyte of *Vaccinium angustifolium*. *Scientific Reports*, 10(1), 4599. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61088-x>
111. Indarmawan, T., Mustopa, A. Z., Budiarto, B. R., & Tarman, K. (2016). Antibacterial activity of extracellular protease isolated from an algicolous fungus *Xylaria psidii* KT30 Against gram-positive bacteria. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(2), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.06.005>
112. Isaka, M., Yangchum, A., Auncharoen, P., Srichomthong, K., & Srikitikulchai, P. (2011). Ring B aromatic norpimarane glucoside from a *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products*, 74(2), 300–302. <https://doi.org/10.1021/np100873t>
113. Jang, Y.-W., Lee, I.-K., Kim, Y.-S., Seok, S.-J., Yu, S.-H., & Yun, B.-S. (2009). Chemical constituents of the fruiting body of *Xylaria polymorpha*. *Mycobiology*, 37(3), 207–210. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.207>
114. Jehlička, J., Edwards, H. G. M., & Oren, A. (2014). Raman spectroscopy of microbial pigments. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3286–3295. <https://doi.org/10.1128/AEM.00699-14>
115. Jennings, D. H. (1995). *The Physiology of Fungal Nutrition* (1st ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525421>

116. Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 345–358. <https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
117. Ju, Y.-M., & Hsieh, H.-M. (2007). *Xylaria* species associated with nests of *Odontotermes formosanus* in Taiwan. *Mycologia*, 99(6), 936–957.
118. Ju, Y.-M., Rogers, J. D., & Hsieh, H.-M. (2018). *Xylaria* species associated with fallen fruits and seeds. *Mycologia*, 110(4), 726–749. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1469879>
119. Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 153–161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x>
120. Kerry, E. (1990). Effects of temperature on growth rates of fungi from subantarctic Macquarie Island and Casey, Antarctica. *Polar Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1007/BF00238428>
121. Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5344-5>
122. Khalil, A. M. A., Hashem, A. H., & Abdelaziz, A. M. (2019). Occurrence of toxigenic *Penicillium polonicum* in retail green table olives from the Saudi Arabia market. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101314. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101314>
123. Kim, J., & Sudbery, P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, 49(2), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>
124. Kim, T. Y., Jang, J. Y., Yu, N. H., Chi, W. J., Bae, C., Yeo, J. H., Park, A. R., Hur, J., Park, H. W., Park, J., Park, J., Lee, S. K., & Kim, J. (2018). Nematicidal activity of grammicin produced by *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*. *Pest Management Science*, 74(2), 384–391. <https://doi.org/10.1002/ps.4717>

125. Kirk, P.F., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (Eds) (2008) Dictionary of the fungi (10th ed.). CABI.
126. Koka, J. A., Bhat, M. Y., & Wani, A. H. (2021). *In vitro* efficacy of fungicides on mycelial growth and spore germination of *Alternaria alternata* and *Mucor plumbeus*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(3), 17–22. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i3.4692>
127. Kollef, M., Micek, S., Hampton, N., Doherty, J. A., & Kumar, A. (2012). Septic Shock Attributed to *Candida* Infection: Importance of Empiric Therapy and Source Control. *Clinical Infectious Diseases*, 54(12), 1739–1746. <https://doi.org/10.1093/cid/cis305>
128. Krupodorova, T. A., Barshteyn, V. Yu., Kizitska, T. O., Ratushnyak, V., & Blume, Y. B. (2023). Antagonistic activity of selected macromycetes against two harmful micromycetes. *Czech Mycology*, 75(1), 85–100. <https://doi.org/10.33585/cmy.75106>
129. Krupodorova, T., Barshteyn, V., & Pokas, O. (2021). Antagonistic effectiveness of Macromycetes against *Candida albicans* strains and *Issatchenkia orientalis*. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 20, 760. <https://doi.org/10.36547/nbc.760>
130. Krupodorova, T., Barshteyn, Vy., & Sekan, A. (2021). Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 11(1), 494–531. <https://doi.org/10.5943/cream/11/1/34>
131. Lacap, D. C., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2003). *An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences*. 12, 53–66.
132. Læssøe, T. (1987). *Xylaria corniformis* reconsidered. *Mycotaxon*, 30, 81–85.
133. Laessøe, T., & Lodge, D. J. (1994). Three host-specific *Xylaria* species. *Mycologia*, 86(3), 436–446. <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026431>
134. Lee, I.-K., Kim, Y.-S., Jang, Y.-W., Jung, J.-Y., & Yun, B.-S. (2007). New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(24), 6678–6681. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.072>

135. Lee, J. S., Ko, K. S., & Jung, H. S. (2000). Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 187(1), 89–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09142.x>
136. Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K. T., Hatakka, A., & Hofrichter, M. (2006). Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5), 573–579. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0010-1>
137. Lindahl, B. D., & Finlay, R. D. (2006). Activities of chitinolytic enzymes during primary and secondary colonization of wood by basidiomycetous fungi. *New Phytologist*, 169(2), 389–397. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01581.x>
138. Linh, D. T. P., Hien, B. T. T., Que, D. D., Lam, D. M., Arnold, N., Schmidt, J., Porzel, A., & Quang, D. N. (2014). Cytotoxic constituents from the vietnamese fungus *Xylaria schweinitzii*. *Natural Product Communications*, 9(5). <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900518>
139. Linné, C. von. (1753). *Species plantarum: Exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas: Vol. t.1 (1753)*. Junk. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/84235>
140. Litwinienko, G., & Ingold, K. U. (2007). Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Accounts of Chemical Research*, 40(3), 222–230. <https://doi.org/10.1021/ar0682029>
141. Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Yan, G. (2007). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. From *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, 105(2), 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.008>
142. Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Zhou, J. (2008). Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 241–247. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1305-1>

143. Lodato, F., Tamé, M. R., Montagnani, M., Sambri, V., Liguori, G., Azzaroli, F., Costigliola, P., Grazi, G., Roda, E., & Mazzella, G. (2006). Systemic fungemia and hepatic localizations of *Fusarium solani* in a liver transplanted patient: An emerging fungal agent. *Liver Transplantation*, *12*(11), 1711–1714. <https://doi.org/10.1002/lt.20899>
144. Lopez, M. K. S., Kalaw, S. P., Dulay, R. M. R., De Leon, A. M., & Reyes, R. G. (2022). Optimization of mycelial growth of *Xylaria papulis* Lloyd (*Xylariaceae*) in indigenous liquid culture conditions, science city of Muñoz, Nueva Ecija, Philippines. *Studies in Fungi*, *7*(1), 1–7. <https://doi.org/10.48130/SIF-2022-0021>
145. Łopusiewicz, Ł. (2018). Isolation, characterisation and biological activity of melanin from *Exidia nigricans*. *91*, 119–129.
146. Luo, L., Zhang, S., Wu, J., Sun, X., & Ma, A. (2021). Heat stress in macrofungi: Effects and response mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(20), 7567–7576. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11574-7>
147. Ma, H.-X., Song, Z.-K., Pan, X.-Y., Qu, Z., Ma, S.-Y., Yang, Z.-E., Zhang, B., & Li, Y. (2021). Phylogeny and taxonomic of *Xylaria* associated with fallen fruits and seeds in China [Preprint]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1081502/v1>
148. Macias-Paz, I. U., Pérez-Hernández, S., Tavera-Tapia, A., Luna-Arias, J. P., Guerra-Cárdenas, J. E., & Reyna-Beltrán, E. (2023). *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología*, *55*(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.08.003>
149. Marmann, A., Aly, A., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-cultivation – A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*, *12*(2), 1043–1065. <https://doi.org/10.3390/md12021043>
150. Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. B., Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, *13*. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
151. Martin P (1970) Studies in the Xylariaceae: VIII. *Xylaria* and its allies. *J S Afr Bot* 36:71–83.

152. Minter, D. W., & Dudka, I. O. (1996). *Fungi of Ukraine: A Preliminary Checklist*. International Mycological Institute.
153. Mueller, E., Müller, E., Löffler, W., & Loeffler, W. (1992). *Mykologie: grundriß für naturwissenschaftler und mediziner ; 31 Tabellen* (5., durchges. Aufl). Thieme.
154. Mykchaylova, O. B., Bisko, N. A., Sukhomlyn, M. M., Lomberg, M. L., Pasaylyuk, M. V., M. M. Sukhomlyn, Y. V. Petrichuk, & A. P. Gryganskyi. (2017). Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom *Fomitopsis officinalis* (*Fomitopsidaceae*, *Polyporales*) on agar media and plant substrates. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4). <https://medicine.dp.ua/index.php/med/article/view/367>
155. Nakajima, Y., Sato, Y., & Konishi, T. (2007). Antioxidant Small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (Persoon) Pilat (Chaga). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(8), 1222–1226. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.1222>
156. Nakasone, K. K., & Gilbertson, R. L. (1978). Cultural and other studies of fungi that decay ocotillo in Arizona. *Mycologia*, 70(2), 266–299. <https://doi.org/10.1080/00275514.1978.12020229>
157. Nitschke, T., 1834-1883. (1867). *Pyrenomycetes germanici*. E. Trewendt. <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/6352360.html>
158. Okane, I., & Nakagiri, A. (2007). Taxonomy of an anamorphic xylariaceous fungus from a termite nest found together with *Xylaria angulosa*. *Mycoscience*, 48(4), 240–249. <https://doi.org/10.1007/S10267-007-0361-9>
159. Okane, I., Srikukulchai, P., Tabuchi, Y., Sivichai, S., & Nakagiri, A. (2012). Recognition and characterization of four Thai xylariaceous fungi inhabiting various tropical foliages as endophytes by DNA sequences and host plant preference. *Mycoscience*, 53(2), 122–132. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0149-9>
160. Peiris, D., Dunn, W. B., Brown, M., Kell, D. B., Roy, I., & Hedger, J. N. (2008). Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus micaceus* and *Coprinus disseminatus*. *Metabolomics*, 4(1), 52–62. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0100-4>

161. Peláez, F., Platas, G., Sánchez-Ballesteros, J., & González, V. (2008). Molecular phylogenetic studies within the *Xylariaceae* based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 31.
162. Perera, R. (2020). Fungi on wild seeds and fruits. *Mycosphere*, 11(1), 2108–2480. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/14>
163. Peršoh, D., Melcher, M., Graf, K., Fournier, J., Stadler, M., & Rambold, G. (2009). Molecular and morphological evidence for the delimitation of *Xylaria hypoxylon*. *Mycologia*, 101(2), 256–268. <https://doi.org/10.3852/08-108>
164. Persoon, C. H., 1755-1837. (1801). *Synopsis methodica fungorum*. H. Dieterich.
165. Perveen, S., & Al-Taweel, A. (2018). *Terpenes and terpenoids*. BoD–Books on Demand.
166. Petrini, L., & Petrini, O. (1985). *Xylariaceous Fungi as Endophytes*. 38, 216–234.
167. Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022). Spoilage of stored, processed and preserved foods. In J. I. Pitt & A. D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage* (pp. 537–568). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3_12
168. Pittayakhajonwut, P., Suvannakad, R., Thienhirun, S., Prabpai, S., Kongsaree, P., & Tanticharoen, M. (2005). An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). *Tetrahedron Letters*, 46(8), 1341–1344. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.12.110>
169. Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Kühn, T., Pelzing, M., Sakayaroj, J., & Taylor, W. C. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*, 69(9), 1900–1902. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.003>
170. Poveda, J. (2021). *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biological Control*, 159, 104634. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>
171. Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G.-J. E., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95(4), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.049>

172. Quattlebaum, E. C., & Carner, G. R. (1980). A technique for preparing *Beauveria* spp. For scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Botany*, 58(15), 1700–1703. <https://doi.org/10.1139/b80-198>
173. Rajendiran, R., Jegadeeshkumar, D., Sureshkumar, B. T., & Nisha, T. T. (2010). *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. *Journal of Agricultural Technology*, www.ijat-rmutto.com, 31–35.
174. Ramesh, V., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2012). Evaluation of synergistic and antibacterial activity of *Xylaria curta* against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Mycology*, 3(4), 252–257. <https://doi.org/10.1080/21501203.2012.753129>
175. Ramesh, V., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2014). Optimization of submerged culture conditions for mycelial biomass production with enhanced antibacterial activity of the medicinal macro fungus *Xylaria* sp. Strain R006 against drug resistant bacterial pathogens. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(1), 88–98. <https://doi.org/10.5943/cream/4/1/7>
176. Rebbapragada, D. P., & Kalyanaraman, R. (2016). Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Xylaria feejeensis* HMJAU22039. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 269. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13734>
177. Ridgway, R. (1912). *Color standards and color nomenclature*. The author.
178. Righelato, R. C., Trinci, A. P. J., Pirt, S. J., & Peat, A. (1968). The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, 50(3), 399–412. <https://doi.org/10.1099/00221287-50-3-399>
179. Rogers, J. D. (1979a). The *Xylariaceae*: Systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia*, 71(1), 1–42. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12020984>
180. Rogers, J. D. (1979b). *Xylaria magnoliae* sp.nov. and comments on several other fruit-inhabiting species. *Canadian Journal of Botany*, 57(8), 941–945. <https://doi.org/10.1139/b79-115>

181. Rogers, J. D. (1983). *Xylaria bulbosa*, *Xylaria curta*, and *Xylaria longipes* in Continental United States. *Mycologia*, 75(3), 457–467. <https://doi.org/10.1080/00275514.1983.12023709>
182. Rogers, J. D. (1986). Provisional keys to *Xylaria* species in continental United States. *Mycotaxon*, 26, 85–97.
183. Rogers, J. D., Ju, Y.-M., & Lehmann, J. (2005). Some *Xylaria* species on termite nests. *Mycologia*, 97(4), 914–923. JSTOR.
184. Rogers, J. D., & Samuels, G. J. (1986). Ascomycetes of New Zealand 8. *Xylaria*. *New Zealand Journal of Botany*, 24(4), 615–650. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409947>
185. Rogers, J., Martín, F., & Ju, Y.-M. (2002). A reassessment of the *Xylaria* on *Liquidambar* fruits and two new taxa on *Magnolia* fruits. *Sydowia*, 54, 91–97.
186. Rönch, P., Rönch, S., Otto, P., & Reiher, A. (2010). Untersuchungen über die fruchtbewohnenden *Xylaria delitschii* und *Xylaria oxyacanthae*. *Boletus - Pilzkundliche Zeitschrift*, 32, 106–122.
187. Rubio-Portillo, E., Orts, D., Llorca, E., Fernández, C., Antón, J., Ferrer, C., Gálvez, B., Esteban, V., Revelles, E., Pérez-Martín, C., Gómez-Imbernón, E., Adsuar, J., Piqueras, P., Amat, B., Franco, J., & Colom, M. F. (2020). The domestic environment and the lung mycobiome. *Microorganisms*, 8(11), 1717. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111717>
188. Saccardo, P. A., Traverso, G. B., & Trotter, A. (1882). *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*. sumptibus auctoris.
189. Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 221. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221>
190. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

191. Samson, R. A., & Pitt, J. I. (Eds.). (2003). *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482284188>
192. Santiago, K. A. A., Edrada-Ebel, R., Dela Cruz, T. E. E., Cheow, Y. L., & Ting, A. S. Y. (2021). Biodiscovery of potential antibacterial diagnostic metabolites from the endolichenic fungus *Xylaria venustula* using LC–MS-based metabolomics. *Biology*, *10*(3), 191. <https://doi.org/10.3390/biology10030191>
193. Schneider, G., Anke, H., & Sterner, O. (1996). Xylaramide, a new antifungal compound, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *51*(11–12), 802–806. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1206>
194. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
195. Schüffler, A., Sterner, O., & Anke, H. (2007). Cytotoxic α -Pyrone from *Xylaria hypoxylon*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *62*(3–4), 169–172. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-3-403>
196. Schulthess, F. M., & Faeth, S. H. (1998). Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia*, *90*(4), 569–578. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026945>
197. Score, A. J., Palfreyman, J. W., & White, N. A. (1997). Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *39*(2–3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00012-7)
198. Shabir, G., Anwar, F., Sultana, B., Khalid, Z. M., Afzal, M., Khan, Q. M., & Ashrafuzzaman, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial attributes and phenolics of

- different solvent extracts from leaves, flowers and bark of gold mohar. *Molecules*, *16*(9), 7302–7319. <https://doi.org/10.3390/molecules16097302>
199. Sharvit, L. E., Wasser, S. P., & Fares, F. (2012). The effect of culture liquid ethyl acetate mycelium extracts of medicinal mushrooms on the viability of human pancreatic cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *14*(2), 169–179. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i2.50>
200. Shiono, Y., Motoki, S., Koseki, T., Murayama, T., Tojima, M., & Kimura, K. (2009). Isopimarane diterpene glycosides, apoptosis inducers, obtained from fruiting bodies of the ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Phytochemistry*, *70*(7), 935–939. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.03.023>
201. Singla, S., Htut, K. Z., Zhu, R., Davis, A., Ma, J., Ni, Q. Z., Burkart, M. D., Maurer, C., Miyoshi, T., & Dhinojwala, A. (2021). Isolation and characterization of allomelanin from pathogenic black knot fungus — A sustainable source of melanin. *ACS Omega*, *6*(51), 35514–35522. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05030>
202. Siritwach, R., Kinoshita, H., Kitani, S., Igarashi, Y., Pansuksan, K., Panbangred, W., & Nihira, T. (2011). Xylaropyrone, a new γ -pyrone from the endophytic fungus *Xylaria feejeensis* MU18. *The Journal of Antibiotics*, *64*(2), 217–219. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.160>
203. Smith, G., Liew, E. C. Y., & Hyde, K. (2003). The *Xylariales*: A monophyletic order containing 7 families. *Fungal Divers.*, *13*.
204. Song, F., Wu, S., Zhai, Y., Xuan, Q., & Wang, T. (2014). Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. *Chemistry & Biodiversity*, *11*(5), 673–694. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200286>
205. Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *579*(1–2), 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
206. Srihanant, N., Petcharat, V., & Vasilyeva, L. N. (2015). *Xylaria thailandica* – a new species from southern Thailand. *Mycotaxon*, *130*(1), 227–231. <https://doi.org/10.5248/130.227>

207. Stadler, M. (2011). Importance of secondary metabolites in the *Xylariaceae* as parameters for assessment of their taxonomy, phylogeny, and functional biodiversity. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1(2), 75–133. <https://doi.org/10.5943/cream/1/2/1>
208. Stadler, M., Hawksworth, D. L., & Fournier, J. (2014). The application of the name *Xylaria hypoxylon*, based on *Clavaria hypoxylon* of Linnaeus. *IMA Fungus*, 5(1), 57–66. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2014.05.01.07>
209. Stadler, M., & Hellwig, V. (2005). Chemotaxonomy of the Xylariaceae and remarkable bioactive compounds from Xylariales and their associated asexual stages. In *Recent Research Developments in Phytochemistry* (Vol. 9, pp. 41–93).
210. Stadler, M., Lambert, C., Wibberg, D., Kalinowski, J., Cox, R. J., Kolařík, M., & Kuhnert, E. (2020). Intragenomic polymorphisms in the ITS region of high-quality genomes of the *Hypoxylaceae* (Xylariales, Ascomycota). *Mycological Progress*, 19(3), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01552-9>
211. Stalpers, J. A. (1978). *Identification of Wood-inhabiting Aphyllophorales in Pure Culture*. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
212. Sterflinger, K., Tesei, D., & Zakharova, K. (2012). Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology*, 5(4), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.007>
213. Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
214. Suryelita, S., Riga, R., Etika, S. B., Ulfah, M., & Artasasta, M. A. (2021). Antibacterial Screening of Endophytic Fungus *Xylaria* sp. derived from *Andrographis paniculata* (Sambiloto). *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(A), 971–975. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.7475>
215. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The

- WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
216. Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
217. Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
218. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
219. Tang, A., Jeewon, R., & Hyde, K. (2009). A re-evaluation of the evolutionary relationships within the *Xylariaceae* based on ribosomal and protein-coding gene sequences. *Fungal Diversity*, 34, 127–155.
220. Tauber, J. P., Matthäus, C., Lenz, C., Hoffmeister, D., & Popp, J. (2018). Analysis of basidiomycete pigments in situ by Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 11(6), e201700369. <https://doi.org/10.1002/jbio.201700369>
221. Tesei, D., Marzban, G., Zakharova, K., Isola, D., Selbmann, L., & Sterflinger, K. (2012). Alteration of protein patterns in black rock inhabiting fungi as a response to different temperatures. *Fungal Biology*, 116(8), 932–940. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.06.004>
222. Theuretzbacher, U. (2013). Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.010>
223. Thomas, D. C., Vandegrift, R., Ludden, A., Carroll, G. C., & Roy, B. A. (2016). Spatial ecology of the fungal genus *Xylaria* in a tropical cloud forest. *Biotropica*, 48(3), 381–393. <https://doi.org/10.1111/btp.12273>
224. Thompson, W., & Rayner, A. D. M. (1982). Structure and development of mycelial cord systems of *Phanerochaete laevis* in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 78(2), 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(82\)80001-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80001-6)

225. Tong, Y., & Tang, J. (2017). *Candida albicans* infection and intestinal immunity. *Microbiological Research*, *198*, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.002>
226. Tornberg, K., & Olsson, S. (2002). Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, *40*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00931.x>
227. Tudor, D., Robinson, S. C., & Cooper, P. A. (2013). The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *80*, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.09.013>
228. Tulasne, L. R., Tulasne, C., Geney-Gros., & Imperiali Typographeo. (1861). *Selecta fungorum carpologia :ea documenta et icones potissimum exhibens ... Imperatoris Jussu*, In Imperiali Typographeo Excudebatur.
229. U'Ren, J. M., Miadlikowska, J., Zimmerman, N. B., Lutzoni, F., Stajich, J. E., & Arnold, A. E. (2016). Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of *Xylariaceae* (*Sordariomycetes*, *Ascomycota*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *98*, 210–232. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.010>
230. Vidal, C., Fargues, J., & Lacey, L. A. (1997). Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*, *70*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4658>
231. Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, *71*(1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>
232. Visser, A. A., Ros, V. I. D., De Beer, Z. W., Debets, A. J. M., Hartog, E., Kuyper, T. W., Læssøe, T., Slippers, B., & Aanen, D. K. (2009). Levels of specificity of *Xylaria* species associated with fungus-growing termites: A phylogenetic approach. *Molecular Ecology*, *18*(3), 553–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04036.x>
233. Wangsawat, N., Ju, Y.-M., Phosri, C., Whalley, A. J. S., & Suwannasai, N. (2021). Twelve new taxa of *Xylaria* associated with termite nests and soil from Northeast Thailand. *Biology*, *10*(7), 575. <https://doi.org/10.3390/biology10070575>
234. Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. P. (2016). *The fungi* (3d edition). Elsevier, Academic Press.

235. Wendt, L., Sir, E. B., Kuhnert, E., Heitkämper, S., Lambert, C., Hladki, A. I., Romero, A. I., Luangsa-ard, J. J., Srikitikulchai, P., Peršoh, D., & Stadler, M. (2018). Resurrection and emendation of the *Hypoxylaceae*, recognised from a multigene phylogeny of the *Xylariales*. *Mycological Progress*, 17(1–2), 115–154. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1311-3>
236. Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 357–364. <https://doi.org/10.1023/A:1020592802234>
237. White, N. A., & Boddy, L. (1992). Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. *FEMS Microbiology Letters*, 98(1–3), 75–79. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05493.x>
238. Wu, W., Dai, H., Bao, L., Ren, B., Lu, J., Luo, Y., Guo, L., Zhang, L., & Liu, H. (2011). Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1303–1308. <https://doi.org/10.1021/np100909y>
239. Xu, W.-F., Hou, X.-M., Yao, F.-H., Zheng, N., Li, J., Wang, C.-Y., Yang, R.-Y., & Shao, C.-L. (2017). Xylapeptide A, an antibacterial cyclopentapeptide with an uncommon l-pipecolinic acid moiety from the associated fungus *Xylaria* sp. (GDG-102). *Scientific Reports*, 7(1), 6937. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07331-4>
240. Yadav, M., Yadav, A., & Yadav, J. P. (2014). *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S256–S261. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60242-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60242-X)
241. Yassin, M. T., Mostafa, A. A.-F., Al-Askar, A. A., Sayed, S. R. M., & Rady, A. M. (2021). Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, in vitro. *Journal of King Saud University - Science*, 33(3), 101363. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363>

242. Yin, X., Feng, T., Li, Z.-H., Su, J., Li, Y., Tan, N.-H., & Liu, J.-K. (2011). Chemical investigation on the cultures of the fungus *Xylaria carpophila*. *Natural Products and Bioprospecting*, 1(2), 75–80. <https://doi.org/10.1007/s13659-011-0011-y>
243. Yong, D. L., López, O. G., Castro, A. S., Romero, E. S. M., Palma, J. J. Z., & Rodríguez, J. R. (2023). Antibacterial activity and virulence factors inhibition by *Xylaria* sp. (*Xylariaceae*, *Ascomycota*): A study of bioactive potential. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 26(3). <https://doi.org/10.56369/tsaes.4910>
244. Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S., & Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, 46(3), 231–234. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>

**ДОДАТОК А. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ
ДИСЕРТАЦІЇ**

**Статті у наукових виданнях, індексованих у базах даних Web of Science та
Scopus**

1. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2024). Isolation and characterisation of melanin pigment from mycelial cultures of *Xylaria polymorpha* (Ascomycota). *Ukrainian Botanical Journal*, 81(1), 8–15. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj81.01.008>

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

1. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2023). Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant capacity in *Xylaria polymorpha* and *Xylaria longipes* strains. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology*, 94(3), 5–9. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.5-9>
2. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2023). Dynamics of the phenolic constituents and antioxidant activity in submerged cultures of *Xylaria* species. *Biotechnologia Acta*, 16(6), 82–87. <https://doi.org/10.15407/biotech16.06.082>

Статті у закордонних наукових фахових виданнях

1. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2022). Cultural and morphological characteristics of wood-inhabiting *Xylaria* species from Ukraine. *Plant & Fungal Research*, 5(2), 11–19. <https://doi.org/10.30546/2664-5297.2022.2.11>

Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. **Атаманчук, А.** (2021). Антагоністичні властивості *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. проти *Aspergillus niger* Tiegh., *Mucor racemosus* Fresen. та *Penicillium polonicum* K.W. Zaleski. «Актуальні проблеми ботаніки та екології»: матеріали міжнародної конференції молодих учених (с. 55). LAT & K. Форма участі: усна доповідь.
2. **Atamanchuk, A., & Bisko, N.** (2022). Dynamics of biomass and exopolysaccharides production by *Xylaria polymorpha* in submerged culture. “Youth and modern problems of microbiology and virology”: materials of the IV young scientists conference (p.6). Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine. Форма участі: заочна.
3. **Atamanchuk, A.** (2023). Antioxidant activity of biomass extracts of *Xylaria longipes* Nitschke strains under submerged conditions. “Biotechnology of the 21st century”: materials of the 17th International scientific and practical conference (pp. 32–34). Igor Sikorsky KPI. Форма участі: заочна.
4. **Atamanchuk A., & Bisko, N.** (2023). Growth of *Xylaria polymorpha* in submerged culture. on “Modern approaches in the study of the plant kingdom”: materials of the international scientific-practical conference dedicated to the “Year of Heydar Aliyev”(pp. 114–115). Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan Institute of Botany. Форма участі: усна доповідь.
5. **Атаманчук, А.** (2023). Культурально-морфологічна характеристика та антагоністичні властивості *Xylaria carpophila* (Pers.) Fr (Pers.) Fr. «Актуальні проблеми ботаніки та екології»: матеріали міжнародної конференції молодих учених (с. 47). Супрун В.П. Форма участі: усна доповідь.

**ДОДАТОК Б. ОСОБЛИВОСТІ ТА РЕКОМЕНДАЦІЇ ПО ЗБЕРЕЖЕННЮ
ВЕГЕТАТИВНОГО МІЦЕЛІЮ ШТАМІВ ВИДІВ РОДУ *XYLARIA* IN
*VITRO***

ПАСПОРТ *XYLARIA CARPOPHILA* 2788

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria carpophila (Pers.) Fr., Summa veg. Scand., Sectio Post. (Stockholm): 382 (1849)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2788

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2021

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Атаманчук А.Р.

Дата: 02.08.2021

Локалітет: Україна, Івано-Франківська область, Надвірнянський район, заповідне урочище "Букове"; 48°39'07.9"N 24°34'07.1"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71589

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: ні

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °C, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $2,40 \pm 0,16$ мм/добу

середовище МЕА: $1,84 \pm 0,05$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °С

Критичні температури: 4 °С та 40 °С

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

▫ на середовищі ГПДА колонії повстисті, з концентричною зональністю, спершу білі, з часом набувають кремового відтінку, край колоній не притиснутий, хвилястий. Реверзум із характерним радіально-хвилястим візерунком та вкрапленнями у місцях формування зачатків строматичних утворень

▫ на середовищі МА колонії повстисті, спершу білі, через 10–14 діб культивування спостерігається поява пігментації темно-сірого або чорного забарвлення від центру до периферії колоній, край не притиснутий. Спостерігається незначна пігментація реверзума. Поява строматичних утворень відбувається через 3 тижні культивування після впливу світла. Строми концентрично розташовані по краю колонії, циліндричні, нерозгалужені, $10\text{--}15 \times 1\text{--}2$ мм, сірі з біло-рожевими верхівками

Особливості в умовах глибинного культивування: не досліджувались

Антимікробна активність: етилацетатні екстракти культуральної рідини проявляли активність проти *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (зона інгібування $16 \pm 0,41$ мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 ($12 \pm 0,41$ мм) та *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($12 \pm 0,42$ мм)

Антагоністична активність: утворював зони інгібування з колоніями тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822 та *Fusarium solani* 1P.2II; частково обростав колонії

тест-культур та *Candida albicans* N-023 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування та колонії тест-культур *Mucor plumbeus* N-018 та *Penicillium polonicum* VURV-F 823 з утворенням зони інгібування; ріст пригнічувався тест-культурою *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 15,5

Перелік публікацій, у яких використовується штам: Атаманчук (2023)

ПАСПОРТ *XYLARIA ELLISII* 2724

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria ellisii J.B. Tanney, Seifert & Y.M. Ju, in Ibrahim, Tanney, Fei, Seifert, Cutler, Capretta, Miller & Sumarah, Scientific Reports 10(no. 4599): 9 (2020)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*

Номер штаму: 2724

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2020

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: 15.10.2020

Локалітет: Україна, Івано-Франківська область, Богородчанський район, с. Стара Гута, 48°38'13.5"N 24°12'21.8"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71584

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830367

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °C, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: MEA, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $2,79 \pm 0,15$ мм/добу

середовище MEA: $2,58 \pm 0,14$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °C

Критичні температури: 4°C та 41 °C

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

на середовищі ГПДА та MEA подібна: колонії ватоподібні, з великою кількістю повітряного міцелію, спершу білі, згодом набувають сіро-коричневого відтінку; реверзум інтенсивно пігментований, набуває чорного забарвлення; стромі концентрично розташовані по всій поверхні колонії, циліндричні, нерозгалужені на верхівках, $15\text{--}20 \times 1\text{--}3$ мм, коричневі з білими верхівками на середовищі ГПДА та $5\text{--}10 \times 1\text{--}2$ мм на середовищі MEA

Особливості в умовах глибинного культивування: не досліджувались

Антимікробна активність: етилацетатні екстракти культуральної рідини проявляли активність проти *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (зона інгібування $15 \pm 0,41$ мм) та *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($12 \pm 0,41$ мм)

Антагоністична активність: ріст зупинявся при міцеліальному контакті з колоніями тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822, *Penicillium polonicum* VURV-F 823, *Fusarium solani* 1P.2II та *Trichoderma viride* N-022; частково обростав колонії тест-

культур *Mucor plumbeus* N-018 та *Candida albicans* N-023 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування

Індекс антагонізму – 11

Перелік публікацій, у яких використовується штам: відсутні

ПАСПОРТ *XYLARIA HYPOXYLON* 2725

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria hypoxylon (L.) Grev., Fl. Edin.: 355 (1824)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2725

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2020

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: 15.10.2020

Локалітет: Україна, Івано-Франківська область, дендрологічний парк «Діброва»; 48°46'31.9"N 24°30'48.2"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71585

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830377

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі

скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °C, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: MEA, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $1,57 \pm 0,06$ мм/добу

середовище MEA: $0,92 \pm 0,04$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °C

Критичні температури: 4 °C та 36 °C

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

на середовищі ГПДА та MEA подібна: колонії спершу білі, повстисті з пучками повітряних гіф, нещільні, краї колоній хвилясті, опушені. Через 2 тижні культивування з'являється пігментація, міцеліальні колонії стають зоновані концентричними кільцями сірого та білого міцелію. Реверзум набуває чорного забарвлення навколо точки інокуляції, при цьому середовище набуває зеленувато-сірого відтінку. У 4-тижневих культурах після впливу світла утворюються циліндричні, сірі з білими верхівками, опушені при основі строми розмірами $15-30 \times 1-2$ мм

Особливості в умовах глибинного культивування: не досліджувались

Антимікробна активність: етилацетатні екстракти культуральної рідини проявляли активність проти *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (зона інгібування $15 \pm 0,52$ мм), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ($17 \pm 0,26$ мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 ($14 \pm 0,32$ мм), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($13 \pm 0,41$ мм) та *Escherichia coli* ATCC 25922 ($15 \pm 0,52$ мм)

Антагоністична активність: утворював зони інгібування з колоніями тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822 та *Penicillium polonicum* VURV-F 823; частково обростав колонії тест-культур *Mucor plumbeus* N-018 та *Candida albicans* N-023 після

зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; відбувалась зупинка росту при міцеліальному контакті з тест-культурою *Fusarium solani* 1P.2II; ріст пригнічувався тест-культурою *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 12

Перелік публікацій, у яких використовується штам: відсутні

ПАСПОРТ *XYLARIA LONGIPES* 2718

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria longipes Nitschke, Pyrenomyc. Germ. 1: 14 (1867)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2718

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2020

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Мартін О.М.

Дата: 01.10.2020

Локалітет: Україна, Київська область; Бучанський район, с. Борівка

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71588

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830524

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА за $4 \pm 0,1$ °C, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $1,33 \pm 0,07$ мм/добу

середовище МЕА: $1,46 \pm 0,18$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °С

Критичні температури: 4 °С та 40 °С

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

на середовищі ГПДА та МЕА подібна: колонії оксамитово-повстисті, спершу білі, з часом з'являється пігментація у вигляді темно-сірого кільця навколо точки інокуляції, край колоній нитчастий, не притиснутий, реверзум кремовий, без пігментації. Строни переважно нерозгалужені, циліндричні, $10\text{--}40 \times 2$ мм (або лопатоподібні до 10 мм завширшки), оливково-сірі з рожевими верхівками

Особливості в умовах глибинного культивування

(середовище ГПД, 120 об\хв, показники на 9-ту добу культивування):

Біомаса: $5,60 \pm 0,05$ г/л

Ендополісахариди: $49,67 \pm 6,89$ мг/г

Екзополісахариди: $0,27 \pm 0,02$ г/л

Фенольні сполуки (екстраговані з біомаси різними розчинниками):

$0,53 \pm 0,01$ мг ГКЕ/г (етилацетат)

$6,60 \pm 0,04$ мг ГКЕ/г (етанол)

$14,81 \pm 0,29$ мг ГКЕ/г (метанол)

Антиоксидатна активність (екстрактів біомаси у різних розчинниках):

41,28±0,33 % (етилацетат)

52,63±0,08 % (етанол)

89,50±0,04 % (метанол)

Антимікробна активність: не спостерігалась

Антагоністична активність: частково обростав колонії тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822, *Penicillium polonicum* VURV-F 823 і *Fusarium solani* 1P.2II.3 та повністю обростав колонії *Candida albicans* N-023 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; частково обростав колонію *Mucor plumbeus* N-018 із зупинкою росту тест-культури при контакті та формуванням зони інгібування; ріст пригнічувався тест-культурою *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 19

Перелік публікацій, у яких використовується штам: Atamanchuk (2023); Atamanchuk and Bisko (2022, 2023b, 2023a); Атаманчук та Бісько (2022)

ПАСПОРТ *XYLARIA LONGIPES* 2726

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria longipes Nitschke, Pyrenomyc. Germ. 1: 14 (1867)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2726

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2020

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Герштун О.

Дата: 13.10.2020

Локалітет: Україна, Вінницька область, 49°15'08.3"N 28°24'34.1"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71593

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830543

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °С, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $1,90 \pm 0,09$ мм/добу

середовище МЕА: $2,44 \pm 0,15$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °С

Критичні температури: 4 °С та 38 °С

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

на середовищі ГПДА та МЕА подібна: колонії оксамитово-повстисті, спершу білі, з часом з'являється пігментація у вигляді темно-сірого кільця навколо точки інокуляції, край колоній нитчастий, не притиснутий, реверзум кремовий, без пігментації. Строми переважно нерозгалужені, циліндричні, $10\text{--}40 \times 2$ мм (або лопатоподібні до 10 мм завширшки), оливково-сірі з рожевими верхівками

Особливості в умовах глибинного культивування

(середовище ГПД, 120 об\хв, показники на 9-ту добу культивування):

Біомаса: $7,18 \pm 0,06$ г/л

Ендополісахариди: $41,0 \pm 0,66$ мг/г

Екзополісахариди: $0,21 \pm 0,02$ г/л

Фенольні сполуки (екстраговані з біомаси різними розчинниками):

$1,83 \pm 0,06$ мг ГКЕ/г (етилацетат)

$10,31 \pm 0,29$ мг ГКЕ/г (етанол)

$16,60 \pm 0,04$ мг ГКЕ/г (метанол)

Антиоксидатна активність (екстрактів біомаси у різних розчинниках):

$51,91 \pm 0,03$ % (етилацетат)

$86,82 \pm 0,07$ % (етанол)

$88,99 \pm 0,07$ % (метанол)

Антимікробна активність: не спостерігалась

Антагоністична активність: частково обростав колонії тест-культур *Penicillium polonicum* VURV-F 823 і *Fusarium solani* 1P.2II.3 та повністю обростав колонії *Mucor plumbeus* N-018 та *Candida albicans* N-023 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; відбувалась зупинка росту при міцеліальному контакті з *Aspergillus niger* VURV-F 822; ріст пригнічувався тест-культурою *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 17

Перелік публікацій, у яких використовується штам: Atamanchuk (2023); Atamanchuk and Bisko (2022, 2023b, 2023a); Атаманчук та Бісько (2022)

ПАСПОРТ *XYLARIA OXYACANTHAE* 2789

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria oxyacanthae Tul. & C. Tul., Select. fung. carpol. (Paris) 2: 15 (1863)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2789

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2021

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Атаманчук А.Р.

Дата: 20.06.2021

Локалітет: Україна, Київська область, м. Київ, національний природний парк "Голосіївський"; 50°23'23.9"N 30°30'52.5"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71586

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830452

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °C, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $1,35 \pm 0,08$ мм/добу

середовище МЕА: $1,19 \pm 0,14$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °C

Критичні температури: 4 °C та 39 °C

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

на середовищі ГПДА та МЕА подібна: колонії повстисті, з хвилястим притиснутим краєм, спершу білі, згодом набувають сіро-коричневого відтінку, реверзум пігментований, коричневого кольору з помаранчевим відтінком

Особливості в умовах глибинного культивування: не досліджувались

Антимікробна активність: відсутня

Антагоністична активність: ріст зупинявся при міцеліальному контакті з колоніями тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822, *Penicillium polonicum* VURV-F 823, *Fusarium solani* 1P.2II та *Mucor plumbeus* N-018; частково обростав колонії тест-культур *Candida albicans* N-023 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; ріст пригнічувався тест-культурою *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 7,5

Перелік публікацій, у яких використовується штам: відсутні

ПАСПОРТ *XYLARIA POLYMORPHA* 2720

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria polymorpha (Pers.) Grev., Fl. Edin.: 355 (1824)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2720

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2020

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Герштун О.

Дата: 05.10.2020

Локалітет: Україна, Вінницька область, 49°16'13.8"N 28°26'40.1"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71587

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830483

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °C, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $3,16 \pm 0,49$ мм/добу

середовище МЕА: $3,29 \pm 0,36$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °C

Критичні температури: 4 °C та 37 °C

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

▫ на середовищі ГПДА колонії повстисто-ватоподібні, щільні, спершу білі, з часом набувають темно-сірого забарвлення різних відтінків, край колоній не притиснутий, хвилястий, реверзум набуває зеленувато-сірого кольору з концентричними чорними колами. Страми циліндричні, $10-25 \times 2$ мм, сірі з рожевими, подекуди розгалуженими, верхівками

▫ на середовищі МА колонії повстисто-ватопоподібні, спершу білі, з часом набувають сіро-зеленого забарвлення (пігментація колоній спостерігається пізніше, ніж на середовищі ГПДА), край колоній не притиснутий, хвилястий, реверзум набуває зеленувато-сірого кольору з концентричними чорними коламина. Строми циліндричні, нерозгалужені, 10–25×1–2 мм, сірі з білими верхівками та безбарвними краплинами ексудату

Особливості в умовах глибинного культивування

(середовище ГПД, 120 об\хв, показники на 9-ту добу культивування):

Біомаса: 10,69 ± 0,13 г/л

Ендополісахариди: 72,45±2,73 мг/г

Екзополісахариди: 1±0,02 г/л

Фенольні сполуки (екстраговані з біомаси різними розчинниками):

0,72±0,21 мг ГКЕ/г (етилацетат)

7,75±0,04 мг ГКЕ/г (етанол)

20,40±0,02 мг ГКЕ/г (метанол)

Антиоксидатна активність (екстрактів біомаси у різних розчинниках):

56,33±0,03 % (етилацетат)

86,55±0,20 % (етанол)

75,70±0,11 % (метанол)

Особливості в умовах поверхневого культивування (середовище ГПД, 30 доба):

Вміст меланінів:

2,33±0,11 мг/г (вихід)

17,80±0,84 мг/л (продуктивність)

Антимікробна активність:

біомаса – затримка росту тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633(зона інгібування 12±0,52 мм), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (10±0,52 мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 (12±0,41 мм)

культуральна рідина – *Bacillus subtilis* ATCC 6633(зона інгібування 16±0,49мм), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (15±0,55 мм), *Escherichia coli* ATCC 25922 (10±0,32 мм)

Антагоністична активність: частково обростав колонії тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822 і *Penicillium polonicum* VURV-F 823 та повністю обростав колонії *Mucor plumbeus* N-018 і *Fusarium solani* 1P.2П.3 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; повністю обростав колонію *Candida albicans* N-023 без зупинки росту; відбувалась зупинка росту при міцеліальному контакті з *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 20

Перелік публікацій, у яких використовується штам: Atamanchuk and Bisko (2022a, 2022b, 2023a, 2023b, 2023c), Atamanchuk et al.(in press), Атаманчук (2022)

ПАСПОРТ *XYLARIA POLYMORPHA* 2736

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria polymorpha (Pers.) Grev., Fl. Edin.: 355 (1824)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, Xylaria.

Номер штаму: 2736

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2020

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Балогуря О.

Дата: 26.11.2020

Локалітет: Україна, Миколаївська область, Вознесенський район, заповідне урочище «Трикратський ліс».

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71591

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830544

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1^\circ\text{C}$, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $3,41 \pm 0,19$ мм/добу

середовище МЕА: $3,94 \pm 0,33$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Критичні температури: 4°C та 38°C

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

▫ на середовищі ГПДА колонії повстисто-ватоподібні, щільні, спершу білі, з часом набувають темно-сірого забарвлення різних відтінків, край колоній не притиснутий, хвилястий, реверзум набуває зеленувато-сірого кольору з концентричними чорними колами. Строми циліндричні, $10\text{--}25 \times 2$ мм, сірі з рожевими, подекуди розгалуженими, верхівками

▫ на середовищі МЕА колонії повстисто-ватоподібні, спершу білі, з часом набувають сіро-зеленого забарвлення (пігментація колоній спостерігається пізніше, ніж на середовищі ГПДА), край колоній не притиснутий, хвилястий, реверзум набуває зеленувато-сірого кольору з концентричними чорними колами. Страми циліндричні, нерозгалужені, 10–25×1–2 мм, сірі з білими верхівками та безбарвними краплинами ексудату

Особливості в умовах глибинного культивування

(середовище ГПД, 120 об\хв, показники на 9-ту добу культивування):

Біомаса: 11,07 ± 0,04 г/л

Ендополісахариди: 83,3±4,88 мг/г

Екзополісахариди: 1±0,02 г/л

Фенольні сполуки (екстраговані з біомаси різними розчинниками):

0,68±0,14 мг ГКЕ/г (етилацетат)

18,45±0,01 мг ГКЕ/г (етанол)

21,64±0,03 мг ГКЕ/г (метанол)

Антиоксидатна активність (екстрактів біомаси у різних розчинниках):

60,83±0,17 % (етилацетат)

84,24±0,07 % (етанол)

72,66±0,18 % (метанол)

Особливості в умовах поверхневого культивування (середовище ГПД, 30 доба):

Вміст меланінів:

15,33±0,43 мг/г (вихід)

113,06±3,32мг/л (продуктивність)

Антимікробна активність:

біомаса – затримка росту тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633(зона інгібування 11±0,20 мм), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (13±0,41 мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 (13±0,38 мм)

культуральна рідина – *Bacillus subtilis* ATCC 6633(зона інгібування 11±0,41мм), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (15±0,41мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 (10±0,20 мм)

Антагоністична активність: частково обростав колонії тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822 і *Penicillium polonicum* VURV-F 823, *Fusarium solani* 1P.2II.3 та *Candida albicans* N-023 та повінстю обростав колонії *Mucor plumbeus* N-018 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; відбувалась зупинка росту при міцеліальному контакті з *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 19,5

Перелік публікацій, у яких використовується штам: Atamanchuk and Bisko (2022, 2023b, 2023a, 2023c); Атаманчук (2022); Атаманчук та Бісько (2022)

ПАСПОРТ *XYLARIA VASCONICA* 2728

Назва організму, автор виду, рік опису виду:

Xylaria vasconica J. Fourn. & M. Stadler, Mycol. Progr. 10(1): 44 (2011)

Класифікація: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Xylariales, Xylariaceae, *Xylaria*.

Номер штаму: 2728

Ізольовано: Атаманчук А.Р.

Дата: 2021

Ідентифіковано: Атаманчук А.Р.

Зібрано: Лещенко Ю.

Дата: 20.06.2021

Локалітет: Київська обл., Обухівський район, м. Ржищів; 49°58'30.0"N 31°06'39.6"E

Депоновано до Національного гербарію України (KW-M): KW-M 71583

Історія штаму з моменту його виділення: Колекція культур шапинкових грибів ІВК (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна) ← Атаманчук А.Р.

Штам генетично модифікований: ні

Вид генетично підтверджений: PP830365

Рекомендований метод для тривалого збереження: у пробірках зі скошеним середовищем ГПДА або СА за $4 \pm 0,1$ °С, не більше 10 місяців

Умови культивування:

Середовища: МЕА, ГПДА

Швидкість радіального росту:

середовище ГПДА: $1,79 \pm 0,12$ мм/добу

середовище МЕА: $1,59 \pm 0,27$ мм/добу

Температура: $26 \pm 0,1$ °С

Критичні температури: 4°С та 37 °С

Режим освітлення: без світла

Морфологія колоній:

на середовищі ГПДА та МЕА подібна: колонії білі, перисті, з чітко вираженими міцеліальними тяжами, реверзум набуває чорного забарвлення; на середовищі ГПДА строми циліндричні, роговидні, $15-20 \times 2-4$ мм, сірі з білими верхівками, поява стром при культивуванні на середовищі МА не спостерігалась

Особливості в умовах глибинного культивування: не досліджувались

Антимікробна активність: відсутня

Антагоністична активість: ріст зупинявся при міцеліальному контакті з колоніями тест-культур *Aspergillus niger* VURV-F 822, *Penicillium polonicum* VURV-F 823 та *Fusarium solani* 1P.2П; частково обростав колонії тест-культур *Mucor plumbeus* N-018 та *Candida albicans* N-023 після зупинки росту при контакті, без утворення зони інгібування; ріст пригнічувався тест-культурою *Trichoderma viride* N-022

Індекс антагонізму – 10

Перелік публікацій, у яких використовується штам: відсутні

**ДОДАТОК В. НУКЛЕОТИДНІ ПОСЛІДОВНОСТІ ITS ШТАМІВ ВИДІВ
РОДУ *XYLARIA* З КОЛЕКЦІЇ КУЛЬТУР ШАПИНКОВИХ ГРИБІВ (ІВК),
ДЕПОНОВАНІ ДО БАЗИ ДАНИХ GENBANK**

Вид	Номер штаму в Колекції ІВК	Номер гербарного зразка	Код доступу до послідовностей у базі даних GenBank
<i>X. ellisii</i>	2724	KW-M 71584	PP830367
<i>X. hypoxylon</i>	2725	KW-M 71585	PP830377
<i>X. longipes</i>	2718	KW-M 71588	PP830524
<i>X. longipes</i>	2726	KW-M 71593	PP830543
<i>X. oxyacanthae</i>	2789	KW-M 71586	PP830452
<i>X. polymorpha</i>	2720	KW-M 71587	PP830483
<i>X. polymorpha</i>	2736	KW-M 71591	PP830544
<i>X. vasconica</i>	2728	KW-M 71583	PP830365