

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

БОЙКО
МИХАЙЛО ІВАН

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГРИБИ PINUS SYL-
VESTRIS L.- HETEROBASIDIUM ANNOBUM (FR.) BREF І
ПЕРСПЕКТИВИ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ
ДЕЯКИХ ДЕРЕВОРУЙНІВНИХ ГРИБІВ

03.00.12 - фізіологія рослин

03.00.24 - мікологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ 1996

№. 36. 400

582. 28

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00760698 (-)

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі фізіології рослин Донецького державного університету

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, Негруцький Сергій Федорович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Калінін Федір Леонтіївич
доктор біологічних наук, професор Зайченко Олександр Максимович
Лауреат державної премії України, доктор біологічних наук Соломка Ельвіра Федорівна

Провідна установа: ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Захист відбудеться "9" 01 "1997р. о "12" годіні на засіданні спеціалізованої ради Д. 01.01.07. по захисту дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук на біологічному факультеті Київського університету імені Тараса Шевченка за адресою 252127, м. Київ - 127, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського університету імені Тараса Шевченка.

"

Автореферат розіслано "6" з'явень 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради кандидат біологічних наук, професор О. В. Брайон.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ. Захист хвойних порід від гриба *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (коренева губка) є складовою частиною лісової екології. Рівень екологічного пізнання популяцій багатьох деревних рослин лісних біоценозів не відповідає рівню біологічних наук і потребам лісівництва (Мамаєв, Санніков, 1990). Ефективне управління природними лісовідновними процесами можливе тільки на основі фундаментального вивчення їх особливостей в різних регіонах і типах лісу з позицій сучасної екології (Санніков, Парпан, 1990). Це повною мірою стосується і вивченості конкретних популяцій кореневої губки і хвойних рослин, які пошкоджені цим грибом. Вивчення взаємовідносин на основі фізіолого-біохімічних показників системи *Pinus sylvestris* L. - *Heterobasidion annosum* має важливе теоретичне і практичне значення для лісного господарства. Стійкість рослин до хвороби і вірулентність збудника хвороби є взаємозв'язаними динамічними процесами, які знаходяться під генетичним контролем цих організмів. Результат взаємовідносин між ними визначається не стільки їх генами, скільки взаємовідношенням продуктів, які синтезуються завдяки діяльності цих генів (Дьяков, 1977). Тому такі дослідження є корисними для розуміння таких загальнобіологічних явищ, як паразитизм, патогенез, генетичний поліморфізм, специфічність та ін. Поряд з цим пізнання природи стійкості хвойних рослин і вірулентності кореневої губки дає можливість керувати цими процесами за допомогою селекційних, агротехнічних заходів та взаємовідносин між патогеном і ґрунтовими організмами.

Коренева губка дуже розповсюджена і приносить велику шкоду лісному господарству України, Білорусі, Росії, Прибалтійських країн та інших держав світу (Негруцький, 1973, 1986; Федоров, 1970, 1984; Алексеев, 1974; Василяускас, 1981, 1989; Полещук, 1991; Стороженко, 1994 та ін.).

Описані характерні особливості гнилі, яка зумовлюється цим грибом, у різних порід дерев, біологічні особливості патогену, але майже без врахування його штамового різноманіття і фізіолого-біохімічних показників рослини-хазяїна конкретних популяцій. Ще меншою мірою вивчено формування і фізіолого-біохімічні особливості системи хвойної рослини-кореневої губки, де важлива роль повинна відводитись пізнанню фермен-

тних систем. токсинів. фітогормонів патогена і ґрунтовій мікрофлорі, грибам сапротрофам, які мають антагоністичну дію на кореневу губку.

Універсальних і ефективних засобів боротьби з кореневою губкою пока не існує. В цьому плані заслуговує уваги біологічний метод боротьби з патогеном. При розробленні цього методу необхідно враховувати не тільки екологічні особливості штамів антагоністів (Горленко, 1972, 1979), але і штамове різноманіття кореневої губки. Без врахування цих особливостей застосування біопрепарату в інших екологічних умовах паразитування кореневої губки може не дати належного ефекту.

Поряд з цим важливу роль в біогеоценозах виконують сапротрофні гриби. Вони беруть участь не тільки у мінералізації рослинних, тваринних залишків, в утворенні гумусу, але і виділяють в середовище мешкання біологічно активні речовини - ферменти, амінокислоти, органічні кислоти, антибіотики, токсини та інші сполуки. У зв'язку з цим багато видів грибів можуть використовуватись для приготування біопрепаратів і препаратів на основі їх екзометаболітів проти кореневої губки, а також в харчовій, медичній, парфюмерній промисловостях і сільському господарстві. З цієї точки зору гриби є цінними біотехнологічними об'єктами (Бухало, 1973, 1988; Дудка и др. 1978, 1987; Соломко, Дудка, 1985; Даниляк, Семичаєвський, Дудченко, Трутнева, 1989; Горленко, Бондарцева, 1990; Бєлова, 1994 та ін.), які вимагають розробки стратегії їх охорони (Дудка, Вассер, 1992).

МЕТА І ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Головною метою роботи було вивчення фізіолого-біохімічних основ взаємовідносин у системі *Pinus sylvestris* L., *Pinus pallasiana* L. і *Heterobasidion annuum* (Fr.) Bref, (коренева губка), мінливості *Pinus sylvestris* за якістю насіння, міжпопуляційної і внутрішньопопуляційної мінливості кореневої губки, природи токсинів цього патогену і їх ролі в патогенезі сосни звичайної, антагоністичних взаємовідносин між новими культурами дереворуйнівних грибів і штамми кореневої губки, визначення природи екзометаболітів дереворуйнівних грибів і можливості їх використання для боротьби з кореневою губкою і в харчовій промисловості.

У зв'язку з вищесказаним нами були поставлені такі зав-

дання

1. Порівняльне вивчення фізіолого-біохімічних показників проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*, які були інфіковані штамами однієї популяції кореневої губки.

2. Вивчення мінливості *Pinus sylvestris* за якістю насіння і визначення ступеня ураженості проростків, які були одержані із насіння різного забарвлення, штамами кореневої губки.

3. Здійснити порівняльне дослідження культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак моноспорових, гетерокариотичних культур і штамів однієї і різних популяцій *H. annosum*.

4. Визначити природу токсичних речовин штамів однієї популяції кореневої губки і їх роль у патогенезі сосни звичайної.

5. Визначити природу екзометаболітів дереворуйнівних грибів *Fomitopsis pinicola*, *Coltricia perrenis* і *Hirschioporus laricinus* - антагоністів кореневої губки і можливість їх використання для боротьби з цим патогеном.

6. З'ясування можливості використання позаклітинних білків з молокозгортаючою функцією продуцента *Hirschioporus laricinus* у харчовій промисловості.

ТЕОРЕТИЧНЕ І ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Одержані нові експериментальні дані про формування і фізіолого-біохімічні особливості системи сосна звичайна - коренева губка. Вперше показана роль речовин вуглеводної природи - ксилози, арабінози, сахарози, целобіози, аміаку, сполуки, близької до природи 5-н-бутилпіколінової кислоти, пероксидази, які виділяються штамами однієї популяції кореневої губки в субстрат, у патогенезі сосни звичайної. Установлена внутрішньопопуляційна мінливість за рядом ознак рослини-хазяїна, патогену і роль сапротрофних дереворуйнівних грибів у обмеженні розповсюдження кореневої губки стосовно до конкретних екологічних умов їх існування, що має теоретичне і практичне значення для лісівництва та селекційної роботи. Ці дослідження допомагають глибше зрозуміти біологію системи і розробити на основі антагоністів або їх екзометаболітів більш ефективні біологічні засоби боротьби з цим патогеном.

Поряд з цим установлена хімічна природа екзометаболітів дереворуйнівних грибів - *Fomitopsis pinicola* і *Hirschioporus*

laricinus - антагоністів кореневої губки і показана можливість їх використання не тільки для боротьби з кореневою губкою, а також в інших галузях господарства.

Розроблена технологія культивування штама M-81 *Hirschioporus laricinus* - нового продуцента протеїназ молокозгортаючої дії в біореакторі "Біор-0,1" і спосіб одержання ферменту у кристалічному стані. Складений медико-біологічний висновок про можливість використання ферментного препарату у сироварінні. Розроблені технічні умови і технічна інструкція на ферментний препарат - ларіцин.

ПОЛОЖЕННЯ, ЯКІ ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ І СТУПІНЬ ЇХ НОВИЗНИ.

1. Формування і фізіолого-біохімічні особливості системи сосна звичайна - коренева губка, сосна кримська - коренева губка. Мінливість сосни звичайної за якістю насіння (масі, кольору, вмісту білка) та характеристика стійкості проростків, які були одержані із насіння різного забарвлення, до штамів кореневої губки.

Вперше показано, що у формуванні системи *P. sylvestris* - *Heterobasidion annosum* беруть участь ферментні системи, токсини та інші речовини патогена. Вперше встановлено різну фізіолого-біохімічну реакцію проростків *P. Pinus* на інфекцію штамів однієї популяції кореневої губки і різний ступінь їх вірулентності до сосни. Показано, що в південно-східній частині України переважають особини сосни, яка продукує насіння з чорним забарвленням. Проростки, які були одержані із насіння з чорною оболонкою, показали підвищену стійкість до кореневої губки, ніж проростки із насіння бежевого кольору. Цю особливість насіння сосни звичайної необхідно використовувати при відновленні соснових насаджень і в селекційній роботі.

2. Природа токсичних речовин кореневої губки та їх роль в патогенезі сосни звичайної.

Вперше обговорюється можлива роль у патогенезі сосни звичайної ксилози, арабінози, целобіози, сахарози та інших вуглеводів, аміаку, сполуки, близької за природою до 5-н-бутилпіколінової кислоти і пероксидази.

3. Фізіолого-біохімічні особливості штамів однієї і різних популяцій кореневої губки, характеристика взаємовідносин між штамами *H. annosum* і грибами-антагоністами і їх роль в

обмеженні розвитку кореневої губки.

Вперше встановлена відмінність фізіолого-біохімічних показників штамів однієї популяції кореневої губки, яку необхідно враховувати при розробці біологічних засобів боротьби з даним патогеном у конкретних екологічних умовах. Взаємовідношення між кореневою губкою і грибами-антагоністами відбувається через екзометаболіти (органічні кислоти, білки та ін.). Хімічна природа екзометаболітів визначає ступінь антагонізму грибів.

4. Можливість використання екзометаболітів грибів-антагоністів в інших галузях господарства, зокрема, в харчовій. Технологія культивування *Hirschioporus laricinus* - нового активного продуцента протеїназ молокозгортаючої дії в біореакторі "Біор-0,1", одержання фермента в кристалічному стані і можливість його використання у сироварінні.

Вперше показана можливість використання *Hirschioporus laricinus* - антагоніста кореневої губки в біотехнології для одержання протеїназ молокозгортаючої дії і їх застосування у сировиробництві.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідалися (або представлялися) на республіканських, регіональних, всесоюзних, міжнародних конференціях, нарадах, симпозиумах Всесоюзній конференції з використання хімічних та біологічних засобів у боротьбі з шкідниками лісу (Москва, 1976), VI з'їзді Українського ботанічного товариства (Київ, 1977), 1, 3 Всесоюзних конференціях з біопшкодження (Москва, 1978, 1987), Всесоюзній науково-практичній конференції з проблем охорони природи і захисту лісу (Брянськ, 1979), зональній науково-практичній конференції Білорусії і республік Прибалтики (Мінськ, 1981), 7 з'їзді Українського ботанічного товариства (Київ, 1982), Всесоюзному симпозиумі мікологів і ліхенологів "Екологія і біологія нижчих рослин (Мінськ, 1982), регіональній науково-виробничій конференції Білорусії і Прибалтійських республік (Мінськ, 1984), Всесоюзній нараді із захисту агролісомеліоративних насаджень і степових лісів від шкідників і хвороб (Волгоград, 1986), науково-практичній нараді Прибалтійських республік і Білорусії "Інтегрований захист лісу від шкідників і хвороб" (Каунас-Гіріоніс, 1986), 8 з'їзді Українського ботанічного товариства (Київ, 1987), 9-му делегатському з'їзді Всесоюзного ботанічного товариства

(1987), Всесоюзній науковій конференції "Фізіолого-біохімічні основи імунітету до грибних хвороб рослин" (Уфа, 1988), Міжнародному симпозиумі "Лісова генетика, селекція і фізіологія деревних рослин" (Москва, 1989), 1 Всесоюзній нараді "Хемотаксономічне визначення спорових рослин і грибів" (Київ, 1990), Всесоюзній конференції "Проблеми лісознавства і лісної екології" (Москва, 1990), 9-тій Всесоюзній нараді з насінництва інтродуцентів "Репродуктивна біологія інтродукованих рослин" (Умань, 1991), Міжнародній конференції "Проблеми лісної фітопатології та мікології" (Москва-Каунас, 1991), Другій Всесоюзній науково-технічній конференції "Охорона лісних екосистем і раціональне використання лісних ресурсів" (Москва, 1991), 9 з'їзді Українського ботанічного товариства (Київ, 1992), 4-тій науково-технічній конференції "Захист лісів Українських Карпат від хвороб і шкідників" (Івано-Франківськ, 1992), Міжнародній науковій конференції "Промислова ботаніка" (Кривий Ріг, 1993), Міжнародній науковій конференції "Проблеми лісної фітопатології та мікології" (Москва, 1994).

ПУБЛІКАЦІЇ. Основний зміст дисертації опублікований у 60 роботах, з них 1 патент України, 3 авторських свідоцтв.

СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертація складається із вступу, 11 розділів, висновків, списку літератури. Загальний об'єм дисертації складає 461 сторінку машинописного тексту. До списку літератури входить 561 робота вітчизняних та зарубіжних авторів. Робота містить 100 таблиць і 29 малюнків.

ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. СТАН ВИВЧЕННЯ ПРОБЛЕМИ

На основі літературних джерел дано огляд сучасних уявлень про формування та фізіологічні основи взаємовідносин у системі рослина-хазяїн-паразит, розповсюдження кореневої губки та фактори, які обмежують її патогенність і вивченість фізіолого-біохімічних показників *N. annosum*.

Відповідно до теорії В. В. Вердеревського (1959, 1968) у рослин в умовах постійного тиску інфекційного фону виникає неспецифічний (видовий), а потім - специфічний (сортовий) імунітет. У процесі сумісної еволюції рослини-хазяїна і патогену на їх батьківщині з'явилися форми рослин, які зберігають генетичний імунітет протягом довгого часу (Вавілов,

1919; Жуковський, 1959, 1973). Поряд з цим йде утворення і більш вірулентних рас патогенів. При взаємодії цих генетичних систем у природі утворюються збалансовані відношення, які перешкоджають виникненню епіфітотій серед диких рослин (Дьяков, 1973). Але при введенні цих рослин у культуру відбувається порушення цього балансу, що спонукає виникнення різних захворювань. Слід відмітити, що ці теорії ґрунтуються на основі досліджень взаємовідносин сільськогосподарських рослин і їх патогенів.

Про механізми, які відповідають за формування системи хвойна рослина-коренева губка, на популяційному рівні майже нічого невідомо. Тим більше, що *H. annosum*, як вид є гетерогенним і складається із інтерстерильних "P", "S" і "F" груп, які в основному паразитують на різних рослинах-хазяїнах - сосні, ялині і ялиці, відповідно (Korchonen, 1978; Mugnai, Capretti, 1989; Siepmann, 1989 та ін.). Повідомляється про різну стійкість 5 видів хвойних рослин до 8 ізолятів *H. annosum* і 4 дерев *Tsuga heterophylla* до 5 штамів кореневої губки (Hsieng, Edmonds, 1989) і неоднакову реакцію "P" і "S" - груп щодо штамів гриба-антагоніста *Peniophora gigantea* (Негруцький, Запорожченко, Сухономлін, 1989). Про паразитування різних клонів (штамів кореневої губки на невеликих площах хвойного лісу свідчать дані (Бойко, 1975; Stenlid, 1985; Мокрицький, 1994). Вона має широкий набір ферментних систем (Маттісон та ін., 1966; Федоров, Стайченко, 1969; Федоров, 1971, 1984; Бойко, Негруцький, Божко, 1979; Hrib et al., 1988 та ін.), токсинів, із яких відомо тільки фоманозин (Vasvet et al., 1967; Hirofani et al., 1977). Це дає можливість кореневій губці формувати відповідні взаємовідносини з певною рослиною-хазяїном, механізми яких в літературі не описано.

У запобіганні розповсюдження *H. annosum* у хвойних насадженнях важливу роль виконують сапротрофні гриби (Негруцький, 1963, 1981, 1987; Василяускас, 1964, 1984; Федоров, Єрмак, 1971; Федоров, 1984; Сичов, 1970; Бойко, 1975; Фільчаков, 1984; Хансо, 1986; Яковенко, Якимов, 1986; Полешук, 1991; Стороженко, 1994; Delatour, 1990; Redfern, 1991 та ін.). Слід відмітити, що при розробці біологічних засобів боротьби з цим патогеном, необхідно більш детально вивчати штамове різноманіття грибів-антагоністів, кореневої губки і

хвойних насаджень, які зростають в конкретних кліматичних умовах. Як відмічає І. О. Дудка (1982), грибні угруповання неможливо виділити у самостійний ценоз, їх необхідно розглядати як компоненти фітоценозу, які мають консортивні зв'язки з іншими членами системи. Поряд з цим необхідно відмітити низький рівень визначеності екзометаболітів грибів-антагоністів, котрі можуть використовуватись не тільки для боротьби з кореневою губкою, а також в інших галузях господарства.

Розділ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були системи *P. sylvestris* - *Heterobasidion annosum*, *P. pallasiana* - *H. annosum*, які вирощували на агаризованому середовищі Чапека-Докса (Гродзинський, Гродзинський, 1973), з виключенням високої концентрації сахарози, в зв'язку з пригніченням проростання насіння.

Ступінь вірулентності штамів однієї популяції *H. annosum* визначали на 6-й, 9-й і 12-й день після інюкуляції проростків за кількістю загиблених рослин.

У процесі розвитку патологічного процесу у проростках визначали активність о-дифенолоксидази, а також загальної, розчинної і іонозв'язаної фракції пероксидази за А. Н. Бояркіним (1961), В. Ф. Гавриленко та ін. (1975). Реєстрацію змін у синтезі ізоферментів пероксидази і о-дифенолоксидази під впливом інфекції здійснювали електрофоретичним методом в паралельних пластинках поліакриламідного геля (Сафонов, Сафонова, 1971; Маурер, 1971; Трувеллер, Нефедов, 1974).

Вміст білку в кожній фракції пероксидази визначали за Бредфордом (Bredford, 1976) у модифікації С. В. Шепілової (1985). В кожну комірку верхнього гелю вносили по 100 мкг білку.

Виділення чистих культур штамів кореневої губки й інших дереворуйнівних грибів проводили відповідно загальноприйнятими методиками (Ріпачек, 1967; Білай, 1973; Бухало, 1982).

Культурально-формологічні показники штамів *H. annosum* вивчали на вітальних препаратах відповідно до методики Н. М. Подопличко (1953); Є. З. Коваль, Л. Т. Горбик (1982). Індекс форми конідій визначали за відношенням їх довжини до ширини (Пармасто, Пармасто, 1982).

Вплив температурного режиму на ріст штамів *H. annosum* проводили на глюкозо-картопляному середовищі при температурі

-2, 0, 2, 10, 15, 20-32 з інтервалом 2°C і при 35° С. При цьому реєстрували лінійний ріст (мм) кожної доби.

Визначення оптимальної величини рН для росту штамів гриба проводили на рідкому живильному середовищі - пивне сусло розбавлене водою (1:4). Необхідне значення рН середовища одержували шляхом добавлення 10%-ного розчину HCl або 10%-ного розчину NaOH (Білай, 1973) і реєстрували на рН-метрі 340. Ріст штамів відбувався протягом 15 діб при оптимальній температурі 22-24°C та рН від 2,5 до 9,5. У кінці досліду реєстрували накопичення біомаси ваговим методом та зміну рН середовища на рН-метрі 340.

Множинні форми пероксидази, о-дифенолоксидази, каталази, α -амілази, глутаматдегідрогенази, малатдегідрогенази та малік-ензиму в міцелії штамів однієї популяції *H. ananosum* визначали за допомогою електрофорезу в паралельних пластинках поліакриламідного геля.

У магнітобіологічних дослідах використовували постійне магнітне поле (ПМП) двох видів - великої і малої напруги. ПМП великої напруги досягали за допомогою рогоподібної магнітної системи. Напруга магнітного поля в експериментальному просторі складала 2300 е. ПМП малої напруги одержували за допомогою плоского магніту (60 е). Вплив постійного магнітного поля на синтез водорозчинних білків та їх ізоферментів пероксидази вивчали за допомогою електрофоретичного методу.

Для виявлення токсичних речовин, які виділяються штамми кореневої губки у середовище, останні вирощували на мінеральному середовищі, де джерелом вуглецю був фільтрувальний папір (Білай, 1973). Фітотоксичні властивості культуральних фільтратів визначали за методикою О.А. Берестецького (1971, 1972).

Якісний склад цукрів у культуральних фільтратах визначали за допомогою радіальної хроматографії на папері за А. Н. Бояркіним (1955), Т. І. Білай (1982), а кількісний вміст їх на хроматограмах - за допомогою антронового реактиву (Туркіна, Соколова, 1971). Сумарний вміст цукрів визначали за Хедгорном-Іенсенем (Сіверс, 1973). Вплив цукрів культуральних фільтратів на проростання насіння сосни звичайної проводили шляхом вирізання відповідних ділянок хроматограми і екстракції їх теплою водою. Одержані розчини целобіози і

ксилози + арабінози використовували для поливання насіння. Через 7 діб вимірювали довжину корінців (ГОСТ-14161-86).

Кількість аміаку в культуральних фільтратах визначали за допомогою реактиву Несслера (Кочетов, 1980), а білку за методом Бредфорда.

Наявність токсичної сполуки, близької до природи 5-н-бутилпіколинової кислоти, в культуральних фільтратах визначали методом хроматографії на папері. Розділені речовини на хроматограмі продилялись в УФ-світлі хроматоскопа, потім їх вирізували і використовували для біоавтографічного проявлення (Богомолова, 1969, 1982).

Моноконідіальні культури штамів кореневої губки одержували шляхом змиву конідій водою з поверхні міцелія, який зростав на агаризованому середовищі. Після цього підраховували кількість конідій в 1 мл суспензії за допомогою камери Горяєва (Коваль, Горбик, 1982). Потім їх розбавляли водою до 40 - 50 шт. в 1 мл. Одержавши необхідну концентрацію конідій, за допомогою стерильної піпетки на 1 мл, переносили їх на стерильне живильне середовище, яке містило обмежувач росту - жовч (Ванін, 1934). Після виникнення колоній у чашці Петрі, за допомогою мікробіологічної петлі, переносили їх на агаризоване стерильне середовище в пробірках. Одержані таким чином моноконідіальні культури використовували у наступних дослідах. Ступінь вірулентності моноконідіальних культур штамів КС-3277 і КВ-82166 визначали на місячних проростках сосни звичайної. Характеристикою ступеня вірулентності була кількість загиблих проростків на 10-у добу після їх інкулювання.

Розділення хлорофілів а і b, каротину, віолаксантину та лютеїну в хворих і здорових проростках проводили методом хроматографії на папері, а їх кількісний вміст визначали на спектрофотометрі СФ-26 (Гавриленко та ін., 1975).

Вміст вільних амінокислот у проростках визначали за допомогою амінокислотного аналізатору фірми "Biotronik".

Визначення взаємовідносин між дереворуйнівними грибами і штамами кореневої губки проводили шляхом їх спільного вирощування на агаризованому глюкозо-картопляному середовищі в чашках Петрі. Після початку росту кожної доби проводили змірювання лінійного росту колоній грибів за допомогою лінійки.

Визначення загальної кислотності і кількісний вміст

лимонної і шавлевої кислот у культуральних фільтратах проводили методом хроматографії на папері (Єрмаков та ін., 1987). В інших культуральних фільтратах грибів, в зв'язку з великим вмістом позаклітинного білку, визначено його кількість за Бредфордом, активність протеїназ молокозгортаючої дії за методом Каваї і Мукаї (Kawai, Mukai, 1970), а розрахунок активності ферменту за формулою, яка була запропонована Д. Я. Типограф, Т. А. Петіною (1966).

Вплив різних вуглеводів, як джерел вуглецю, на активність протеїназ молокозвертаючої дії та накопичення біомаси *Coltricia perrenis* і *Hirschioporus laricinus* проводили на глюкозо-пептонному середовищі поверхневим способом при оптимальній температурі (31-32°C) і рН середовища (4,4-4,5). Це середовище було контрольним. В інших середовищах глюкозу заміняли другими цукрами в еквівалентній кількості до вуглецю глюкози.

Вплив різних джерел азотного живлення на утворення молокозвертаючого фермента проводили на глюкозо-пептонному середовищі, де пептон заміняли різними сполуками, які містили азот. Культивування грибів-продуцентів здійснювали поверхневим, глибинним способами і періодичним перемішуванням середовища.

Оптимізацію живильного середовища проводили за планом повного факторного експерименту ПФЕ-2 (Максимов, Піменова, Гречушкіна, 1976).

Одержання ферментного препарату сичужної дії із культурального фільтрату здійснювали шляхом осадження фермента сірчано-кислим амонієм при 55-80%-ному насиченні (Броновицька, Горетов, 1967) і очищення від низькомолекулярних речовин і баластних білків методом діалізу проти холодної дистильованої води. Целофан використовували як напівпроникливу мембрану, оскільки він пропускає сполуки з молекулярною вагою до 7000 - 10000 (Кейл, 1966). Надосадкову рідину, яка містила фермент, висушували за допомогою ліофільної сушки "Иней-3-2".

Амінокислотний склад ферментного препарату - ларицина після його кислотного гідролізу визначали за допомогою хроматографії на папері (Зайцева, Тюленева, 1966; Андреева, 1971; Закордонєць, 1982) і амінокислотного аналізатора марки ААА-881.

Одержаний цифровий матеріал обробляли за допомогою однієї і двофакторного дисперсійного аналізу для кількісних і якісних показників (Плохінський, 1970; Лакін, 1980). Порівняння середніх арифметичних величин здійснювали за допомогою *t*-критерія Стьюдента, а також розрахованих допусків Тьюкі і Дункан (Негруцький, Фільчаков, 1984).

Розділ 3. ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОРОСТКІВ *PINUS SYLVESTRIS* І *PINUS PALLASIANA*, ІНФІКОВАНИХ ШТАМАМИ ОДНІЄЇ ПОПУЛЯЦІЇ *HETEROBASIDION ANNOSUM*

3.1. Вірулентність штамів *H. annosum* до проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*

Одержані дані свідчать про те, що проростки сосни звичайної і сосни кримської неоднаково реагують на інфекцію штамів кореневої губки. Проростки сосни звичайної більш чутливі до гриба, оскільки вірулентність штамів на 12-ту добу інфекції у більшості склала 100%. Проростки *P. pallasiana* виявили більшу стійкість до штамів К-3, КС-3179, К-5 і особливо до штаму К-1. Тоді як до проростків *P. sylvestris* мінімальну ступінь вірулентності виявив тільки штам К-1. Цю особливість можна пояснити тим, що досліджувані штами були виділені у чисту культуру з плодових тіл *H. annosum*, які паразитували на сосні звичайній в Кременському лісгоспі Луганської області, звідки було одержане насіння для дослідження і їх метаболізм більш ретельно "підігнаний" до обміну речовин *P. sylvestris*, ніж *P. pallasiana* (Бойко, Лятошинська, 1990). Поряд з цим дані літератури свідчать про різну стійкість 4 дерев *Tsuga heterophylla* до окремих ізолятів *H. annosum* (Hsiang, Edmonds, 1989).

Таким чином, одержані нами дані і літературні матеріали дають основу для визнання існування фізіологічної спеціалізації кореневої губки до хвойних порід як внутрі так і між видами.

3.2. Активність пероксидази проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*, інфікованих штамми *H. annosum*

Пероксидазі приділяється значний науковий інтерес у зв'язку з тим, що вона бере участь у стійкості різних видів рослин до патогенних організмів (Рубін, Аршиховська, 1968;

Кравець, 1979; Гаврилюк, Шпильчак, 1981; Серова та ін., 1982; Казимова, Мехтієв, 1988; Власова, 1993 та ін. і у ксилолозі деревини (Решетнікова, 1994).

Одержані нами дані показують, що на початковому етапі зараження проростків сосни звичайної штамами однієї популяції кореневої губки спостерігається значне підвищення в коренях іонозв'язаної пероксидази під впливом дуже вірулентних штамів (КВ-82179, КВ-82167, КВ-82166, КС-3277 та КС-3179). У здорових проростках в процесі їх росту відмічено підвищення активності, як цитоплазматичної так і іонозв'язаної фракцій пероксидази в коренях і зменшення - в стеблах.

У свою чергу в проростках сосни кримської спостерігається підвищення активності цитоплазматичної пероксидази і зниження - іонозв'язаної в корнях у процесі розвитку хвороби. Такої чіткої закономірності в проростках *P. sylvestris* не знайдено, що можливо зв'язано з більш тонкою фізіологічною спеціалізацією до них штамів гриба і різноякісністю насіння сосни звичайної, тому що для досліду було взяте насіння з різним забарвленням їх оболонки.

3.3. Ізоферментний спектр пероксидази інфікованих проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*

Стійкість рослин залежить від здібності тканин активувати синтетичні й окисні процеси залежно від температурних умов (Мусієнко, Присяжнюк, Костюк, 1995), підготовки рослин до перезимування (Ган, Лукашевич, 1992), ступеня забруднення навколишнього середовища (Коршиков, Тарабрін, Бойко, 1987), дії патогенних організмів (Пастернак та ін., 1981 та ін.) Ці зміни на рівні білкових молекул в організмах можна зареєструвати за допомогою електрофорезу (Тверської, Булах, Шаповал, 1982; Созінов, 1985 та ін.).

Нами встановлено, що при зараженні проростків сосни звичайної і сосни кримської штамами кореневої губки відбуваються суттєві зміни у біосинтезі ізоферментів загальної, цитоплазматичної й іонозв'язаної пероксидази, які полягають у зникненні або з'яві нових форм ферменту порівняно зі здоровими рослинами (Бойко, Негруцький, 1990). Ці зміни характерніші для більш вірулентних штамів *H. annosum*. Поряд з цим електрофоретичні дослідження показали фізіологічну

різноміристю проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*. Так, корені здорових проростків *P. sylvestris* містять два, а корні *P. pallasiana* - шість ізоферментів пероксидази. Різниця виявлена і у форм цитоплазматичної й іонозв'язаної пероксидази. Не виключено, що ці відмінності є однією із ланок всього комплексу причин, які зумовлюють більшу стійкість сосни кримської до деяких штабів *N. annosum*.

3.4. Активність о-дифенолоксидази проростків *P. sylvestris*, *P. pallasiana*, інфікованих штабами *N. annosum*

Нами встановлено, що більш вірулентні штаби (KB-82179, KB-82166, KB-82167, KC-3079, KC-3179, KC-3277 і K-5) вже на початку пошкодження проростків *P. sylvestris* викликають підвищення активності о-дифенолоксидази в стеблах. Це свідчить про те, що в стеблах під впливом інфекції відбувається накопичення фенольних сполук, які викликають збільшення активності фермента. Слід відмітити, що визначення активності о-дифенолоксидази в стеблах *P. sylvestris* на початку патогенезу проростків можна використовувати цей фермент як тест для визначення більш вірулентних штабів відповідної популяції кореневої губки (Бойко, 1986). Відзначена тенденція підвищення активності фермента в стеблах *P. pallasiana*, але вона характерна як для стебел, пошкоджених середньовірулентним, так і для стебел, ушкоджених деякими високовірулентними штабами. Під впливом інших високовірулентних штабів активність фермента знаходиться на рівні здорових стебел. Під впливом слабовірулентного штаму активність фермента майже у 2 рази нижче, ніж у здорових.

3.5. Ізоферментний склад о-дифенолоксидази проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*, інфікованих штабами *N. annosum*

Під впливом інфекції штабів однієї популяції *N. annosum* в проростках *P. sylvestris* з'явилися дві нові білкові зони з ВЕР 0,07 і 0,349 і виявили о-дифенолоксидазну активність. У здорових проростках знайдено 4 ізоферменти з ВЕР на старті, 0,047, 0,209 і 0,279. Слід відмітити, що ізоферменти хворих проростків відрізняються за інтенсивністю забарвлення від здорових. У здорових проростків усі ізоферменти мали інтенсивне забарвлення. Отже, кількість фермента в кожній зоні

неоднакова і синтез ізоформ йде з різною швидкістю під впливом інфекції, що ще раз підтверджує фізіологічну різноякісність системи *P. sylvestris* - штами *H. annosum*.

При зараженні проростків *P. pallasiana* більш вірулентними штамами з'являється один новий ізофермент о-дифенолоксидази з ВЕР 0,104, низьковірулентний штам таких змін не викликає.

Отже, встановлена різна реакція сосни звичайної і сосни кримської на інфекцію штамів кореневої губки. Враховуючи, що сосна звичайна продукує насіння з різною масою і забарвленням, ці показники, можливо, можуть бути зв'язані зі стійкістю рослин до кореневої губки.

Розділ 4. МІНЛИВІСТЬ *PINUS SYLVESTRIS* L. ЗА ЯКІСТЮ НАСІННЯ

4.1. Мінливість сосни звичайної за масою і забарвленням насіння

Нами встановлено, що насіння, яке було одержане із різних лісництв України, являє собою суміш насіння з різним забарвленням. У більшості випадків (14 із 16) чорне і бежеве насіння не відрізняється за масою. При розповодженні сосни звичайної у південно-східну частину України збільшується кількість її біотопів, які продукують чорне і бежеве насіння з більшою масою і більшим процентним вмістом особин, які утворюють чорне насіння, ніж у північній частині держави. Сосну яка утворює чорне насіння можна розділити на три групи. Першу групу складають особини, які продукують легке, другу - середнє і третю - важке насіння. Не виключено, що це насіння буде відрізнятись за рядом фізіолого-біохімічних показників, що має значення в селекційній роботі, яка пов'язана із стійкістю сосни звичайної. Літературні дані (Корепанов, 1990) свідчать про те, що потомство дерев сосни, яке було одержане із важкого насіння, росте інтенсивніше, ніж нащадки - із легкого.

4.2. Мінливість чорного і бежевого насіння сосни звичайної за вмістом білка

Стійкі до кореневої губки дерева можна виростити із насіння з високими господарськоцінними спадковими ознаками. Дані В. А. Черепніна (1974) свідчать про значення у селекції сосни розміру насіння. Цінним показником виду є і кількісний

вміст білку в насінні (Бойко, Негруцький, 1991, 1992, 1993). Нами встановлено, що вміст білка в насінні не залежить від забарвлення його оболонки. Відповідно ці дві ознаки спадкуються незалежно одна від одної. Утворення і накопичення білку в насінні сосни, яка зростає в Україні, більшою мірою залежить від спадкових ознак материнського дерева, ніж від географічного фактору. Нами встановлено, що крашу схожість має те насіння, яке містить більше білку (Бойко та ін., 1996).

Таким чином, для інтродукції і відтворення соснових насаджень необхідно використовувати насіння з підвищеним вмістом білку, яке одержане від конкретних материнських дерев.

4.3. Ступінь ураження проростків *P. sylvestris*, які вирощені із насіння різного забарвлення, кореневою губкою

Нами встановлено, що у процесі розвитку хвороби, кількість уражених проростків залежить від ступеня вірулентності штамів, кольору насіння із яких були одержані проростки, сумарної дії цих факторів і їх взаємодії. Проростки сосни, які вирощені із бежевого насіння, пошкоджуються, приблизно, у 2 рази більше, ніж проростки із чорного насіння (табл. 1).

Таблиця 1

Ступінь ураження проростків *P. sylvestris* штамами *H. annosum*

Назва області, лісництва	Проростки, які вирощені із насіння	Штам <i>H. annosum</i>	Кількість дослідних проростків, шт.	Кількість пошкоджених проростків, шт.	% пошкоджених проростків	
на 5-ту добу після інфекції						
Луганська область						
Кондрашевське	чорного	K-1	112	4	3,6	
	кольору	KC-3179	130	8	6,2	
		KB-82179	114	22	19,3	
	бежевого	K-1	122	2	1,6	
		кольору	KC-3179	130	8	6,2
			KB-82179	120	26	21,7

закінчення таблиці 1

на 9-ту добу після інфекції					
Луганська область	чорного	К-1	74	18	24,3
Кондрашевське	кольору	КС-3179	94	28	29,8
		КВ-82179	86	44	51,2
	бежевого	К-1	80	40	50,0
		кольору	КС-3179	92	54
		КВ-82179	76	68	89,4
на 5-ту добу після інфекції					
Донецька область					
Ямпольське	чорного	К-1	74	4	5,4
	кольору	КС-3179	77	7	9,0
		КВ-82179	79	8	10,1
	бежевого	К-1	75	9	12,0
		кольору	КС-3179	83	11
			КВ-82179	87	14
на 9-ту добу після інфекції					
	чорного	К-1	94	22	23,4
	кольору	КС-3179	102	30	29,4
		КВ-82179	90	47	52,2
	бежевого	К-1	100	40	40,0
		кольору	КС-3179	96	52
			КВ-82179	92	80

Це дає можливість припустити, що масове всихання сосни звичайної, яке виявляється у вигляді куртин, у природних умовах зумовлюється сумарною дією факторів - високим ступенем вірулентності штаму (штамів) кореневої губки і наявністю дерев, які виростили із насіння бежевого кольору.

Таким чином, виявлену властивість чорного насіння з урахуванням підвищеного вмісту білка в ньому слід використовувати при відтворенні основних насаджень і у селекційній роботі, яка пов'язана з підвищенням стійкості сосни до кореневої губки.

Розділ 5. КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ HETEROBASIDIUM ANNOSUM

5.1. Культурально-морфологічні особливості штамів однієї популяції *H. annosum*

У своїх працях С. Ф. Негруцький (1973, 1986), Н.І. Фе-

доров (1974), М. І. Бойко (1975), А. П. Василяускас (1981, 1989), В. А. Мокрицький (1991) справедливо вказують на низький рівень вивчення внутрішньовидового складу *N. anpovum*. Слід відмітити, що це питання необхідно вивчати на рівні взаємовідносин патогена і рослини-хазяїна у конкретних екологічних умовах.

Нами встановлено, що найбільше варіює морфологічна ознака - ширина конідій, найменше - ширина конідіеносців і довжина конідій. Індекс форми конідій для штамів популяції *N. anpovum* Кременського лісгоспу Луганської області коливається від 1,16 до 1,38, а для штамів, які паразитують на ялині Мінської області, - складає 1,65.

Таким чином, конідії штамів кореневої губки Кременського лісгоспу Луганської області мають більш округлу форму, ніж конідії штаму популяції, яка паразитує на ялині в Мінській області. Вивчення морфологічних ознак штамів різних популяцій гриба поглиблює наші знання про біологію небезпечного патогену хвойних рослин, які необхідні для розробки науково обґрунтованих засобів боротьби з ним в конкретних екологічних умовах.

5.2. Культурально-морфологічні особливості моноконідиальних культур штамів KB-82166 і KC-3277

Одержані нами дані свідчать про те, що моноконідиальні культури штамів KB-82166 і KC-3277 відрізняються за розмірами морфологічних структур при порівнянні між собою і штамом від якого вони походять. Характерною особливістю для моноконідиальних культур є збільшення довжини конідій, що викликає зменшення їх округлості, яка, можливо, зв'язана з меншою кількістю генів, які взаємодіють між собою.

5.3. Культурально-морфологічні особливості монобазидіальних і гетерокаріотичних культур штама KC-3179

Вивчення морфологічних особливостей монобазидіальних і гетерокаріотичних культур має важливе значення для розуміння популяційної мінливості *N. anpovum* і їх зв'язку з фізіолого-біохімічними показниками патогену, які зумовлюють його вірулентність до рослини-хазяїна.

Виконані дослідження показують мінливість морфологічних ознак монобазидіальних і гетерокаріотичних культур, які були одержані від одного плодового тіла гриба. Це має значення для пристосування *H. annosum* до різних екологічних умов. У спадковості ширини морфологічних структур переважає аддитивний характер. Варіабельність базидіоспор одного плодового тіла дозволяє вважати, що вогнища кореневої губки навіть у межах одного кварталу однорідних за складом і віком насаджень відрізняються щодо інтенсивності всихання дерев, швидкості розповсюдження гриба та інших показників, оскільки їх збудники не є ідентичними за фізіолого-біохімічними показниками (Негруцький, Ветрова, Бойко, 1981).

Розділ 6. ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ШТАМІВ РІЗНИХ ПОПУЛЯЦІЙ *HETEROBASIDIUM ANNOSUM*

6.1. Вплив температури і рН середовища на ріст штамів *H. annosum*

Результати наших досліджень свідчать про те, ростові процеси у більшості штамів розпочинались при температурі 2°C. Штами відрізняються між собою і оптимальною температурою, яка необхідна для їх розвитку. Так, оптимальна температура для росту штама 2-4Ж є 22°C, для штамів І, К-3 - 24°C, для ІБ, К-1 знаходиться у межах 22 - 24°C, для 2-1Ж - 22- 26°C, для штамів СК-1 і СК-2 - 20 -22°C і для штаму К-2 - у межах 20-24°C. На основі даних можна умовно виділити три групи штамів - "теплолюбиві" (І і ІБ), "холодолюбиві" (2-1Ж, СК-1, СК-2 і К-2) і "проміжні" (2-4Ж, К-1 і К-3), приймаючи до уваги нижні температури, при яких розпочинається інтенсивний ріст грибниці. В зв'язку з цим можна допустити, що "холодолюбиві" штами можуть швидше проникати в корені рослини-хазяїна, ніж "теплолюбиві" і таким чином певною мірою уникати антагоністичної дії з боку грибів роду *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* та ін., для початкового росту яких необхідна температура дещо вища, ніж для штамів *H. annosum* (табл.2).

Ростові процеси у штамів триходерми зареєстровані при температурі 15°C, але вони дещо слабкіші, ніж у штамів К-2 і К-3, які зростають у тих же природних умовах, що і штами триходерми.

Таблиця 2

Вплив температури на ріст штамів *Trichoderma viridae*

Штани <i>T. viridae</i>	Температура, °C					
	2	15	22	24	26	30
	Швидкість росту, мм/добу					
Штам 12	-	6,8±0,3	15,7±0,4	19,9±0,3	24,3±0,4	26,6±0,2
Штам А	-	3,3±0,5	15,5±0,6	18,1±0,4	23,7±0,6	26,6±0,4

Таким чином, одержані дані підтверджують наші припущення про те, що штами кореневої губки можуть уникати антагоністичного впливу *Trichoderma viridae* при низьких позитивних температурах ґрунту. Тому при використанні грибів роду *Trichoderma* як антагоністів штамів кореневої губки необхідно враховувати їх мінімальний температурний режим росту, який повинен порівнюватись до температурного мінімуму росту штамів *H. apposum*, що паразитують у конкретних екологічних умовах.

Ріст штамів може відбуватись у широкому діапазоні рН від 2,5 до 9,5. Найбільше накопичення біомаси у штамів спостерігається у межах рН від 2,5 до 4,5 і зменшується при рН середовища від 5,5 до 9,5. Оптимальне значення рН для росту штамів 2-1Ж, 2-4Ж, СК-1, СК-2, К-1 і К-3 складає 4,5 рН, для штаму К-2 - 3,5 і для штаму І - у межах 4,5 - 7,5 рН. Поряд з цим дані свідчать про високу лабільність обмінних процесів, які протікають в тілі штамів *H. apposum*, залежно від реакції субстрату і це значною мірою зумовлює їх агресивність і вірулентність щодо рослини-хазяїна.

6.2. Вплив магнітних полів на фізіолого-біохімічні показники штамів кореневої губки

Нами встановлено, що штам І найбільшу кількість біомаси утворив при омагніченні живильного середовища протягом 5 хв., на 48,8% більше контрольного варіанту. Омагнічування міцелія протягом 5 і 10 хв. також викликало достовірне збільшення біомаси. Штами ІБ і 2-1Ж характеризуються більшою

"стійкістю" до дії магнітного поля. Перший на 30-ти хвилинну експозицію магнітного поля реагував зменшенням, а другий - збільшенням накопичення біомаси. Штами СК-2 і 2-4Ж виявили найбільшу стійкість до цього фактора, тому що не було відмічено зміни в утворенні біомаси між контрольними і дослідними варіантами. При 5-ти хвилинному омагніченні штаму I відмічено достовірне збільшення ширини гіф, а 30 хвилинна експозиція штаму ІВ такого ефекту не викликала. Поряд з цим слід відмітити, що штами 2-1Ж і 2-4Ж однієї популяції гриба по-різному реагували на дію магнітного поля, що вказує на їх фізіолого-біохімічну різноякісність (Негруцький, Бойко, Логашов, 1976), яку необхідно враховувати при розробці засобів боротьби з ними.

6.3. Вплив ПМП на активність ферментів *H. annosum*

Нами встановлено, що постійне магнітне поле високої (2300 е) і низької (60 е) напруги викликає підвищення активності каталази і целюлозолітичних ферментів в міцелії штаму I - більш чутливого до омагнічування.

Таким чином, літературні і наші дані свідчать про те, що результати магнітобіологічних досліджень ферментативної активності залежать як від природи магнітного поля, його напруги, тривалості експозиції, так і від особливостей досліджуваного біологічного об'єкту.

6.4. Характер зміни синтезу водорозчинних білків у шта- мів *H. annosum* під впливом ПМП високої напруги

Виявлені істотні зміни у синтезі водорозчинних білків омагнічених штамів. Так, у штама 2-1Ж зменшилось на 4, а у штама СК-2 на 3 білкових зони, які мають повільну і середню рухливість і утворились de novo з швидкою рухливістю. Це може свідчити про те, що ПМП більшою мірою пригнічує синтез високомолекулярних форм білка, ніж низькомолекулярних. У штама I, більш чутливого до ПМП, спостерігалась незначна зміна електрофоретичної рухливості білків, а у штама ІВ, більш "стійкого", відбувалось зникнення деяких білків з середньою рухливістю і з'ява - з повільною.

6.5. Характер зміни спектра ізоферментів пероксидази у штамів *H. apposum* під впливом ПМП високої напруги

Омагнічення штамів I, 2-1Ж, СК-2 і ІБ постійним магнітним полем високої напруги викликає зміну електрофоретичної рухливості ізоферментів пероксидази порівняно з неомагніченим міцелієм, яка, можливо, зв'язана з переходом генів в інший стан. Ця властивість чітко виражена у штама I - більш чутливого до цього фактора.

Таким чином, одержані дані свідчать про те, що досліджувані штами *H. apposum* виявляють різну реакцію на дію магнітного поля високої напруги, яка виявляється у зміні певних метаболічних ланок, відповідальних за синтез білка. Поряд з цим дані показують біохімічну неоднорідність досліджуваних штамів різних популяцій *H. apposum*.

6.6. Використання білків і ізоферментів у хемотаксономічному вивченні грибів

У мікологічних дослідженнях при слабо виражених морфологічних ознаках останнім часом використовують їх фізіолого-біохімічні показники. Такими тестами є білки і ізоферменти, які досліджуються за допомогою диск-електрофорезу (Судьїна, Мельничук, 1976; Судьїна, 1990; Вассер та ін., 1990; Дудченко та ін., 1990; Дьяков, Шнирцова, 1990; та ін.).

Нами встановлено, що при вивченні 10 видів грибів порядку *Arhyllorhizales* ізоферментний спектр пероксидази у них різний, як за кількістю ізоформ, так і за їх електрофоретичною рухливістю. Між досліджуваними грибами спостерігалась 100% різниця за електрофоретичною рухливістю ізоформ пероксидази. Коефіцієнт подібності за ізоферментами о-дифенолоксидази складає 14-40%. При порівнянні ізоферментів пероксидази по їх рухливості у різних видів роду *Phellinus* Quel. подібності не виявлено. Ступінь подібності по ізоферментам о-дифенолоксидази у цих грибів складає 17-33% (Бойко, Негруцький, 1990).

Таким чином, електрофоретичний аналіз різних ізоферментів може бути надійним біохімічним тестом у систематиці грибів. Поряд з цим електрофоретичний метод дозволяє реєструвати зміни в тілі грибів на молекулярному рівні. В зв'язку з цим він був використаний при вивченні

внутрішньопопуляційної мінливості штамів кореневої губки.

Розділ 7. ВНУТРІШНЬОПОПУЛЯЦІЙНА МІНЛИВІСТЬ КОРЕНЕВОЇ ГУБКИ

Вивчення популяцій кореневої губки, яка паразитує на хвойних породах, у конкретних екологічних умовах має важливе теоретичне і практичне значення. Тим більше, що цей аспект проблеми майже незвичений. Наші дослідження показали, що білок міцелія штамів К-1, К-2, К-3, К-5, КС-3277, КС-3079 і КС-3179 які паразитують на сосні звичайній у Кременському лісгоспі Луганської області, електрофоретично розділився на 10, 15, 21, 21, 18, 17 і 16 зон відповідно. Ці штами відрізняються і числом ізоферментів пероксидази. Дві білкові зони з ВЕР 0,20 і 0,50 є загальними для усіх штамів і їх можна використовувати як біохімічний критерій даного виду гриба. Штами кореневої губки, які паразитують на сосні сусідніх кварталів Сіточного і Веригінського лісництв Кременського лісгоспу, відрізняються ізоферментним складом малатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази, малік-ензиму і супероксиддисмутази.

Таким чином, штами однієї популяції кореневої губки у конкретних екологічних умовах виявляють відповідну мінливість на рівні білків і ізоферментів пероксидази, малатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази, малік-ензиму і супероксиддисмутази, що, в свою чергу, сприяє виникненню нових форм гриба, більш вірулентних до соснових насаджень. Цю особливість штамів *H. annosum* необхідно враховувати при розробці певних засобів боротьби з кореневою губкою, а також при створенні стійких хвойних культур.

7.1. Вплив рН середовища на біосинтез білків і ферментів штамів *H. annosum*

Штамам *H. annosum* необхідно пристосовуватись не тільки до рН клітинного соку коренів сосни, але і до рН ґрунтового розчину чистих і змішаних соснових насаджень, коли гриб існує за рахунок сапротрофного живлення. Суттєві зміни рН водного середовища і ґрунту спостерігаються при постійній дії промислових викидів, які негативно впливають на живі організми (Сіренко, Паршикова, 1993). В зв'язку з цим вивчення впливу рН середовища на біосинтез водорозчинних білків і множинних форм ферментів є необхідною умовою для пізнання

мінливості та пристосування штамів *H. anposum* до умов середовища.

7.2.-7.4. Електрофоретичний спектр водорозчинних білків штамів *H. anposum*, які зростали на середовищі з рН 3,57, 4,62 і 7,25

Нами встановлено, що під впливом рН середовища в міцелії штамів однієї популяції *H. anposum* спостерігаються суттєві зміни в синтезі водорозчинних білків. Кількість білкових зон в усіх штамах, крім штама К-1, які зростали на середовищі з рН 4,62 більше, ніж на середовищах з рН 7,25 і 3,57, а на середовищі з рН 7,25 більше, ніж на живильному середовищі з рН 3,57. Такий розподіл білкових зон свідчить про те, що оптимум для росту і біосинтезу водорозчинних білків у більшості штамів знаходиться у зоні 4,5 рН, а для штама К-1 - значно ширший, від 4,5 до 7,5 рН, що узгоджується з даними, які були одержані раніше (Бойко, 1979). Слід відмітити, що досить мінливою ділянкою електрофореграм є місце, де розміщуються білки з швидкою і частина білків з середньою рухливістю, що знаходяться поблизу межі швидких білків. Це білки, які мають низьку молекулярну масу. Можна припустити, що стресові білки у штамів кореневої губки з'являються у відповідь на зміну рН середовища і є низькомолекулярними. Синтез низькомолекулярних білків відбувається швидше, ніж високомолекулярних і, відповідно, не зволікається відповідь організму на несприятливий фактор у часі, що має важливе значення для пристосування *H. anposum* до зміни умов середовища.

7.5. Ізоферменти каталази, α -амілази, о-дифенолоксидази і пероксидази штамів однієї популяції *H. anposum*

Каталаза

Усі штами, які зростали на живильних середовищах з різним значенням рН, показали подібність за ізоферментами каталази. Однак, при культивуванні штамів на середовищі з рН 4,65 каталазні зони були значно вузчі, приблизно у 2 рази, ніж при вирощуванні їх на середовищах з 3,57 і 7,25 рН. Це збігається з нашим припущенням про те, що рН живильного середовища, яке виходить за межі оптимуму, викликає утворення стресових білків, можливо, виконуючих захисну функцію. Захисна функція цих білків, очевидно, спрямована на зменшення

кількості іонів H^+ і OH^- у середовищі залежно від його рН.

Амілаза

У досліджуваних штамів *H. anpovum* залежно від рН субстрату синтезуються різні α -амілази, які відрізняються молекулярною масою і, відповідно, рухливістю в електричному полі. Більш кисле середовище викликає більшою мірою біосинтез ферментів з повільною і середньою рухливістю, а слабколужне - з середньою та швидкою. На середовищі з оптимальним значенням рН (4,65) в міцелії штамів виявлено одна α -амілаза з повільною, а друга - з швидкою рухливістю.

О-дифенолоксидаза

Нами встановлено, що кисла і слабколужна реакція середовища викликає суттєві зміни в синтезі ізоферментів о-дифенолоксидази штамів *H. anpovum* порівняно з їх ростом на субстраті з оптимальним значенням рН. Кисле і слабколужне середовище викликає в основному утворення до ново ізоферментів з повільною та середньою рухливістю. Утворення нових форм о-дифенолоксидази штамами *H. anpovum* свідчить про лабільність їх обмінних процесів, які пов'язані з пристосуванням до даних екологічних умов зростання.

Пероксидаза

Одержані дані свідчать про те, що кількість ізоферментів пероксидази в міцелії штамів *H. anpovum* виявлено більше наживильних середовищах з рН 4,62 (від 3 до 5 залежно від штаму) і 7,25 (від 3 до 7), ніж на кислому (рН 3,57) субстраті (від 2 до 5). Цю особливість можна пояснити тим, що для існування системи *P. sylvestris* - штамі *H. anpovum* оптимальним є слабкокислое і слабколужне значення субстрата. У цих умовах ізоферменти пероксидази, очевидно, виконують функцію розкладання лігнінового комплексу клітин кореня і, таким чином, беруть участь у патогенезі рослини-хазяїна.

7.6. Мінливість синтезу водорозчинних білків штамів *H. anpovum* залежно від якості живильного середовища

Для пізнання індивідуальної біохімічної мінливості штамів кореневої губки проведено електрофоретичне дослідження їх водорозчинних білків залежно від якості живильного середовища. Такі дослідження можуть показати спорідненість штамів, норму їх реакції на молекулярному рівні і у відповідній мірі відбивати адаптивний характер до навколишнього середовища,

що має значення для пізнання їх механізмів вірулентності.

Аналіз одержаних даних показує, що досліджувані штами *H. anposum* виявляють різну норму реакції на зміну умов живлення, яка проявляється у синтезі неоднакового числа нових молекулярних форм білку. У штама К-1 виявлена незначна зміна у синтезі водорозчинних білків і, таким чином, володіє меншою нормою реакції, що, можливо, зумовлює його слабкий ступінь вірулентності. У інших штамів виявлені суттєві зміни в синтезі білків, що вказує на більш широку норму їх реакції і високий ступінь вірулентності.

7.7. Мінливість ізоферментних спектрів пероксидази штамів *H. anposum* залежно від умов живлення

Одержані дані свідчать про те, що усі ізоферменти пероксидази мають повільну і середню рухливість. Так, штама К-1 має два ізоферменти з ВЕР 0,20 і 0,50, як при зростанні на розбавленному пивному суслі, так і на глюкозо-картопляному середовищі. У штама К-2 виявлено 3 ізоферменти на пивному суслі і 5 - на глюкозо-картопляному субстраті. Штама К-3 на двох середовищах синтезує 4 ізоформи, але вони відрізняються за електрофоретичною рухливістю. У штама К-5 виявлено 5, а на глюкозо-картопляному субстраті - 4 ізоформи пероксидази. На пивному суслі спостерігається поява нової зони з ВЕР 0,34 і зміна алейності у двох форм. Штама КС-3277 на пивному суслі утворює 7, а на глюкозо-картопляному середовищі - 3 ізоферменти. У штама КС-3079 виявлено 5, а у штама КС-3179 - 6 ізоформ фермента проти 2 і 4 відповідно на глюкозо-картопляному субстраті.

Синтез ізоформ пероксидази у штамів *H. anposum*, очевидно, зумовлюється двома локусами, які представлені декількома аелями. Аелі чітко проявляються при зміні якості живильного середовища.

Розділ 8. ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МОНОСПОРОВИХ КУЛЬТУР *H. ANNOSUM*

8.1. Характеристика швидкості росту моноконіціальних культур штамів *H. anposum*

Встановлено, що моноконіціальні культури штамів КС-3277, КС-3079 і КВ-82166 різняться швидкістю росту, яка, можливо, зумовлена кількістю і різноякісністю ядер, що знаходять-

ся в конідіях, із яких одержані чисті культури. Відомо, що гетерокаріотичний міцелій *H. anposum* утворює як гетерокаріотичні, так і гомокаріотичні конідії (Hsiang et al., 1989).

Таким чином, утворення конідій міцелієм *H. anposum* у природних умовах є додатковим джерелом розповсюдження інфекції гриба з різним ступенем вірулентності.

8.2. Ізоферменти пероксидази моноконідиальних культур штама KB-82166

Для підтвердження існування фізіолого-біохімічних відмінностей між моноконідиальними культурами одного штаму кореневої губки проведені електрофоретичні дослідження множинних молекулярних форм пероксидази (табл. 3)

Таблиця 3

Ізоферменти пероксидази штаму KB-82166 і його моноконідиальних культур

N ізофермента	Штам KB-82166	Моноконідиальні культури							
		1	4	5	7	9	11	13	15
1	0,19	0,19	0,19	-	0,19	0,19	-	-	0,19
2	0,21	0,21	0,21	0,21	-	-	0,21	-	0,21
3	0,23	-	-	0,23	0,23	-	0,23	-	-
4	0,26	0,26	0,26	-	-	0,26	-	0,26	-
5	0,38	-	-	-	0,38	-	0,38	-	0,38
6	0,45	-	-	-	0,45	0,45	-	0,45	0,45
7	0,48	-	-	-	0,48	-	-	0,48	-
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Всього	7	3	3	2	5	3	3	3	4

Нами встановлено, що моноконідиальні культури, які були одержані від одного штаму суттєво відрізняються між собою і материнською культурою за кількістю ізоферментів пероксидази, що вказує на їх фізіолого-біохімічну різноманітність.

8.3. Порівняльний ступінь вірулентності моноконідиальних культур *H. anposum* до проростків *Pinus sylvestris*

Нами встановлено, що 8 із 12 дочірніх моноконідиальних ізолятів виявили більшу, одна нижчу ступінь вірулентності,

ніж штам КС-3277. Три культури за цією властивістю не відізнялись від материнської. Ступінь вірулентності дочірніх культур штама КВ-82166 щодо до проростків сосни звичайної коливався від 21,1 до 100%.

Таким чином отримані дані свідчать про те, що моноконідиальні культури виявляють різний ступінь вірулентності до проростків сосни звичайної, що, можливо, пов'язано з кількістю і якістю ядер в конідіях, із яких одержані культури. У природних умовах спори-конідії при попаданні в рани кореня або на поверхню пнів свіжозрублених дерев, проростають, розвиваються і утворюють нові штами *N. anposum*. Це вказує на важливу роль конідій у розповсюдженні гриба у природі.

В.4. Кількісний вміст зелених пігментів в проростках *P. sylvestris*, інфікованих моноконідиальними культурами штама КВ-82166

Нами встановлено перевищення середньої величини відношення хлорофілу а до хлорофілу б у здорових проростків, ніж у хворих. Виявлено два типи впливу хвороби на хід зміни відношення хлорофілів а/б. Перший тип характеризується паралельністю зміни цього відношення у проростків, які були заражені моноспоровими культурами NN 1, 15, 7, 9 і штамом КВ-82166 при порівнянні з контрольними. Другий характеризується непаралельною зміною величини відношення хлорофілів а/б (проростки заражені моноконідиальними культурами NN 5, 11 і 10), про що свідчать вираховані критерії непаралельності рядів регресії ($F=8,03$, $F=13,07$, $F=26,38$ при $F_{ст}=5,6$). Різні типи зміни відношення хлорофілу а до хлорофілу б у хворих проростків пов'язані з їх фізіолого-біохімічною неоднорідністю. В проростках *P. sylvestris* під впливом інфекції моноконідиальних культур відбувається збільшення синтезу хлорофілу б, яке веде до зміни їх забарвлення.

В.5. Вміст жовтих пігментів у проростках *P. sylvestris*, інфікованих моноконідиальними культурами штама КВ-82166

Одержані дані показують, що при проникненні моноконідиальних культур у тіло проростків відбуваються суттєві зміни в метаболізмі жовтих пігментів. На ранньому етапі зараження (на 5-ту добу) проростків у більшості випадків спостерігається збільшення вмісту каротину і зменшення - лю-

теїну. Але прямої або оберненої залежності між вмістом жовтих пігментів і ступенем вірулентності моноконідіальних культур до проростків *P. sylvestris* не знайдено. Це, можливо, пов'язано з неоднорідністю насіння, із яких були одержані проростки і фізіолого-біохімічною різноманітністю моноконідіальних культур штама KB-82166.

8.6. Вміст вільних амінокислот у проростках *P. sylvestris*,

інфікованих моноконідіальними культурами штама KB-82166

Нами встановлено, що у хворих рослин різко знижується вміст ізолейцину. У здорових проростках цієї амінокислоти знаходиться 750,2 нМ/г, а у хворих - від 67,19 до 313,2 нМ. Встановлено зменшення кількості тирозину в інфікованих проростках. Простежується зв'язок між вмістом гліцину у хворих проростках і ступенем вірулентності моноконідіальних культур. Так, в проростках, які інфіковані більш вірулентними ізолятами, вміст гліцину значно зростає, ніж в здорових. В проростках, пошкоджених менш вірулентними культурами вміст гліцину залишається, приблизно, на рівні контрольного варіанту. Це, можливо, пов'язано з захисною реакцією проростків на інфекцію, оскільки гліцин є первинною сполукою, яка бере участь у біосинтезі молекул хлорофілу. Слід відмітити, що сумарний вміст вільних амінокислот у проростках, інфікованих більш вірулентними ізолятами, перевищує його у здорових і пошкоджених менш вірулентними культурами.

8.7. Швидкість росту і накопичення біомаси гомо- і гетерокаріотичними культурами штамів *H. ananassum*

Дослідження монобазидіальних культур, які одержані із одного плодового тіла, є важливою умовою для пізнання штамового різноманіття *H. ananassum* на рівні популяції.

Нами встановлено, що швидкість росту моноспорних культур штама KC-3179 коливається від 5,11 до 8,80 мм за добу. Середня швидкість лінійного росту гетерокаріотичних ізолятів варіює від 7,20 до 9,73 мм за добу. Із 24 досліджених гетерокаріонів більшість за швидкістю росту не відрізняється від материнської культури. Виключення становлять гетерокаріони NN 5-8, 6-11, 6-8, 3-14, 1-5 і 6-12, які мають достовірно більшу швидкість росту. Це дає основу для припущення, що більша швидкість є домінантною ознакою у кореневої губки, ос-

кільки у 19 гетерокаріотичних ізолятів успадкувалась швидкість росту гомокаріонів, які характеризувались більшою швидкістю росту.

8.8. Ізоферменти пероксидази гомо- і гетерокаріотичних культур штама КС-3179

Електрофоретичні дослідження ізоферментів пероксидази показали, що у монобазидіальних культурах штама КС-3179 виявлено від 3 до 7 ізоформ. Ізофермент з ВЕР 0,50 є загальним для усіх ізолятів, за винятком культури N 9. У гетерокаріонів суттєво змінюється відносна електрофоретична рухливість пероксидази. Слід відмітити, що ізоформи з ВЕР 0,21-0,22 і 0,50 є загальними для гетерокаріотичних культур і штаму, а ізофермент з ВЕР 0,50 - для гомо, гетерокаріотичних і штаму. Це вказує на те, що цей ізоензим знаходиться під строгим генетичним контролем. Виявлена властивість може бути використана як біохімічний критерій у таксономії *N. annosum*.

Фізіолого-біохімічна неоднорідність базидіоспор одного плодового тіла свідчить про те, що осередок *N. annosum* навіть в межах одного кварталу однорідних щодо складу і віку насаджень може відрізнитись за інтенсивністю усихання дерев, швидкістю розповсюдження патогена та іншими ознаками, оскільки їх збудники не є ідентичними за біохімічними ознаками (Негруцький, Ветрова, Бойко, 1981).

8.9. Електрофоретичні дослідження водорозчинних білків міцелія монобазидіальних культур штамів різних популяцій

Електрофоретичні дослідження монобазидіальних культур штамів, які паразитували на ялині в Мінській (штам М-1.81), ялиці в Львівській (штам Т-1.82) і сосні в Донецькій (штам СК-1.80 і СК-1.81) областях, показали їх неоднорідність за спектром водорозчинних білків, що пов'язано з різним ступенем вірулентності до проростків сосни звичайної (Ветрова, 1983).

(табл. 2).

8.10. Ізоферменти пероксидази монобазидіальних культур штамів різних популяцій *N. annosum*

Нами встановлено, що культури, які були одержані з окремих базидіоспор плодкових тіл штамів М-1.81, Т-1.82, СК-1.80 і СК-1.81 відрізняються між собою за складом ізоферментів

пероксидази, що необхідно враховувати при розробці комплексних біологічних засобів боротьби з даним патогеном у конкретних екологічних умовах.

8.11. Водорозчинні білки культур з базидіоспор різних років зібраних із одного плодового тіла

Матеріали свідчать про те, що культури одержані з базидіоспор одного плодового тіла у різні роки його життя характеризуються значною лабільністю біосинтезу водорозчинних білків, що, можливо, пов'язано з зміною алельності генів, які відповідають за синтез відповідних білків у конкретних екологічних умовах. Висока лабільність обмінних процесів у штамів *N. anthonis* забезпечує їм виживання у відповідних умовах середовища. Як відмічає Д. М. Гродзинський (1983), при фізіологічній адаптації немаловажне значення набуває здібність макромолекул виконувати свої функції у широкому інтервалі інтенсивностей різних факторів така здібність забезпечується гетерогенністю білкових молекул і молекулярним відбором їх форм, які не втрачають активності у "крайніх умовах", до яких адаптується організм.

Таблиця 4

Ізоферменти пероксидази монобазидіальних культур плодового тіла штама СК-1

Номер ізоферменту	Монобазидіальні культури 1980 року			Монобазидіальні культури 1981 року			
	N 11	N 14	N 10	N 12	N 13	N 6	N 9
1	0,21	-	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
3	0,29	-	-	0,29	-	-	-
4	0,41	0,41	-	0,41	-	-	-
5	-	-	0,45	-	-	-	-
6	0,47	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	0,48	-	-	-
8	-	-	-	-	-	0,50	-
9	-	0,60	-	-	-	-	-
Всього	5	3	3	5	2	3	3

8.12. Ізоферменти пероксидази монобазидіальних культур, одержаних із плодового тіла у різні роки його життя

Нами встановлено (табл.4), що ізоляти одержані з базидіоспор плодового тіла у різні роки його життя, виявляють біохімічну різноякісність, яка виражається в синтезі різних множинних молекулярних форм ізоферментів пероксидази. Ця властивість, очевидно, відображає систему надійності (Гродзинський, 1983) штамів *H. annosum*, яка пов'язана з рівнем їх виживання і патогенності до рослини-хазяїна у конкретних умовах існування.

РОЗДІЛ 9. ТОКСИЧНІ РЕЧОВИНИ *HETEROBASIDION ANNOSUM* І ЇХ РОЛЬ У ПАТОГЕНЕЗІ *PINUS SULVESTRIS*

9.1. Вплив культуральних фільтратів штамів однієї популяції *H. annosum* на проростання насіння сосни звичайної

Визначення природи екзометаболітів кореневої губки, які беруть участь у патогенезі рослини-хазяїна має теоретичне і практичне значення. Слід відмітити, що це питання досить слабо вивчене. Б. А. Рубін і Е. В. Арциховська (1968) припускають, що токсична дія патогенних організмів зумовлена не однією речовиною, а одночасною дією декількох токсичних компонентів.

Нами встановлено, що штами К-1, К-2, К-3, К-5, КС-3079, КС-3179, КС-3277, КВ-82166, КВ-82167, КВ-82179 (Луганська обл.), МН і МНЦ (Мінська обл.) у процесі життєдіяльності виділяють екзометаболіти, які виявляють інгібуючу дію на ростові процеси коренців насіння сосни звичайної. Причому, ця властивість виявляється у досліджуваних штамів неодноразово. Це стосується і 10 штамів популяції *H. annosum* Луганської, так і двох штамів популяції Мінської областей. Ті штами, які на ранньому етапі патогенезу виділяють метаболіти з токсичними властивостями, є більш вірулентними щодо проростків *P. sylvestris* (Бойко, Негруцький, Ляпичева, 1988). Визначення природи метаболітів, які зумовлюють токсичність штамів кореневої губки щодо рослини-хазяїна, дасть можливість повніше з'ясувати механізм вірулентності патогена.

9.2. Вміст цукрів у культуральних фільтратах штамів *H. annosum*

Живильне середовище Петрі, де джерелом вуглецю був

фільтрувальний папір, служило моделлю для з'ясування утворення різних продуктів при гідролізі целюлози ферментами штамів *H. anpovum* та їх ролі у патогенезі рослини-хазяїна.

Нами встановлено, що протягом 20 діб росту штамів відбувається накопичення цукрів, а на 30-ту добу - їх зменшення, що свідчить про їх використання грибом. Кількість цукрів у культуральних фільтратах штамів двох- і трьохмісячного віку різко збільшується порівнянно з 30-ти добовим віком.

Таким чином, одержані дані показують, що процес гідролізу целюлози штамами однієї популяції *H. anpovum* відбувається з різною швидкістю, про що свідчить кількість цукрів у культуральних фільтратах. Не виключено, що метаболіти вуглеводної природи виконують відповідну роль у патогенезі сосни звичайної.

9.3. Якісний і кількісний аналіз цукрів культуральних фільтратів штамів однієї популяції *H. anpovum*

Нами встановлено, що процес гідролізу фільтрувального паперу (целюлози) штамами *H. anpovum* йде шляхом утворення різної кількості арабінози, ксилози, глюкози, целобіози і, очевидно, трисахариду (неідентифікована речовина). Можна припустити, що глюкоза, а також арабіноза і ксилоза використовуються для живлення штамів гриба. Целобіоза і неідентифікований цукор, можливо, піддаються поступовому ферментативному гідролізу до моноцукрів, які використовуються грибом. Але не виключено і те, що целобіоза, ксилоза, арабіноза і X-речовина, утворившись у значній кількості в тканинах хворої рослини, виявляють токсичний вплив на її метаболізм. Елюати із хроматограми целобіози і ксилози+арабінози викликали достовірний інгібуючий вплив на ріст коренців насіння сосни. Поряд з цим одержані результати показують, що штами однієї популяції *H. anpovum* відрізняються між собою ефективністю використання глюкози і ксилози. Це може свідчити про те, що процес гідролізу целюлози і лігніну ферментними системами штамів може йти більшою мірою в одних - шляхом утворення глюкози, а в інших - ксилози.

9.4. Вплив цукрів на ріст коренів і фізіологічний стан проростків *P. sylvestris*

Насіння сосни звичайної змочували розчинами глюкози,

ксилози, арабінози і сахарози в концентрації 5, 10, 20 і 80 мг на 100 мл середовища Петрі. Низькі концентрації цукрів брали, приблизно, в еквівалентній кількості до вуглеводів, які знайдені в культуральних фільтратах досліджуваних штамів кореневої губки.

Нами встановлено, що глюкоза у концентраціях 5, 10 мг і ксилоза 5 мг на 100 мл середовища, інгібування росту коренців не викликають. Концентрації 20 і 80 мг глюкози, 10, 20 і 80 мг ксилози викликали пригнічення росту коренців. Арабіноза і сахароза в усіх досліджуваних концентраціях пригнічували осові процеси коренців насіння сосни. Досліджувані вуглеводи в концентрації 100 і 80 мг на 100 мл уже через 3-5 годин викликали зав'ядання проростків. Зменшенні тургорного тиску у проростків на середовищі з 20 мг цукрів спостерігалось через 7-8 годин і на середовищі з 10 мг - через 9-10 годин. При витримуванні проростків сосни на контрольному середовищі і середовищі, яке містило 5 мг цукрів зав'ядання не відмічено.

Таким чином, одержані дані показують, що досліджувані цукри в концентрації від 0,1 до 1 мг/мл середовища викликають прив'ядання проростків сосни звичайної. Швидкість падіння тургорного тиску у проростків залежить від концентрації цукрів і їх природи. Можливо, підв'ядання проростків пов'язане з порушенням роботи H^+ - помпи і білків переносчиків вуглеводів у тих місцях рослини, де спотерігається зміна тургорного тиску. У даному випадку цукри накопившись в одному місці проростку, викликають відняття води у сусідніх клітин і у них зменшується тиск, у результаті відбувається їх підв'ядання.

9.5. Вміст аміаку в культуральних фільтратах штамів *H. annosum*

Нами встановлено, що в культуральних фільтратах штамів однієї популяції *H. annosum* 10-ти, 20-ти і 30-ти добового віку аміаку не виявлено. Аміак знайдено і кількісно визначено в культуральних фільтратах штамів 3-х і 4-х місячного віку. Різний вміст аміаку в середовищі штамів свідчить про різну швидкість протікання в їх тілі обмінних процесів, що і забезпечує їх фізіологічну і біохімічну різноякісність.

Одержані дані показують, що з віком штамів відбувається

утворення аміаку, який виконує відповідну роль у патогенезі рослини-хазяїна.

9.6. Вміст білку в культуральних фільтратах штамів *N. annovum*

Одержані дані свідчать про те, що вміст білку в культуральних рідинах штамів *N. annovum* (Луганська обл.) у процесі їх розвитку збільшується. Це зв'язано з виділенням ферментів, які гідролізують целюлозу, лігнін та інші сполуки до відповідних продуктів, котрі використовуються для живлення патогена. Не виключено і те, що деякі білки беруть участь у розвитку хвороби рослини-хазяїна.

9.7. Ізоферменти пероксидази культуральних фільтратів штамів *N. annovum*

Нами встановлено, що досліджувані штами, які зростали на мінеральному середовищі Петрі, де джерелом вуглецю був фільтрувальний папір, виділяють речовини білкової природи, які виявляють пероксидазну активність. Штами однієї популяції патогена відрізняються числом ізоформ пероксидази, які виділяються в середовище їх зростання. Одержані результати дають основу для припущення, що ізоферменти пероксидази виконують роль у ксилілізі деревини і сприяють розвитку хвороби. На користь цього припущення свідчать результати отримані І. А. Решетніковою (1994), що пероксидаза із культурального фільтрату *Phellinus igniarius* гідролізувала лігнінову компоненту деревини берези на 80% у відсутності пероксиду водню в середовищі.

9.8. Вміст токсичної речовини, близької до природи 5-н-бутилпіколінової кислоти, в культуральних фільтратах штамів *N. annovum*

Нами встановлено, що в культуральних фільтратах виявлено 4 сполуки з Rf 0,18, 0,40, 0,55 і 0,90. При розгляданні хроматограми в УФ-світлі сполуки з Rf 0,18 і 0,40 мали світлоблакитне забарвлення, речовина з Rf 0,55 - темнофіолетове і сполука з Rf 0,90 - слабо червонокоричневе. Фузарієва кис-

лота в УФ-світлі має червонокоричневе забарвлення і Rf 0,870,88. Біоавтографічне дослідження показали, що сполука з Rf 0,90 викликала повне подавлення росту *Vas. subtilis*. Культуральні фільтрати штамів викликали підв'янення проростків сосни звичайної і сосни кримської. Більш чутливими до метаболітів були проростки сосни звичайної, ніж сосни кримської. Причому у одних випадках спостерігалось підв'янення стеблів у місці їх переходу до сім'ядолних листочків, в інших - первинним було підв'янення кінців хвоїнок, а вторинним - стебла.

Розділ 10. ВИЗНАЧЕННЯ ХІМІЧНОЇ ПРИРОДИ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ДЕРЕВОРУЙНІВНИХ ГРИБІВ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ІХ АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДО КОРЕНЕВОЇ ГУБКИ

10.1. Характер взаємодії деяких дереворуйнівних грибів з штамами кореневої губки

При сумісному зростанні *Fomes fomentarius*, *Polyporus vulporeus* і штамів *N. anpovum* спостерігалися однобічний, взаємний вплив досліджуваних грибів, а також нейтральні взаємовідносини між ними. Взаємовідносини між грибами відбуваються задовго до зустрічі їх колоній. Відповідно, антагоністичні взаємовідносини відбуваються через метаболіти, які виділяються грибами в субстрат. У міру накопичення їх в субстраті збільшується і антагонізм між культурами грибів. Поряд з цим чітко простежується фізіологічна різноякісність досліджуваних штамів кореневої губки щодо інших дереворуйнівних грибів (Негруцький, Бойко, Луганський, 1989), на яку недостатньо уваги звертають дослідники. Виявлену властивість необхідно використовувати при розробці біологічних засобів боротьби з цим патогеном з урахуванням його популяційного складу стосовно конкретних умов зростання рослини-хазяїна. Крім цього, слід проводити не тільки відбір активних штамів грибів-антагоністів до штамів конкретної популяції *N. anpovum*, але і вивчати природу метаболітів, які виділяються цими грибами з метою одержання на їх основі препаратів проти кореневої губки.

10.2. Гриб *Fomitopsis pinicola* - антагоніст кореневої губки і продуцент щавлевої і лимонної кислот

Нами встановлено, що при сумісному зростанні штамів *N.*

анновум і *Fomitopsis pinicola* (штам К-82) на агаризованому пивному суслі відбувається сильне пригнічення росту штамів кореневої губки і зменшення в'язкості середовища. Вирощування *F. pinicola* на рідкому глюкозо-пептонному середовищі показало сильне його підкислення (1,96 - 2,00 рН). При цьому значенні рН середовища ріст штамів кореневої губки не спостерігався. Одержані дані (Бойко, Негруцький, Чесалов та ін., 1990) показують, що штам К-82 *Fomitopsis pinicola* виділяє в субстрат шавлеву і лимонну кислоти і це визначає його антагоністичну активність щодо штамів *H. annosum*. Відповідно, гриб *F. pinicola* може використовуватись для приготування біопрепарату для боротьби з кореневою губкою. Оскільки *Fomitopsis pinicola* може зрідка викликати захворювання дерев (Черемісінов, Негруцький, Лешковцева, 1970; Трибун, 1991), то у цьому випадку слід використовувати культуральну рідину для оброблення пнів свіжозрубаних дерев, щоб запобігти їх зараженню кореневою губкою або багаторазово обробляти цим фільтратом пні уже інфіковані *H. annosum* з метою подавлення її росту. Наряду з цим гриб *F. pinicola* має значення як об'єкт біотехнології для одержання шавлевої і лимонної кислот, які можуть використовуватись в інших галузях господарства.

10.3. Характер взаємовідносин *Coltricia perrenis*, *Hirschioporus laricinus* зі штамами кореневої губки

Нами встановлено інший характер взаємовідносин *C. perrenis*, *H. laricinus* зі штамами *H. annosum*, ніж з *F. pinicola*. Колонії *C. perrenis*, *H. laricinus* не зазнавали помітного інгібуючого впливу з боку штамів кореневої губки. В свою чергу колонії грибниці *C. perrenis* не наростали на міцелій штамів *H. annosum*, а утворювалась стерильна зона, шириною 1 - 2 мм, між ними і ріст грибів зупинявся. Через це *C. perrenis* як антагоніст *H. annosum* не має значення.

Поряд з цим газон міцелію слабовірулентних штамів *H. annosum* поступово заростав грибницею *H. laricinus*. Між колоніями сильновірулентних штамів КС-3079, КС-3179, КВ-82166, КВ-82179 і міцелієм *H. laricinus* утворювався валик із міцелія і ріст грибів зупинявся. Одержані дані свідчать про те, що *H. laricinus* може використовуватись для захисту пнів сосни у тих випадках, коли популяція кореневої губки у даному ареалі соснових насаджень складається із слабовірулентних

Нами встановлено, що температура 30-32°C і рН середовища у межах від 4,58 до 5,73 є оптимальними для біосинтезу молокозгортаючого ферменту *C. perrenis*. *C. perrenis* добре розвивається на ксилозі, глюкозі, арабінозі, лактозі і маніті. Молокозгортаюча активність (МЗА) гриба залежить від джерела вуглецевого живлення і способу його культивування. Найбільша (1,5-2 рази) МЗА культурального фільтрату спостерігалась при глибинному культивуванні на ксилозі і глюкозі, ніж при поверхневому. Для одержання молокозгортаючого ферменту гриб необхідно вирощувати на середовищах з ксилозою і глюкозою. Оптимальний вік гриба для одержання ферменту - 8 - 10 діб у залежності від джерела вуглецю (Бойко, Негруцький, Миросниченко і Бондаренко, 1986).

11.2. Вплив фізико-хімічних факторів на біосинтез протеїназ молокозгортаючої дії і ріст *Hirschioporus laricinus*

Вивчення впливу фізико-хімічних факторів на ріст грибів викликає не тільки загальнобіологічний інтерес, але і допомагає у вирішенні проблем, які пов'язані з використанням чистих культур у біотехнології (Соломко, 1992; Елланська і ін., 1992).

11.2.1. Вплив рН середовища на МЗА, споживання глюкози і накопичення біомаси *H. laricinus*

Нами встановлено, що компоненти живильного середовища - глюкоза, пептон та інші залежно від рН середовища використовуються на різні потреби продуцента. При умові кислого середовища глюкоза більшою мірою використовується на утворення фермента, ніж біомаси, а на середовищі з рН, близьким до нейтрального, ці процеси мають обернену залежність. Більше накопичення біомаси грибом - нижче активність молокозгортаючого ферменту. Для одержання молокозгортаючого фермента продуцент *H. laricinus* необхідно культивувати на середовищі з рН 4,40.

11.2.2. Вплив температури на МЗА і накопичення біомаси *H. laricinus*

Одержані дані свідчать про те, що для росту *H. laricinus* і виділення ним позаклітинного молокозгортаючого ферменту

температура у межах 28-32°C є оптимальною.

11.2.3. Вплив різних джерел вуглецевого живлення на молокозгортаючу активність *N. laricinus*

Нами встановлено, що підбір вуглеводів, як джерел вуглецю, необхідно проводити з урахуванням легко індукованих ними ферментних систем *N. laricinus*, які розкладають даний субстрат. Такими субстратами-вуглеводами, у першу чергу, є ксиліза, фруктоза і глюкоза, а потім крохмаль і мальтоза. Сахароза і арабіноза погано використовуються продуцентом, про це свідчить відсутність синтезу молокозгортаючого ферменту.

11.2.4. Вплив різних джерел азотного живлення на МЗА і накопичення біомаси *N. laricinus*

Нами встановлено, що на живильних середовищах з хлористим амонієм, аспарагіноювою кислотою виявлена низька активність ферменту (від 1038,5 до 1183,9 ум. од.) значно вища - на середовищі з азотнокислим амонієм (2070,2 ум. од.) і найвища - на середовищі з пептоном (8936,2 ум. од.).

Таким чином, кращим джерелом азотного живлення для *N. laricinus* є пептон.

11.2.5. Вплив способу культивування на молокозгортаючу активність, вміст білку і утворення біомаси *N. laricinus*

Нами встановлено, що при культивуванні *N. laricinus* протягом 20 діб активність ферменту послідовно зростала при усіх способах його вирощування, але найбільша на 10-ту, 15-ту і 20-ту добу була в зануреній культурі, ніж у гриба, який розвивався при періодичному перемішуванні середовища і поверхневою культивуванні. Глибинне культивування сприяє швидшому накопиченню біомаси *N. laricinus*.

В умовах дефіциту молока відповідний практичний інтерес має визначення утворення ферменту не за його активністю, а за кількістю білку в культуральному фільтраті. Це припущення було проврено в експерименті. Одержані дані свідчать про те, що виділення в середовище речовин білкової природи, в тому числі молокозгортаючого ферменту, продуцентом йде інтенсивніше при глибинному культивуванні. Одержані результати показали, що реєстрацію активності молокозгортаючого фермен-

ту в культуральному фільтраті можна проводити за кількістю білка в середовищі, який з'являється у процесі росту продуцента.

11.2.6. Оптимізація живильного середовища для культивування *N. laricinus* - продуцента протеїназ молокозгортаючої дії

Оптимізацію вихідного глюкозо-пептонного середовища проводили за чотирьма факторами глюкозою - x_1 , пептоном - x_2 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - x_3 , $CaCl_2$ - x_4 за планом повного факторного експерименту ПФЕ-2⁴ (Максімов, Піменова, Гречушкіна, 1976).

Нами встановлено, оптимальним середовищем для культивування *N. laricinus* з метою одержання фермента молокозгортаючої дії є середовище такого складу, г/л глюкоза - 20, пептон - 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,1, $CaCl_2$ - 0,13, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,001, дистильована вода - до 1 л. При вирощуванні продуцента на модифікованому середовищі вихід фермента збільшився у 3 рази і дорівнював 226 мг проти 75 мг на вихідному середовищі у розрахунку на 1 л культуральної рідини. Це середовище використовується для вирощування *N. laricinus* у біореакторі "Біор-0,1" з метою одержання фермента у кристалічному вигляді.

11.2.7. Спосіб одержання молокозгортаючого фермента із культурального фільтрату *N. laricinus*

Спосіб одержання молокозгортаючого ферментного препарату (А.с. № 1395672, 1988) передбачає поверхнєве культивування продуцента *N. laricinus* ВКЛМ F-263 на глюкозо-пептонному середовищі до досягнення максимальної активності, відділення міцелія фільтруванням, осадження фермента сірчанокислим амонієм і очищення, який відрізняється тим, що з метою підвищення активності продукту і спрощення процесу фільтрат охолоджують до 4-5°C, осадження проводять при 55-80%-ному насиченні, а очищення спочатку діалізом проти охолодженої дистильованої води при 4-5°C, потім методом електрофореза у паралельних пластинках поліакриламідного геля.

11.2.8. Електрофоретичні дослідження молокозгортаючого ферментного препарату, білків культурального фільтрату і міцелія *N. laricinus*

Перша фракція фермента одержана при 55%-ному насиченні

культурального фільтрату сірчано-кислим амонієм. МЗА виділеного білка склала 2 хв. і електрофоретично розділився на 4 фракції з ВЕР 0,304, 0,343, 0,392 і 0,559. Друга фракція фермента одержана при 65%-ному насиченні. Ця фракція виявила високу МЗА (10 сек.) і електрофоретично розділилась на 9 компонентів з ВЕР 0,103, 0,128, 0,231, 0,333, 0,423, 0,474, 0,538, 0,744 і 0,846. У культуральному фільтраті виявлено 11 білкових зон, а МЗА його становила 4 хв. Білок міцелія розділився на 14 зон, а МЗА склала 8 хв.

Одержані дані свідчать про те, що у культуральному фільтраті і міцелії продуцента, крім білків з молокозгортаючою функцією, містяться баластні білки, які необхідно вилучати відповідними методами очистки.

11.2.9. Амінокислотний склад ферментного препарату-ларицину

Протеази відповідних штамів *Mucor*, *Endothia* і *Aspergillus* успішно використовуються за рубежом для виготовлення сирів і у нинішній час задовольняють біля 10% потреби сичуга (Пріст, 1987). Проведені дослідження показали, що у ферментному препараті-ларицині, незалежно від складу середовища, найбільшою мірою містяться аспарагінова (20,36 і 14,28 мг%) і глутамінова (9,93 і 9,73 мг%) кислоти. У стандартному м'ясному сичужному препараті вміст цих амінокислот становив 16,30 і 14,85 мг% відповідно.

Таким чином ферментний препарат, який виділяється у середовище *H. laricinus*, належить до кислих протеаз і може знайти примінення у сировиробництві.

11.2.10. Культивування *H. laricinus* у біореакторі "Біор-0,1" з метою одержання ферментного препарату у кристалоформному стані

При культивуванні продуцента у біореакторі на модифікованому середовищі одержано у 3 рази більший вихід молокозгортаючого ферменту, ніж на вихідному - глюкозо-пептонному. Ферментний препарат пройшов медико-біологічні дослідження у лабораторії гігієнічної оцінки харчових і кормових добавок у Науково-дослідному інституті гігієни харчування (г.Київ) і одержав висновок про можливість його використання у сироварінні як заміник сичужного ферменту. Розроблені технічні умови і технічна інструкція на молокозгортаючий ферментний препарат-ларицині.

ВИСНОВКИ

1. У формуванні системи *Pinus sylvestris* L.- *Heterobasidion annosum* приймають участь ферментні системи - целюлаза і пероксидаза, які розкладають целюлозу і лігнін клітин кореня рослини-хазяїна. Запускаючим механізмом патогенезу сосни звичайної, очевидно, є речовина, яка близька за природою до 5-н-бутілпіколінової кислоти, що виділяється кореневою губкою і порушує напівпроникливість мембран клітин рослини-хазяїна, а сполуки вуглеводної, білкової та іншої природи здійснюють підтримування цього процесу.

2. Проростки *P. sylvestris* і *P. pallasiana* виявляють різну реакцію на інфекцію штамів однієї популяції *H. annosum*. Перші - більш чутливі до зараження, ніж другі. Це можна пояснити тим, що штамі виділені із плодових тіл гриба *H. annosum*, який паразитував на сосні звичайній в Кременському лісгоспі Луганської області звідки одержане насіння для дослідження і їх метаболізм більш ретельно "підігнаний" до обміну речовин *P. sylvestris*, ніж *P. pallasiana*. Це свідчить про фізіологічну спеціалізацію кореневої губки до хвойних порід як усередині виду, так і між видами.

3. На початковому етапі зараження проростків сосни звичайної спостерігається підвищення активності іонозв'язаної фракції пероксидази коренів під впливом сильно вірулентних штамів кореневої губки. В проростках сосни кримської відбувається підвищення активності цитоплазматичної фракції пероксидази і зниження іонозв'язаної в коренях у процесі розвитку хвороби.

4. У хворих проростках сосни звичайної спостерігається значна зміна у біосинтезі ізоферментів цитоплазматичної пероксидази, ніж іонозв'язаної, яка виражається зникненням або появою нових форм фермента порівняно зі здоровими. Порушення біосинтезу цитоплазматичної пероксидази у проростках сосни кримської незначне. Інфекція викликає зміну аельності генів, які відповідають за синтез цих форм пероксидази.

5. Ізоферментний спектр пероксидази здорових проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana* свідчить про фізіологічну їх різноякісність. Корені проростків сосни звичайної містять два ізоферменти, а сосни кримської - шість форм цитоплазматичної пероксидази. В стеблах проростків *P. sylvestris* виявлено 4, а в стеблах *P. pallasiana* - 3 ізоформи пе-

роксидази. Не виключено, що ці відмінності є однією із причин, які зумовлюють підвишену стійкість сосни кримської до штамів кореневої губки.

6. Більш вірулентні штами на ранньому етапі зараження проростків сосни звичайної викликають підвищення активності о-дифенолоксидази в стеблах. Активність о-дифенолоксидази у інфікованих стеблах можна використовувати як тест для виявлення більш вірулентних штамів конкретної популяції кореневої губки. Під впливом інфекції в проростках сосни різних видів збільшується число ізоформ о-дифенолоксидази.

7. При розповсюдженні сосни звичайної у південно-східну частину України збільшується кількість популяцій, які продукують чорне і бежеве насіння з більшою масою, ніж у північній і процентний вміст особин, які утворюють насіння з чорним забарвленням. Крашу схожість виявляє те насіння, яке містить більше білку. Проростки сосни одержані із чорного насіння виявляють підвишену стійкість до штамів кореневої губки, ніж проростки із бежевого насіння. Цю властивість чорного насіння з врахуванням підвищеного вмісту білку слід використовувати для відтворення соснових насаджень і у селекційній роботі, яка пов'язана з стійкістю сосни до кореневої губки.

8. Моноконідіальні культури конкретного штаму відрізняються розмірами морфологічних структур при порівнянні між собою і штамом, від якого вони походять. Монобазидіальні і гетерокаріотичні культури одного плодового тіла *H. annosum* мають відмінність по ширині гіф, конідіеносців і конідій.

9. Штами кореневої губки по-різному реагують на дію факторів навколишнього середовища. Виявлені три групи штамів з урахуванням нижніх температур, при яких розпочинається ріст грибниці. "Холодолюбиві" штами можуть швидше проникати у корені рослини-хазяїна, ніж "теплолюбиві" і таким чином уникати антагоністичної дії з боку ґрунтових грибів, для початкового росту яких необхідна більш вища температура, ніж для штамів *H. annosum*. Тому при використанні грибів для боротьби з кореневою губкою необхідно враховувати їх мінімальний температурний режим росту, який повинен прирівнюватись до температурного мінімуму росту штамів конкретної популяції кореневої губки.

10. Штами однієї популяції кореневої губки виявляють

мінливість на рівні білків і ізоферментів пероксидази, каталази, α -амілази, о-дифенолоксидази, малатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази, малік-ензиму і супероксиддисмутази, що сприяє з'явленню нових форм гриба. Цю властивість необхідно враховувати при виборі мір боротьби з ними, а також при створенні стійких хвойних культур.

11. У проростках сосни звичайної, інфікованих моноконідальними культурами штамів Н. appovium спостерігається зменшення відношення хлорофілу а до хлорофілу б, збільшення вмісту каротину і зменшення - лютеїну у порівнянні зі здоровими. Більш вірулентні моноконідальні культури викликають збільшення синтезу гліцину у порівнянні зі здоровими проростками і проростками, які пошкоджені менш вірулентними штамами. Це, очевидно, пов'язано з захисною реакцією проростків до інфекції, так як гліцин є первинною сполукою у біосинтезі молекул хлорофілу.

12. В культуральних фільтратах штамів однієї популяції кореневої губки містяться целобіоза, сахароза, ксилоза, арабіноза, аміак, білки, ізоферменти пероксидази і сполука, яка близька за природою до 5-н-бутілпіколінової кислоти. Очевидно, токсичні речовини 5-н-бутілпіколінова кислота і аміак порушують напівпроникливість мембран клітин кореня рослини-хазяїна вуглеводи взаємодіють з іншими речовинами приймають участь у закупорці судин, а пероксидаза у деструкції клітинних стінок. В залежності від штаму гриба і фізіологічного стану рослини-хазяїна хвороба може протікати з різною швидкістю, що часто спостерігається у природних умовах.

13. Антагоністичні властивості дереворуйнівних грибів до штамів кореневої губки проявляються через екзометаболіти, які виділяються грибами в середовище. Такими метаболітами є органічні кислоти, білки, ферменти та інші речовини. Поряд з цим чітко простежується фізіологічна різноякісність штамів кореневої губки щодо грибів-антагоністів, на котру недостатньо приділяється уваги. Виявлену властивість необхідно використовувати при розробці біологічних засобів боротьби з цим патогеном у конкретних умовах зростання рослини-хазяїна. Крім цього, необхідно проводити відбір активних штамів грибів-антагоністів, вивчати природу їх екзометаболітів з метою одержання препаратів проти кореневої губки і для застосування в інших галузях господарства.

14. Гриб *Fomitopsis pinicola* (штам К-82) виділяє шавлеву і лимонну кислоти і це визначає його антагоністичну активність щодо штамів *H. annosum*. Крім цього цей продуцент може використовуватись у біотехнології для одержання шавлевої і лимонної кислот і використання в інших галузях господарства.

15. Гриб *Hirshioropus laricinus* є не тільки конкурентом кореневої губки за субстрат, але і активним продуцентом фермента молокозгортаючої дії. Розроблена технологія його культивування в біореакторі "Біор-0,1" з метою одержання фермента у кристалічному стані. Ферментний препарат прошив медико-біологічні дослідження і одержано висновок про можливість його використання у сороварінні. Розроблені технічні умови і технологічна інструкція на ферментний препарат-ларицин з метою одержання дослідного зразку сиру.

ОСНОВНІ ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ ПО ТЕМІ
ДОКТОРСЬКОЇ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Негруцкий С. Ф., Бойко М.И. Влияние резорцина на содержание свободных аминокислот в мицелии корневой губки (*Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. разного возраста //Биол. науки. - 1974. - N 10. - С. 80 - 84.

2. Негруцкий С. Ф., Бойко М. И., Сычев П. А., Гарькавая Л. И. Влияние фитонцидов лесных растений, корневых выделений лопина и некоторых биологически активных соединений на рост корневой губки //Лесоводство и агролесомелиорация. - Киев Урожай, 1975. - вып. 40. - С. 42 - 48.

3. Негруцкий С. Ф., Сычев П. А., Бойко М. И., Шуберт И. О. О характере роста корневой губки в культуре и возможностях биологического преодоления инфекции гриба //Лесоводство и агролесомелиорация. - Киев Урожай, 1975. - вып. 40. - С.35-40.

4. Негруцкий С. Ф., Бойко М. И., Логашев Ю. Е. Влияние магнитостатических полей на рост *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. //Микол. и фитопатол. - 1976. - т.10, вып.5. - С.411-414.

5. Негруцкий С. Ф., Бойко М. И. Изоферменты пероксидазы штаммов корневой губки, отличающихся по степени патогенности к проросткам сосны обыкновенной //Биол. науки. - 1976. - N10. - С. 84 - 88.

6. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Сычев П.А. Культурально-морфологические особенности штаммов *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. //Микол. и фитопатол. - 1978. - т.12, вып. 1. - С. 50 - 54.

7. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Божко А. П. Целлюлаза и дегидрогеназа активність штамів гриба *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. у чистій культурі //Укр. ботан. журн. - 1978. - т. XXV, N 4. - С. 327 - 330.

8. Бойко М. И. Влияние температуры и кислотности среды на рост штаммов гриба *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. //Микол. и фитопатол. - 1979 - т. 13. - вып. 2. - С. 141 - 146.

9. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф. Электрофоретическая характеристика водорастворимых белков штаммов *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. //Микол. и фитопатол. - 1979. - т. 13. - вып. 1. - С. 57 - 64.

10. Негруцкий С. Ф., Ветрова Е. В., Бойко М. И. Морфологические и физиолого-биохимические особенности гомо- и гетерокарионов *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. //Микол. и фитопатол. - 1981. - т. 5, вып. 6. - С. 517-525.

11. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Мирошниченко Т. В. и Бондаренко Г. И. Молокозвертывающая активность *Coltricia reggenis* (L. Fr.) Murr. //Микол. и фитопатол. - 1986. -т7 20, вып. 3. - С. 191-193.

12. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Красильная Е. Н. Акти-

ность и изоферментный состав пероксидазы проростков *Pinus sylvestris* L., инфицированных *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Микол. и фитопатол. - 1987. - т. 21, вып. 3. - С. 226-231.

13. Коршиков И. И., Тарабрин В. П., Бойко М. И. Пероксидаза как маркер адаптивных изменений растений в условиях загрязнения // Дендрозкология, техногенез, вопросы охраны природы. - Уфа, 1987. - С. 106 - 111.

14. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Федотов О. В., Поляк В. А. Влияние различных источников углеродного питания на молокосвертывающую активность *Hirschiogorus laricinus* // Философские и естественно-научные аспекты антропологии. - Санкт-Петербург-Донецк, 1992. - С. 117 - 120.

15. Бойко М. И., Федотов О. В., Негруцкий С. Ф., Антимонина В. С. Базидиальные грибы как возможные продуценты протеиназ молокосвертывающего действия // Интродукция и акклиматизация растений на Украине. - Киев Наук. думка, 1995. - вып. 24. - С. 82 - 85.

16. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Хлевная Л. А., Кузьминская Н. В. Содержание белка - признак, характеризующий посевные качества семян *Pinus sylvestris* L. // Интродукция и акклиматизация растений на Украине. Киев Наук. думка, 1996. - вып. 26.

17. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф. Динамика внутриклеточного фонда свободных аминокислот в мицелии штаммов гриба *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. (корневая губка) // Редкол. журн. "Биол. науки". - Москва, 1977. - 13с. - Деп. 25. 10. 1977, N 4120.

18. Патент України N 6228 С 12 N 9/58, С 12 N 15/00 / (С 12 Т 9/58, С 12 R 1 645). Штам *Hirschiogorus laricinus* M-81 (Karst.) Ryv. - продуцент молокосвертывающего фермента / М. И. Бойко, С. Ф. Негруцкий, Т. В. Мирошніченко, М. О. Соболев, Ю. С. Варенко. - Оpubл. 29.12.94. Бюл. N 8-1.

19. А. с. N 1431095 СССР Питательная среда для выращивания гриба пенисфоры гигантской / С. Ф. Негруцкий, Л. П. Фильчаков и М. И. Бойко. - от 15.06.1988 (для служебного пользования).

20. А. с. N 1395672 СССР С 12 N 9/58. Способ получения молокосвертывающего ферментного препарата / М. И. Бойко, С. Ф. Негруцкий и Т. В. Мирошніченко. - Оpubл. 15.05.88. Бюл. N. 18.

21. А. с. N 1592336 СССР С 12 P 7/48, С 12 N 1/14. Штамм гриба *Fomitopsis pinicola* - продуцент лимонной и шавелевой кислот / М. И. Бойко, С. Ф. Негруцкий, В. А. Чесалов, М. А. Соболев и Л. В. Черных. - Оpubл. 15.09.90. Бюл. N 34.

22. Бойко М. И., Холодная М. П. Влияние экстрактов растительного происхождения и антибиотиков на рост штаммов *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. в культуре // Использование химических и биологических средств в борьбе с вредителями леса. Тез. докл. Всес. конф. - Москва, 1976. - С. 15-17.

23. Бойко М. И. Электрофоретична характеристика водорозчинних білків гриба *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. в онтогенезі // Досяг. бот. науки. - Київ Наук. думка, 1976. - С. 189-190.

24. Бойко М. И. Изоферменты пероксидазы гриба корневая губка // Досяг. бот. науки на Україні 1974-1975рр. - Київ Наук. думка, 1977. - С. 9-10.

25. Бойко М. И., Ковалев Н. В. Исследование внутривидовой изменчивости *Fomitopsis annosa* // Защита хвойных насаждений от корневых гнилей. Тез. докл. зональной науч.-производ. конф. Белоруссии и респ. Прибалтики, Минск 9-10 сент. 1981. - Минск, 1981. - С. 9 - 10.

26. Бойко М. И. Электрофоретическое исследование изофер-

ментов пероксидазы в проростках сосны, инфицированных штаммами гриба *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. // VII съезд Укр. бот. об-ва. Тез. докл. - Киев Наук. думка, 1982. - С. 337.

27. Негруцкий С. Ф., Ветрова Е. В., Бойко М. И. Морфологическая и физиолого-биохимическая изменчивость базидиомицета *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst. // Экология и биология низших растений. Тез. докл. Всес. симп. микологов и лихенологов (IX симп. микол. и лихенол. Прибалт. вос. респ. и Бел. ССР). Минск, 17-19 нояб. 1982. - Минск, 1982. - С. 110-111.

28. Бойко М. И., Мирошвиченко Т. В. Изучение антагонистических и некоторых физиолого-биохимических свойств моноспорных культур *Hirschioporus abietinus* (Fr.) Donk. // Современ. пробл. лесозащиты и пути их решения. Мат. рег. науч.-производ. конф. Белоруссии и Прибалтийских респ., Минск, 13-15 сент. 1984. - Минск, 1985. - С. 132 - 133.

29. Бойко М. И., Красильная Е. Н. Активность пероксидазы и о-дифенолксидазы инфицированных проростков сосны - тест для определения степени вирулентности штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Пути ускорения науч.-техн. прогресса в лесном хозяйстве. Интегрированная защита леса от вредителей и болезней. Тез. докл. науч.-практ. совещания Прибалт. респ. и Белоруссии. - Каунас-Гирионис, 1986. - С. 172 - 173.

30. Бойко М. И. Тест для определения степени вирулентности штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // VIII съезд Укр. бот. об-ва. Тез. докл. - Киев Наук. думка, 1987. - С. 58.

31. Бойко М. И., Фильчаков Л. П., Чесалов В. А. Интенсивность разрушения древесины некоторыми факультативными сапрофитами // III Всесоюз. конф. по биоповреждениям, 19 - 21 окт., 1987. - Москва, 1987 - С. 30.

32. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Ляпичева З. И. О биохимии паразитизма *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Физиол.-биохим. основы иммунитета к гриб. болезням раст. - Уфа, 1988. - С. 6.

33. Негруцкий С. Ф., Бойко М. И. Изоферменты семян отдельных деревьев сосны обыкновенной // Лесн. генетика, селекция и физиология древесных раст. Мат. Междунар. симпозиума (25-30 сент. 1989, Воронеж). - Москва, 1989. - С. 215-216.

34. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф. Использование изоферментов в хемотаксономическом изучении грибов // Хемотаксономическое изучение споровых растений и грибов. Достижения и перспективы развития. Тез. докл. I Всесоюз. совещ. Киев, 16 - 18 мая, 1990. - С. 112 - 113.

35. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф. Содержание белка и изоферментный спектр пероксидазы проростков сосны, инфицированных корневой губкой // Проблемы лесовед. и лесн. экологии. Тез. докл. Ч. 1. - Москва, 1990. - С. 307 - 309.

36. Бойко М. И., Глухова Е. А., Тищенко И. М., Хлевная Л. А. Содержание белка как тест определения повышенной жизнеспособности семян *Pinus sylvestris* L. // Проблемы лесной фитопатол. и микол. Тез. докл. Междунар. конф., Каунас, 17-20 сент. 1991. - Москва-Каунас, 1991. - С. 5.

37. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Глухова Е. А., Хлевная Л. А. Внутрипопуляционная изменчивость семян сосны обыкновенной по содержанию белка в зависимости от их веса // Репродуктивная биология интродуцированных растений. Тез. докл. IX Всесоюз. совещание по семеноведению интродуцентов. - Умань Б. и., 1991. - С. 24.

38. Бойко М. И., Негруцкий С. Ф. Популяційна мінливість насіння *Pinus sylvestris* L. за складом ізоферментів пероксидази // Захист лісів Укр. Карпат від хворіб і шкідників. IY Наук. техн. конф. Тез. доп. - Івано-Франківськ, 1992. - С. 36.

39. Бойко М. И., Глухова О. О., Тищенко И. М. Мінливість насіння *Pinus sylvestris* L. за вмістом білка залежно від ва-

ги та кольору // IX з'їзд Укр. бот. тов. - Київ:Наук. думка, 1992. - С. 260 - 261.

40. Бойко М. І., Негруцький С. Ф. Характеристика популяцій сосни звичайної за вмістом білку у насінні // II з'їзд Укр. тов. фізіол. рос. т. 1. Тез. доп. - Київ, 1993. - С.20.

АННОТАЦИЯ

Бойко М. И. "Физиолого-биохимические особенности системы *Pinus sylvestris* L. - *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref и перспективы практического использования экзометаболитов некоторых дереворазрушающих грибов". Диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук по специальностям 03.00.12 - Физиология растений и 03.00.24 - микология, Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1996.

Получены новые экспериментальные данные о формировании и физиолого-биохимическим особенностям системы *Pinus sylvestris* - *Heterobasidion annosum*. Впервые показана роль пероксидазы, вещества, близкого к природе 5-н-бутилпиколиновой кислоты, а также ксилозы, арабинозы, сахарозы, целлобиозы, выделяемых штаммами одной популяции *H. annosum* в патогенезе *P. sylvestris*. Установлена внутривидовая изменчивость по ряду признаков растения-хозяина, патогена и роль сапротрофных дереворазрушающих грибов в ограничении распространения корневой губки. Установлена химическая природа экзометаболитов грибов *Fomitopsis pinicola* и *Hirschioporus laricinus* - антагонистов корневой губки и показана возможность их использования не только для борьбы с корневой губкой, но и в других отраслях хозяйства.

BRIEF INFORMATION

Boyko M.I. "Physiological and biochemical peculiarities of *Pinus sylvestris* L. - *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref system and the perspectives of the practical usage of exometabolites of some wood-destroying fungi". Thesis for a doctor of biological sciences on the specialities 03.00.12 - Plant Physiology and 03.00.24 - Mycology, Taras Shevchenko Kiev University, Kiev, 1996.

New experimental data about the formation and physiological and biochemical peculiarities of *Pinus sylvestris* - *Heterobasidion annosum* system were received. For the first time the role of peroxidase was shown. This is the substance close to nature of 5-n-butylpicolinic acid, as well to xylose, arabinose, sucrose, cellobiose excreted by strains of one and the same population of *H. annosum* into substratum, in pathogenesis *P. sylvestris*. Intrapopulative changeability according to a number of signs of the host plant, pathogen and the role of saprophytic wood destroying fungi in the restriction of *H. annosum* spreading were established. The chemical nature of exometabolites of fungi *Fomitopsis pinicola* and *Hirschioporus laricinus* - which are the antagonist of *H. annosum* was determined. It was shown the possibility of their usage not only for the struggle with the *H. annosum* but in other branches of production as well.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сосна звичайна, фітопатогенний гриб - *Heterobasidion annosum*, ферменти, білки, 5-н-бутилпиколинова кислота, вуглеводи, протеїнази молокозгортаючої дії.

AB 36.408
AB 36.408

Бойко Михайло Іванович

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Підлісано до друку 4.12.96 р.

Формат 60x84/16

Папір друкарський

Друк офсет

ум. друк. арк. 2.

Тираж 100 екз.

Заказ № 149

Надруковано в друкарні "ПО"Чайка"
