



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16658 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 1/00
A01G 1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ ДОН 21.3 СОМАТИЧНИХ СТРУКТУР ЇСТІВНОГО БАЗИДИОМІЦЕТУ PLEUROTUS OSTREATUS (JACQ:FR) KUMMER - ПРОДУЦЕНТ ПЛОДОВИХ ТІЛ ХАРЧОВОГО ПРИЗНАЧЕННЯ ТА ОСНОВА ОДЕРЖАННЯ ПОСІВНОГО МІЦЕЛІЮ

1

(21) u200602268
(22) 02.03.2006
(24) 15.08.2006
(46) 01.08.2006, Бюл. №8, 2006р.
(72) Ткаченко Наталія Петрівна, Сичов Петро Антонович, Бандура Ірина Іванівна, Тимофеев Олексій Анатольович

2

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
(57) Штам Дон 21.3 соматичних структур їстівного базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fr) Kummer - продуцент плодових тіл харчового призначення та основа одержання посівного міцелію.

Корисна модель відноситься до біотехнології - (мікотехнології) та може бути використана у виробництві посівного міцелію і плодових тіл на підприємствах нової галузі виробничої діяльності - грибівництва.

Розвиток інтенсивного грибівництва значною мірою визначається якістю посівного міцелію на основі селектованих конкурентоспроможних штамів їстівних грибів - об'єктів винаходів [1-10, 14, 16, 18]. Згідно Н.Г. Рибальському, С.П. Вассеру і І.О. Дудки і власним даним [16, 1-4, 8, 9, 10] об'єктами винаходів можуть бути штами, субстрати поживні середовища, способи.

Створення нових високопродуктивних штамів їстівних базидіальних грибів для одержання посівного міцелію (грибниці).

Розробка біотехнологій одержання посівного міцелію (грибниці) промисловим способом і плодових тіл харчового призначення сприяють вирішенню продовольчої і екологічної проблем [1-6, 7, 8-12, 13, 14, 18-20] та сприяють виникненню нових робочих міст.

Істотного значення набуває створення штамів дереворуйнівних грибів для біологічного захисту листяних і хвойних порід від ураження кореневою губкою (*Heterobasidion annosum* Bref і опеньком осіннім справжнім *Armillaria mella*) Sing [3, 5, 7, 18].

Високоврожайні та стійкі до несприятливих абіотичних і біотичних факторів штамів гливи звичайної кладуть в основу створення безвідходних технологій одержання харчових продуктів, кормових білків, біологічно активних речовин, біопрепаратів та органічних добрив [5, 7, 11, 14, 18-20].

Глива звичайна в Україні вирощується в промислових масштабах і перш за все, на Південному сході України, завдяки наявності багато штамових колекцій закордонної і власної селекції і розвинутої мережі плантаційних присадибних і малих підприємств по одержанню посівного міцелію і плодових тіл харчового призначення.

В усьому світі створення нових штамів вищих базидіальних грибів, зокрема гливи звичайної, зосновується шляхом використання трьох методів: 1) первісного скринінгу; 2) гібридизації; 3) мутагенезу (в основному фізичного) [5-7, 14, 16, 21].

Високоврожайні гібридні штами гливи закордонної селекції (НК-35. Duna - (гібрид Пола Дюрко) Італії Р-77, США, Польщі і інших країнах).

В Україні, зокрема на південному сході створено потужне виробництво посівного міцелію і одержання високих врожаїв плодових тіл шляхом біологічної трансформації соломи пшениці, ячменю, лушпиння соняшника та інших залишків переробки рослинної сировини [7-11, 12, 15, 18].

Створення конкурентоспроможних гібридних штамів стає можливим на основі використання колекційних штамів, штамів попередніх років селекції ДонНУ і дикорослих ізолятів регіону, котрі відрізняються підвищеною стійкістю до несприятливих біотичних і абіотичних факторів [14, 18, 19].

Останнім часом значна увага приділяється розробці критеріїв фізіолого-біохімічного тестування штамів на основі існуючих [13-16] та модифікованих методик.

Відомий штам гливи звичайної Дон-112 (KB-1017) (Аналог) характеризується здібністю забез-

(19) UA (11) 16658 (13) U

печувати високу швидкість лінійного росту міцелію, використовувати целюлозу і лігнін соломи злакових культур, промислові викиди, бавовни, сонячне лушпиння, деревину та інші. Основний критерій плодоношення - висока врожайність плодівих тіл приємних товарних і смакових якостей.

Найбільш близький за технічною суттю і досяжності результатів є штам НК-35 (Duna) Угорських селекціонерів (Gyurco, K. Laslo).

Для промислового вирощування використовують подрібнену до 2-4 см солому злаків, кукурудзяні стебла та стержні початків, бавовняні відходи, лушпиння соняшника та їх суміші.

Субстрат після ферментації, гідротермічної обробки, або ксеротермії вологістю 68-72% від повної вологоємності інокують посівним зерновим міцелієм в розрахунку 4% від маси підготовленого субстрату.

Колонізація субстрату міцелієм при 24-26° триває 15-18 діб. Примордії, а потім плодові тіла утворюються при температурі в межах 5-20°C. Перша хвиля з'являється на 21-22 добу. Оптимальна вологість повітря 85-92%, а тривалість освітлення біля 10 годин на добу.

В основу корисної моделі штам Дон 21.3 поставлено завдання створення більш врожайного, стійкого до несприятливих умов гібридного штаму методами схрещування монокаріонів і дикаріонів.

Поставлене завдання вирішується тим, що штам Дон 21.3 створений на основі схрещування монокаріонів штаму НК-35, монокаріонів, ізолятів О-8-04 і Т-11-04. Ці гібриди, одержані методами мон-мон схрещувань потім гібридизували з дикаріонними Дон-140. Полігібридний штам Дон 21-3 з початку вивчено з використанням фізіолого-біохімічних тестів на генетичну стабільність, а потім на врожайність в умовах промислового підприємств а по вирощуванню гливи.

Штам Дон 21.3 - продуцент посівного міцелію і плодівих тіл харчового та лікарського призначення одержано методом виділення в чисту культуру ізолятів О-8-04, Т-11-04, виробництва експериментальних партій зернового посівного міцелію по ТУУ02070803 водночас з наробкою міцелію штамів НК-35 (прототип), Дон 140 та Дон 104 К. На блоках з ячневої соломи після ксеротермії масою 2 кг кожний вирощували плодові тіла. З додержанням умов стерильності з плодівих тіл виділяли монобазидіоспорові культури кожного ізоляту і штаму, котрі було обрано батьківськими парами. Схрещування здійснювали згідно методикам, викладеним в наукових працях [Н.А. Бісько, І.О. Дудки [5-16], Esser J, Eger G] та інших факторів.

Культурально-морфологічні ознаки штаму Дон 21.3 вивчали з використанням методик фізіології грибів, мікро та макро метрії.

Культурально-морфологічні ознаки ізолятів і штамів в інтервалах температур в межах +10 +32°

С вивчали на сусло агарі, глюкозо-картопляному агарі і агарі Чапека. При цьому визначали швидкість лінійного росту міцелію, ростові коефіцієнти, мікрометричні властивості вивчали на вітальних препаратах з використанням мікрометра окулярного гвинтового МОВ 15, об'єкт мікрометра проходячого світла з допомогою мікроскопа Ergoval. Об'єктів 40, окуляр 15 (збільшення х 600).

Макроморфологічні ознаки плодівих тіл та врожайність визначали в промислових умовах на блоках з соломи ячменю після подрібнення та ксеротермічної обробки. Інтродукцію штаму здійснювали в умовах Донецької, Луганської, Одеської, Запорізької та Дніпропетровської областей України та республіки Крим.

Тестування штаму по фізіолого-біохімічним властивостям здійснювали з визначенням накопичення біомаси (г/л) на середовищах в залежності від джерел вуглецевого та азотного живлення. В спеціальних серіях дослідів визначали біосинтез водорозчинних білків за їх електрофоретичною рухливістю [7, 16, 18].

Мікроморфологічні дослідження дали можливість виявити характер розгалуження гіф міцелію, довжину та товщину клітин, рухливість внутріклітинних структур, особливості анаморф.

На агарізованих поживних середовищах. СА, КГА і агарі Чапека міцелій від місця внесення базидіоспори або багато спорового міцелію рівномірно поширюється радіально у чашках Петрі і лінійно в мікологічних пробірках на вітальних препаратах. Розгалуження з початку дихотомічне а з появою пряжок і анастомозів воші стають густо плетеними. Колонія розповсюджується радіально з початку за рахунок субстратних, а на другу третю добу і повітряних гіф. Колір колонії сніжно-білий, повітряні гіфи несуть на своїх апікальних закінченнях багаточисленні анаморфи у вигляді бластокогідій. Багаточисленні бластокогідії є характерною особливістю штаму Дон 21.3. Текстура міцелію бавовна, вовняна, пізніше шкіряста. Висота повітряних гіф сягає 3,5-4 мм. В умовах кімнатної температури (16-48°C) і добовому розсіченому освітленні виникають примордії.

Для визначення швидкості лінійного росту і ростових коефіцієнтів міцелій штамів Дон 21.3, НК-35 підтримували у чистій культурі протягом 6-8 діб. Інокулюм вносили в центр у чашках Петрі і початок агарового скосу в мікологічних пробірках. Вимірювання приростів міцелію здійснювали щодобово до повної колонізації середовища. Водночас досліджувався вплив температури на швидкість лінійного росту міцелію штамів, котрі порівнювалися між собою.

Дані досліджень швидкості і ростових коефіцієнтів наведені у Таблиці 1.

Швидкість лінійного росту і ростові коефіцієнти штамів гливи звичайної при температурі 27°C.

Таблиця 1

Штам	Швидкість лінійного росту міцелію (в мм/добу)	Ростові коефіцієнти
Дон 112	11,6±0,25	58,0±0,1
НК-35	11,4±0,31	57,0±0,2
Дон 21.3	11,9±0,35	59,6±0,1

Із даних Таблиці 1 випливає, що штам Дон 21.3 має більш високу швидкість лінійного росту.

Таблиця 2

Вплив температури на ріст міцелію штамів гливи

Штами	Швидкість росту міцелію (мм/добу) при температурі					
	+5 +8°C	+15°C	+26°C	+28°C	+32°C	+35°C
Дон 112	1,2±0,1	3,5±0,1	11,3±0,1	12,3±0,4	8,4±0,1	0,8±0,1
НК-35	1,2±0,2	4,1±0,2	11,1±0,2	11,8±0,2	7,9±0,2	1,1±0,1
Дон 21.3	1,1±0,1	4,4±0,3	12,2±0,3	12,2±0,1	8,3±0,1	1,3±0,3

Отже, результати дослідів свідчать про суттєвий вплив температури на швидкість лінійного росту штамів - аналога та прототипа в порівнянні зі штамом Дон 21.3, котрий заявляється як корисна модель.

Температурні інтервали можна поділювати на мінімальні, оптимальні і максимальні. Швидкість росту мінімальна при температурі +5 +8°C. Швидкість росту варіює у межах 1,2±0,2-4,4±0,3мм/добу. Оптимальна температура вегетативного росту складає 26-28°C. Подальше підвищення температури до 32-35°C знижує, швидкість росту міцелію майже до рівня +5 +8°C.

В умовах промислового культивування підтримка температури взимку і влітку потребує підвищення енергетичних витрат, тому доцільніше обирати відповідні штамми. Універсальними штамми з високими товарними якість є НК-35, Дон 21.3, Дон 112, Р-77 та інші. Вони забезпечують хороші товарні та смакові якості плодівих тіл в інтервалі температур 12-16°C. Особливо виявився штам Дон 21.3 інтродуковано в культуру в Південній центральній, південно-східних регіонах України.

Фізіолого-біохімічні властивості.

Фізіолого-біохімічні властивості штамів і видів їстівних грибів характеризують їх відношення до різноманітних джерел вуглецевого та азотного живлення, електрофоретичною рухомістю водорозчинних білків

У складі живильних середовищ в якості джерел вуглецю вивчалися глюкоза, сахароза, мальтоза, галактоза лактоза і маніт. Об'єктами цієї серії дослідів були обрані штампи Дон-140, НК-35, Дон 21.3.

Глюкоза, мальтоза, лактоза і маніт забезпечували накопичення біомаси у межах 2,5-3-3,5г/л сухої речовини. Мальтоза набагато краще задовольняє речовинні і енергетичні потреби усіх штамів, але ріст штаму Дон 21-3 переважає усі інші штамми.

У якості джерел азотного живлення модифіковане поживне середовище Чапека в еквівалентних по азоту кількостях вносились глютамінова і аспа-

рагінова амінокислоти, сечовина, сульфат амонію, нітрат натрію і нітрат амонію.

Для штаму Дон 21.3 та інших найбільш придатними джерелами азотного живлення є глютамінова і аспарагінова амінокислоти (4,2г/л).

Найменш придатним джерелом азотного живлення виявилась сечовина. Накопичення біомаси в її присутності майже в двічі нижче, ніж під впливом аспарагінової, глютамінової амінокислот. Оскільки амінокислоти є дефіцитними і високо коштовними джерелами азоту, більш перспективними слід вважати нітрат і сульфат амонію. Таким чином оновлення колекції штамів гливи звичайної та інших їстівних дереворуйнівних грибів, їх селекцію та гібридизацію слід здійснювати з обов'язковим урахуванням фізіолого-біохімічних властивостей щодо створення рецептури поживних середовищ [1, 3, 4, 7, 11, 15, 16, 18].

Біосинтетичні властивості.

Біосинтетичну діяльність вищих базидіальних грибів оцінюють як продуктивну здатність синтезувати низько, середньо та високо молекулярні сполуки.

Мономерам, тобто вуглеводам, органічним кислотам та амінокислотам приділяють увагу для дослідів їх як продуктів експресії генів. Амінокислотний склад завжди вивчається з метою оцінки харчової належності, або можливості використання відробленого субстрату для корма свійських тварин.

Об'єкт вивчення корисної моделі штам Дон 21.3 вивчався як продуцент водорозчинних білків-альбумінів. Водорозчинні білки можуть бути не тільки ендо, але і екзотет абелітами тобто здібні виділятися у культуральний фільтрат.

Одночасно зміна кількісного вмісту лужних або кислих амінокислот та органічних кислот істотно впливає на рН фільтрату. Можливо, що в цьому полягають механізми регуляції фізіолого-біохімічних процесів на організменому рівні.

Результати дослідів цього напрямку ілюструються даними Таблиці 4.

Таблиця 4

Водорозчинні білки і рН середовища після культивування
міцелію штамів і ізолятів на рідинному середовищі

Штами і ізоляти	Вміст екзобілку в залежності від віку		Значення рН		
	на 15 мг/мл	на 30 мг/мл	Контроль	на 15 добу	на 30 добу
Дон 21.3	16,5±0,4	10±0,3	5,8	5,9	6,0
Дон 21.4	12,4±	9,8 ±0,2	5,8	5,9	6,5
Дон 21.5	12,5±0,1	8,3±0,3	5,8	5,9	6,8
Дон 21.7	12,3±0,2	9,1±0,2	5,8	5,9	6,3
Дон 140	15,5±0,3	9,8±0,4	5,8	5,9	6,5
Дон 112	13,5±0,1	9,2±0,4	5,8	5,9	6,4
НК-35	17,0±0,2	10,2±0,3	5,8	5,9	6,5
К-99	12,1±0,3	8,5±0,4	5,8	5,9	7,0
О-8-04	10,5±0,1	8,±0,2	5,8	5,9	7,1
Т-11-04	11,1±0,2	8,2±0,3	5,8	5,9	7,2

Дані таблиці свідчать про істотні зміни вмісту екзобілків і рН від тривалості культивування. Найвища концентрація білків культурального фільтрату спостерігається у штамів. Дон 21.3 та НК-35 на 15 добу. На 30 добу концентрації зменшуються до

10,3-8,1 мг/мл.

Ці результати можна розглядати як результат поглинання одних речовин та виділення в оточуюче середовище інших речовин у фізіологічно-біохімічних перетворень у клітинах різного віку.

Таблиця 5

Відносна електрофоретична рухливість екзобілків на 15 добу

Ізоляти і штам Р. Ostreatus									
ВЕР	Дон 21.5	О-8-04	Дон 21.3	Дон 21.4	107	Дон 21.7	К-99	Дон 104	НК-35
1	-	-	-	-	0,025	0,025	-	-	-
2	0,043	-	-	-	-	-	0,043	-	-
3	-	0,051	-	0,051	-	-	-	-	-
4	-	-	0,060	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	0,068	-
6	-	-	-	-	-	0,077	0,077	-	0,077
7	-	-	-	-	0,086	-	-	-	-
8	-	-	-	0,094	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	0,112	0,112	-	-
10	0,120	0,120	0,120	-	0,120	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	0,129	-
12	-	-	-	0,160	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	0,163	-	-	0,163
14	0,198	-	-	-	-	-	0,198	-	-
15	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	0,215	-
17	-	-	-	-	-	0,25	0,25	-	0,25
18	-	-	0,267	-	-	-	-	-	-
19	0,310	-	-	-	0,310	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	0,318	-	-
21	-	-	-	-	-	0,320	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	0,336
23	-	-	-	-	0,392	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	0,370	-
25	-	-	-	0,39	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	0,422

Одержані результати наведені у Таблиці 5. Вони підтверджують фізіологічну різноякісність ізоляту О-8-04, штамів селекції кафедри, одержаних у попередніх роках (К-99, Дон 104). Серед них

можна виділити штам з чотирма (Дон 21.4, Дон 21.5, Дон 104) трьома (Дон 21.3), п'ятьма (НК-35, 107) і шістьма (Дон 21.7) зонами екзобілків. Зони з рухливістю 0,025 спільні для штамів 107 і Дон 21.7;

0,043 відповідно Дон 21.5 і К-99; 0,51-О-8-04, Дон 21.4. Білки з рухливістю 0,120 спільні для штамів Дон 21.5; О-8-04 і 107. Для кожного ізоляту і штаму є індивідуальні білки, тобто штамові-специфічні - екзобілки, наприклад 0,267 у Дон 21.3; 0,39 - Дон 21.4; 0,422.

Істотно нові дані виявляються на 30 добу культивування як це можна бачити із даних Таблиці 6.

Найбільша кількість білкових зон з числа виділених зовні (екзобілоків) виділена в природньому ізоляті О-8-04, як це впливає із Таблиці 6, а найменша у штаму Дон 21.5 - у цього гібриду кількість білкових зон на 4 менш (7), ніж ізоляту О-8-04 (11).

Дев'ять зон характерні для штаму 107.

У штамів Дон 21.3; Дон 21.4; і Дон 21.7 виявлено по 8 білкових зон. Подібність ізоляту О-8-04 і гібриду Дон 21.5 складає лише 5,8% О-8-04; 21.4-10,5%. Найбільш істотний коефіцієнт подібності у пари О-8-04-21.3. Ступень подібності тут найбільш значуща і складає 42,1%. У всіх останніх випадках ступень подібності варіює у межах - 13,3; 20; 35; 25; і 23%.

Метод порівняння спільних екзобілкових зон дозволяє підтвердити походження гібриду Дон 21.3 від дикорослих, стійких до екстремальних факторів ізолятів і НК-35.

Таблиця 6

Водорозчинні білки у культуральному фільтраті гливи на 30 добу

Штами і ізоляти						
ВЕР №	О-8-04	Дон 21.5	Дон 21.4	Дон 21.3	Дон 21.7	107
1	0,054	-	-	-	-	-
2	-	-	0,072	-	-	0,072
3	0,090	0,090	-	0,090	-	-
4	-	0,109	-	0,109	0,109	0,109
5	0,127	-	-	-	-	-
6	0,163	-	-	-	-	-
7	0,2	-	-	0,2	0,2	0,2
8	-	-	0,218	-	-	0,218
9	-	-	0,236	-	-	-
10	-	-	-	-	0,245	-
11	0,254	-	-	-	-	0,254
12	-	-	-	0,271	-	-
13	-	-	-	-	-	0,272
14	-	-	0,281	0,281	-	-
15	-	0,290	-	-	-	-
16	-	-	-	-	0,3	-
17	-	-	0,309	-	-	-
18	-	-	-	-	-	0,327
19	0,363	-	-	-	-	-
20	-	-	-	0,372	-	-
21	-	0,381	0,381	-	-	0,381
22	-	-	-	-	0,390	-
23	-	0,409	-	-	-	-
24	0,436	-	0,436	-	-	-
25	-	-	-	-	-	0,445
26	0,454	-	-	0,454	-	-
27	-	-	-	-	0,5	-
28	0,545	-	-	0,545	-	-
29	-	-	-	-	0,554	-
30	-	0,563	-	-	-	-
31	0,618	-	-	-	-	-
32	-	-	0,636	-	-	-
33	-	0,654	-	-	-	-

По загальним для різних штамів зонами ВЕР вираховували індекси подібності (генетичної спорідненості). Підрахунки свідчать про різноманітні взаємовідносини екзобілоків як продуктів експресії генів в мітохондріях.

Впровадження селективного штаму Дон 21.3 у виробництво посівного міцелію і плодівих тіл харчового призначення визначається врожайними показниками, товарними і смаковими якість. Результати досліджень наведені у Таблиці 7.

Таблиця 7

Врожайність штамів (в кг/блок) на солоні ячменю після ксеротермічної обробки (по результатам дисперсійного аналізу)

Показники вибірок №	1) Вибіркова середня 2) врожайність у %	Порівняння Середніх за Даннетом	Порівняння середніх за Дунканом	Різниця між даними	
1) гібрид ДонНУ 21 3	3,616±0,013	Різниця між даними [1-2]-0,546 різниця вірогідна Різниця між даними [1-3]-0,802 різниця вірогідна	Критичне значення 0041		
	2) 30%		Різниця між середніми [3-2]	0,256	Різниця вірогідна
2) гібрид Дюрко НК-35	3,070±0,015		Критичне значення 0,044		
	2) 26%		Різниця між середніми [3-1]-	0,802	Різниця вірогідна
3в) штам ДонНУ Дон-112 (КВ 1017)	2,814±0,016		Критичне значення 0,041		
	2) 23%		Різниця між середніми [2-1]-	0,546	Різниця вірогідна

Дані Таблиці 7 свідчать про вірогідну різницю більш високої врожайності одержаного та інтродукованого штаму Дон 21.3 в порівнянні з аналогом і прототипом.

У порівнянні зі штамом Дон 112 врожайність штаму Дон 21.3 вище на – 7%, а у порівнянні зі штамом НК-35 - на 4%.

Одержаний штам Дон 21.3 відрізняється іншими важливими властивостями: добрими габітусами плодівих тіл і стійкістю до деяких конкурентів за субстрат. Виявлена стійкість штаму у відношенні до пеніцилів, хетоміума, аспергилів, фузаріумів, альтернатії.

Товарні і споживні якості штаму полягають в наступному: 1) Зростки складаються з 15-30 плодівих тіл в середньому 295-330 грамів. 2) Діаметр шапинки варіює у межах 3,5-3,8; 5,5; 12,5см. 3) Діаметр ніжки 1,5-1,8см, а її довжина 1,5-3см. Вага плодового тіла 6-19,34. М'якуш шапинки товстий, щільний, колір кутикули коричнювато-сірий, або світло сірий в залежності від умов освітлення.

Штам Дон 21.3 прийнято на депонування в Колекції культур шапинкових грибів до інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного 21.09.2005.

Джерела інформації які використані при укладанні заявки

1. Авторское свидетельство СССР №1242050 «Субстрат для выращивания съедобного гриба вешенки обыкновенной» / Сычев П.А., Негруцкий С.Ф. Зубченко Л.И и др. Опубл. 07.07.1986г. Бюл. №5.

2. Авторское свидетельство СССР №1755735 „Штам соматических структур макроскопического гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr) Kummer” / Сычев П.А., Негруцкий С.Ф. Кипень А.Н. и др. Опубл. 23.08.1992г. Бюл №31. (Аналог).

3. Авторское свидетельство СССР №1540059 «штамм соматических структур макроскопического гриба *Flammulina velutipes* (Fr) Karst» для получения препарата против корневой гнили хвойных пород / Сычев П.А., Фильчаков Л.П., Негруцкий

С.Ф., Ветрова Е.В. Дсп, Действие с 01.01.1999г.

4. Авторское свидетельство СССР №1490954 «Питательная среда для выращивания пениофори гигантской / Сычев П.А., Фильчаков Л.П., Негруцкий С.Ф. Действие 01.03.1999г.»

5. Бисько Н.А, Дудка И.А. Биология и культивирование грибов рода вешенка - Киев: Наук думка - 1987. - 147с.

6. А.С. Бухало, Н.Ю. Митрольская. Каталог коллекции шапинковых культур (IBK). Київ: Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної Академії наук України - 2001р. - 32с.

7. Грибы и грибоводство /Сычев П. А., Ткаченко Н.П./ под Ред. П.А. Сычева. - Донецк: Сталкер, 2003г. - 512с.

8. Держпатент на винахід №28397 А Поживне середовище для селекції та гібридизації штамів гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr) Kummer /Сичов П.А., Тимофеев О.А., Ткаченко Н.П., Каліберда Г.В. Опубл. 16.10.2000г. Бюл. №5.

9. Деклараційний патент України №29744 А «Поживне середовище для оновлення колекції штамів гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr) Kummer /Сичов П.А., Тимофеев О.А., Каліберда Г.В. Опубл. 15.11.2000г. Бюл.№6.-11”.

10. Деклараційний патент України №29725 А „Живильне середовище для роботи з чистими культурами вищих базидіоміцетів” Сичов П.А., Ткаченко Н.П., Тимофеев О.А., та ін Опубл 15.11.2000, Биол №6-11.

11. Дудка И.А., Вассер С.П., Бухало А.С. и др. Промышленное культивирование съедобных грибов - Киев: Наукова думка, 1987г. - 264с.

12. Дудка И.А, Бисько Н.А., Билай В.Т. Культивирование съедобных грибов - Киев. Урожай, 1992г. - 160с.

13. Дудка И.А., Вассер С.П. Грибы: Справочник миколога и грибника- К: Наукова думка, 1987г, 535с.

14. Дудка И.О., Бисько Н.А., Цизь О.М., Митрольская Н.Ю., Розробка наукових основ грибовни-

цтва та їх практична реалізація в аграрному комплексі України./ Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Достижения, проблемы и перспективы культивирования грибов». Современные технологии. 29 сентября - 2 октября 2005 года г. Донецк: Норд Компьютер, с.3-6.

15. Разведение грибов. Краткое описание гибридных штаммов - Мицелий /Морозов А.Н., Тимофеев А.А. Донецк: «Сталкер» 2001г. - 42с. (Прототип).

16. Методы экспериментальной микологии справочник / Отв. Ред. В.И. Билай К. Наукова думка 1982, - 550с.

17. Рыбальский Н.Г., Вассер С.П., Дудка И.А. Патентоспособность биологических объектов -

Киев: Наукова думка, 1988г, 237с.

18. Сычев П.А. Экофизиология высших грибов - Донецк: Кассіопея, 2000г - 275с.

19. Технологический регламент получения посевного мицелия (грибницы) культивируемых базидиомицетов / Сычев П.А., Тимофеев А.А., Ткаченко Н.П. -Донецк: ДонНУ, 2000г. - 24с.

20. Ericson K.E, Blanchette R.A, Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Hedelblirg Springier-Verlag, 1990 - с.3-15.

21. Eger G Untersuchungen zur Fruchtenbildug des Kulfur champignons - Muchroom: Sci, 1992, №5, p.314-320.