

**ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г.ХОЛОДНОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ**

ДЕМЧЕНКО Світлана Іванівна

УДК

582.87.23:578.084

**БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГРИБА *PENIOPHORA GIGANTEA* (FR.) MASS. –
ПРИРОДНОГО АНТАГОНІСТА *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.**

03.00.21– мікологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2001

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Донецькому національному університеті Міністерства освіти і науки України

Наукові керівники:

доктор біологічних наук, професор
Негруцький Сергій Федорович,
Донецький національний університет
Міністерства освіти і науки України,
завідувач кафедри фізіології рослин

доктор біологічних наук, професор
Бойко Михайло Іванович,
Донецький національний університет
Міністерства освіти і науки України,
завідувач кафедри фізіології рослин

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук
Соломко Ельвіра Федорівна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
старший науковий співробітник відділу мікології

кандидат біологічних наук
Трутнєва Ірина Анатоліївна,
Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України,
старший науковий співробітник лабораторії
клітинної біології та біотехнології грибів

Провідна установа:

Національний аграрний університет,
кафедра лісових культур та лісової фітопатології,
Кабінет Міністрів України, м. Київ

Захист відбудеться “ 21 ” січня 2002 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.211.01 в Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за адресою: 01601, м. Київ, вул. Терещенківська, 2.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за адресою: 01025, м. Київ, вул. Велика Житомирська, 28.

Автореферат розісланий “ 17 ” грудня 2001 р.

Вчений секретар

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підвищення продуктивності лісових насаджень нерозривно пов'язано із захистом їх від збудників хвороб, серед яких особливою шкідливістю в Україні відрізняється *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Цей гриб викликає строкату ситову гниль коренів хвойних деревних рослин і завдає значний збиток лісовому господарству України. Тому зусилля багатьох дослідників спрямовані на розробку діючих засобів профілактики і боротьби зі збудником цієї хвороби. Проте радикальні способи боротьби з *H. annosum* досі не знайдені. Останнім часом великого значення набуває біологічний метод боротьби з патогеном, заснований на використанні антагонізму і конкуренції між організмами, а також алелопатичних відношень рослин. Вивченню антагоністичних властивостей макро- і мікроміцетів стосовно *H. annosum* присвячено багато робіт (Федоров, 1984; Негруцкий, 1986; Василюскас, 1989; Полещук, 1991; Бойко, 1996 та інші). Увагу дослідників привертають ґрунтові і ризосферні гриби, але особливо сапротрофні дереворуйнівні гриби, які не тільки пригнічують життєдіяльність патогена, проте й беруть участь у процесах мінералізації деревних залишків і ґрунтоутворенні. Серед цих грибів активним природним антагоністом щодо *H. annosum* є *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. В даний час в Україні відсутні районовані штами *P. gigantea*, недостатньо вивчені біологічні особливості цього гриба й механізм його антагоністичної дії на *H. annosum*. В зв'язку з цим актуальним є вивчення культурально-морфологічних, екологічних, фізіолого-біохімічних і антагоністичних особливостей штамів *P. gigantea*, ізолюваних із грибів, що зростають в однакових і різних екологічних умовах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукові дослідження проводилися на кафедрі фізіології рослин Донецького національного університету з 1996 по 1999 рр. у рамках науково-дослідної теми “Стійкість рослин до біотичних і абіотичних факторів середовища” за реєстраційним номером 0197U017656 і держбюджетної теми № 97-1вв/16 “Одержати й апробувати нові високоякісні штами базидіальних грибів і розробити на їх основі технологію виробництва цінних біопрепаратів і харчових продуктів”.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було вивчити біологічні особливості різних штамів *P. gigantea* для обґрунтування перспективності їх застосування в системі інтегрованих засобів захисту соснових насаджень від *H. annosum*. Відповідно до поставленої мети передбачалося рішення таких задач:

- провести порівняльне вивчення культурально-морфологічних особливостей штамів *P. gigantea*, ізолюваних із грибів, що зростають в однакових і різних екологічних умовах, а також моноартроконідіальних культур цього виду;

- дослідити вплив екологічних факторів (температури, кислотності середовища й умов освітлення) на ріст і артроконідіогенез різних штамів *P. gigantea*;
- вивчити вплив джерел вуглецевого й азотного живлення на ріст і спороутворюючу активність штамів *P. gigantea*; підібрати живильні субстрати з відходів рослинництва, придатні для культивування *P. gigantea*;
- провести порівняльне дослідження біохімічних особливостей різних штамів *P. gigantea*: вивчити в динаміці активність дегідрогеназ у вегетативному міцелії і екзоферментів, що беруть участь у розкладанні різних компонентів деревини; виявити електрофоретичний спектр і кількісний вміст водорозчинних білків у міцелії *P. gigantea*; визначити дереворуйнівну активність моноартроконідіальних культур;
- в умовах *in vitro* вивчити антагонізм одержаних штамів *P. gigantea* стосовно ізолятів *H. annosum*, що відрізняються за ступенем вірулентності; можливість використання *P. gigantea* в запобіганні пошкодження проростків *Pinus sylvestris* L. і *Pinus pallasiana* D. Don. патогеном; визначити токсичність метаболітів *P. gigantea* для ізолятів *H. annosum* і проростків *P. sylvestris*; виявити екзометаболіти *P. gigantea*, що чинять інгібуючий вплив на ріст *H. annosum*;
- у відкритих штучних екосистемах виявити можливість пригнічення спорової інфекції *H. annosum* на пнях хвойних порід за допомогою селектованих штамів *P. gigantea*; розробити лабораторний регламент одержання біопрепарату “Пеніофорін” і інструкцію з його застосування

Об’єкт дослідження – штами *P. gigantea*, ізольовані з грибів, що зростали в однакових і різних екологічних умовах, та моноартроконідіальні культури цього виду.

Предмет дослідження – міжштамова специфічність *P. gigantea* за культурально-морфологічними, екологічними, фізіолого-біохімічними та антагоністичними особливостями і механізм антагоністичної дії цього гриба щодо *H. annosum*.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої в роботі мети використані методи культурально-морфологічних досліджень, за допомогою яких виділено в чисту культуру *P. gigantea* і *H. annosum*, досліджено морфологію колоній і мікроструктуру вегетативного міцелію *P. gigantea*, оцінено на різних лабораторних середовищах швидкість лінійного росту, накопичення біомаси міцелію та інтенсивність артроконідіогенезу різних штамів *P. gigantea* і моноартроконідіальних культур цього виду. Методи еколого-фізіологічних досліджень застосовані для вивчення впливу екологічних факторів (світла, температури, кислотності середовища), різних джерел вуглецевого і азотного живлення, складу поживних субстратів із відходів рослинництва на ріст і спороутворюючу активність *P. gigantea*; біохімічні методи дослідження – для визначення рівня активності дегідрогеназ у вегетативному міцелії, активності глюкозооксидази, пероксидази, поліфенолоксидази, целюлозолітичних і пектолітичних ферментів, а також кількості щавлевої кислоти в культуральних фільтратах штамів *P. gigantea*, дослідження дереворуйнівної активності і гетерогенності во-

дорозчинних протеїнів вегетативного міцелію гриба; методи математичного планування експериментів – для вивчення впливу різних співвідношень вуглецю і азоту в живильному середовищі на ріст і спороутворюючу активність *P. gigantea*; методи вивчення антагоністичних властивостей грибів – для дослідження антагоністичної дії *P. gigantea* щодо *H. annosum in vitro* і *in vivo*, визначення антибіотичної, антифунгальної і фітотоксичної активності культуральних фільтратів штамів *P. gigantea*; статистичні методи – для оцінки достовірності одержаних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Одержані нові відомості щодо біології *P. gigantea* у вегетативній стадії росту. У штамів *P. gigantea*, ізольованих із дикорослих плодкових тіл, виявлено варіювання морфологічних ознак гіфальної системи і виділені ті з них, що відрізняються найменшою мінливістю. Доповнені дані про вплив генотипу штаму і складу субстрату на ріст і інтенсивність артроконідіогенезу *P. gigantea*. Здійснено оптимізацію світлового, кислотного, температурного режимів культивування дослідженого гриба *in vitro*. Визначені джерела вуглецевого й азотного живлення, сприятливі для росту і спороутворюючої активності штамів *P. gigantea*. Вперше простежено в динаміці активність дегідрогеназ у вегетативному міцелії гриба. Встановлено спектр ензимів у культуральних фільтратах штамів *P. gigantea*, що беруть участь у біодеструкції різних компонентів деревини. Виявлено якісну і кількісну зміну вмісту водорозчинних білків у міцелії зі збільшенням віку культур.

З'ясовано, що антагоністична дія всіх досліджених штамів *P. gigantea* щодо *H. annosum* виявляється через конкурентні трофічні зв'язки і метаболіти, синтезовані антагоністом у процесі життєдіяльності, причому екзометаболіти є більш токсичними, ніж ендометаболіти. Вперше встановлено, що активна секреція цих метаболітів спостерігається під час безпосереднього контакту гіф *P. gigantea* і *H. annosum*. Визначено хімічну природу екзометаболітів *P. gigantea*, що фунгістатично впливають на міцелій *H. annosum*. До них відносяться щавлева кислота, глюкозооксидаза, целюлозолітичні ферменти і антибіотичні речовини, які за спектром своєї дії наближаються до гліотоксину.

Вперше у моноартроконідіальних культур *P. gigantea*, що можуть створювати додатковий інфекційний фон у хвойних насадженнях, виявлено варіабельність культурально-морфологічних ознак, антагоністичної й дереворуйнівної активності. Обгрунтовано можливість використання моноартроконідіальних культур для селекції штамів *P. gigantea* із підвищеною антагоністичною активністю.

Вперше встановлено, що метаболіти *P. gigantea* не тільки не чинять фітотоксичного впливу на проростання насіння *P. sylvestris*, проте і позитивно впливають на лінійний ріст проростків сосни звичайної.

Практичне значення одержаних результатів. Показано перспективність використання досліджених штамів *P. gigantea* в системі біологічних засобів боротьби з *H. annosum* у півден-

но-східній частині України. Розроблено лабораторний регламент одержання біопрепарату “Пеніофорін”, основою якого є спорова суспензія селектованих штамів *P. gigantea*, і складено інструкцію з його застосування у відкритих штучних екосистемах. Підібрані живильні субстрати з відходів сільськогосподарського виробництва для вирощування *P. gigantea* в поверхневій культурі. Отримано новий штам *P. gigantea* P-1-96, який має високу антагоністичну активність до *H. annosum* і рекомендований як об'єкт для виготовлення біопрепарату (патент України № 322942 А від 15.02.2001 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведений аналіз літературних даних; обгрунтовані мета і задачі дослідження; вивчені на 50 живильних середовищах різного складу морфологічні ознаки гіфальної системи, швидкість росту вегетативного міцелію й інтенсивність артроконідіогенезу 6 штамів *P. gigantea*, ізольованих із плодкових тіл, що зростали в однакових і різних екологічних умовах; встановлені оптимальні рівні екологічних факторів (світла, температури, кислотності середовища) для росту і спороутворюючої активності гриба. Дослідження антагоністичної активності одержаних культур *P. gigantea* стосовно 7 ізолятів *H. annosum* і визначення хімічної природи ряду речовин, що містяться в культуральній рідині антагоніста й інгібують ріст патогена, проводилися за участю автора. Особисто здобувачем простежена в динаміці ензиматична активність 7 гідролітичних і 7 окисно-відновних ферментів; досліджені антибіотична, антифунгальна і фітотоксична активності культуральних фільтратів штамів *P. gigantea*; виявлена мінливість культурально-морфологічних, фізіолого-біохімічних і антагоністичних особливостей 20 моноартроконідіальних культур дослідженого гриба. Самостійно проведено статистичну обробку й аналіз одержаних результатів дослідження. Здобувач є співавтором лабораторного регламенту одержання біопрепарату “Пеніофорін”, який розроблений разом із доцентом кафедри фізіології рослин Донецького національного університету, кандидатом біологічних наук Л.П.Фільчаковим .

Апробація результатів дисертації. Апробація роботи проведена на засіданнях кафедри фізіології рослин і Вченої ради біологічного факультету Донецького національного університету. Основні результати досліджень доповідалися і обговорювалися на науково-теоретичних конференціях викладачів і співробітників Донецького національного університету (Донецьк, 1996; Донецьк, 1999, Донецьк, 2001), X з'їзді Українського ботанічного товариства “Проблеми ботаніки і мікології на порозі третього тисячоліття” (Київ-Полтава, 1996), конференції молодих вчених-ботаніків України “Актуальні питання ботаніки і екології” (Одеса, 1997; Ніжин, 1999; Чернігів, 2000), 1-й Міжнародній конференції “Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных соединений и пищевых продуктов” (Донецьк, 1997), 9-й Міжнародній конференції “Root and Butt Rots” (Carcans-Mabuisson (France), 1997), Міжнародній конференції “Питання біоіндикації й екології” (Запоріжжя, 1998; Запоріжжя,

2000), Міжнародній науково-практичній конференції “Состояние и мониторинг лесов на рубеже XXI века” (Мінськ, 1998), Міжнародній конференції “Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии” (Москва, 1998), Міжнародній конференції “Проблемы микробиологии и биотехнологии” (Мінськ, 1998), Всеукраїнській науковій конференції аспірантів і студентів “Охорона навколишнього середовища та раціональне використання природних ресурсів” (Донецьк, 1999), Міжнародній науково-практичній конференції “Экологическая и техногенная безопасность” (Харків, 2000), Міжнародній науково-практичній конференції “Лісовий комплекс на зламі тисячоліть: освіта, наука, виробництво” (Київ, 2000) та інших.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 32 роботи, із них 10 статей у фахових виданнях України (1 – “Український ботанічний журнал”, 1 – “Вісник проблем біології і медицини”, 1 – “Бюллетень Никитського ботаничного саду”, 1 – “Вісник Донецького університету”, 1 – “Культура народів Причорномор'я”, 2 – “Науковий вісник Національного аграрного університету”, 1 – “Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского”, 1 – “Вопросы биоиндикации и экологии”, 1 – “Збірник наукових праць Луганського державного аграрного університету”), 21 публікація у журналах та регіональних збірниках (1 стаття і 20 тез) та 1 патент України.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел (258 найменувань, з них 87 іноземних), додатків. Робота викладена на 213 сторінках машинописного тексту, включає 38 таблиць і 49 рисунків. Додатки займають 43 сторінки й містять 11 таблиць і 23 рисунків.

Автор висловлює щирю вдячність науковим керівникам доктору біологічних наук, професору С.Ф. Негруцькому і доктору біологічних наук, професору М.І. Бойку, всім співробітникам кафедри фізіології рослин Донецького національного університету, головному лісничому Краснолиманського держлісгоспу Донецької області В.І. Гененко й інженеру охорони і захисту лісу Краснолиманського держлісгоспу М.М. Чуприну за допомогу при виконанні дисертаційної роботи.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ *PENIOPHORA GIGANTEA* (FR.) MASS. ДЛЯ БІОЛОГІЧНОЇ БОРОТЬБИ З *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

На основі літературних джерел проведено аналіз таксономії, морфології, екології, фізіології *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. і *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Дано огляд біологічних заходів

боротьби з *H. annosum*. Обґрунтовано перспективність використання *P. gigantea* для біологічної боротьби зі збудником кореневої строкатої ситової гнилі лісових насаджень в різних країнах світу.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були чисті культури 6 штамів *P. gigantea* (P-1-96, P-2-97, Д-1-85, Д-2-95, М-1-98, ХП-1-99) і 7 ізолятів *H. annosum* (НА-1-95, НА-2-95, НА-3-95, НА-4-96, НА-5-96, KB-82166, ЦНІЛГ), виділені з дикорослих плодкових тіл, які були зібрані в насадженнях *Pinus sylvestris* L. Донецької, Луганської, Харківської, Мінської і Воронізької областей.

Вивчення культурально-морфологічних і еколого-фізіологічних особливостей штамів *P. gigantea* проводили загальноприйнятими методами, які розроблені для дослідження в чистій культурі вищих базидіальних грибів (Рипачек, 1967; Билай, 1982; Бухало, 1988).

Моноартроконідіальні культури *P. gigantea* одержували методом послідовних розведень на сусло-агаровому середовищі (Билай, 1982).

Особливості росту і артроконідіогенезу штамів *P. gigantea* визначали на лабораторних середовищах – пивному суслі (8⁰ за Баллінгом), глюкозо-картопляному, глюкозо-пептонному, Чапека-Докса та природних субстратах з відходів промислового й сільськогосподарського виробництва – сосновій тирсі, злакових висівках, горішку (стандарт № 5), полові, макусі й соняшниковому лущинні. Діаметр (мм) колонії культур виміряли щодобово. Ростовий коефіцієнт (РК) розраховували за формулою, яка запропонована А.С. Бухало (1988). Накопичення біомаси міцелію (мг/100 мл) визначали ваговим методом (Билай, 1982). Інтенсивність артроконідіогенезу оцінювали за кількістю оідій (спор безстатевого розмноження) в 1 мл спорової суспензії (Билай, 1982).

Для вивчення біохімічних особливостей штамів *P. gigantea* застосовували такі методики: активність дегідрогеназ у вегетативному міцелії визначали колометричним методом з трифенілтетразолієм хлористим (Ермаков, 1987), целюлазну активність в культуральних фільтратах (КФ) – методом Г.В. Колесневої і Г.Г. Мельничук (1979), активність екзополігалактуронази в КФ – модифікованим йодометричним методом Вільштеттера-Шуделя (Ермаков, 1987), активність пектинестерази в КФ – титрометричним методом (Билай, 1982), активність поліфенолоксидази в КФ – йодометричним методом (Починок, 1976), активність пероксидази в КФ – методом А.Н. Бояркіна (1961), активність глюкозооксидази в КФ – титрометричним методом (Билай, 1982); гетерогенність водорозчинних білків оцінювали за допомогою електрофорезу в паралельних пластинках поліакріламідного гелю (Сафонов, Сафонова, 1971); кількісний вміст водорозчинних білків у вегетативному міцелії визначали за Бредфордом (Дарбре, 1989); дереворуйнівну активність оцінювали за втратою абсолютно сухої маси зразків деревини через 120 діб росту гриба (Степанова, Мухин, 1979); вміст целюлози й лігніну в зразках заболоні *P. sylvestris* до початку й після закінчення екс-

перименту визначали йодометричним методом (Починок, 1976). Для визначення вмісту щавлевої кислоти в КФ штамів *P. gigantea* використовували титрометричний метод (Ермаков, 1976).

Антибіотичну активність КФ штамів *P. gigantea* вивчали методом паперових дисків (Харченко, 1982).

Антифунгальну активність КФ штамів *P. gigantea* щодо ізолятів *H. annosum* визначали відповідно рекомендаціям С.Ф. Негруцького (1996).

Фітотоксичну активність КФ штамів *P. gigantea* оцінювали за методом біопроб на насіннях *P. sylvestris* (Берестецкий, 1974).

Антагоністичні властивості штамів *P. gigantea in vitro* вивчали методом зустрічних культур (Рипачек, 1967). Дослідження антагоністичної активності селектованих штамів *P. gigantea* в природних умовах проводили в соснових насадженнях Ямпольського лісництва Краснолиманського держлісгоспу Донецької області (монокультура, III клас віку, бонітет II, повнота 0,6, тип лісорослинних умов зростання – свіжий бір (А₂), ґрунти – піщані) з 1995 по 1999 рр.

Ступінь вірулентності ізолятів *H. annosum* в присутності *P. gigantea* визначали на проростках *P. sylvestris* і *P. pallasiana*. Характеристикою ступеня вірулентності була кількість загиблих проростків на 7-у й 14-у добу після їх інфікування грибами. В процесі розвитку патологічного процесу в проростках визначали активність пероксидази за А.Н. Бояркіним (1961).

Повторність усіх проведених дослідів була трьох- або п'ятикратною. Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за методами варіаційного, кореляційного, дисперсійного аналізу (Лакин, 1980, Плохинский, 1970) і множинного порівняння середніх за критеріями Дункана, Даннета й Н'юмана-Кейлса (Приседський, 1999), показник подібності й коефіцієнт ідентичності штамів *P. gigantea* розраховували за модифікованими формулами Л.А. Животовського (1982).

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ *PENIOPHORA GIGANTEA*

Культурально-морфологічна характеристика штамів *P. gigantea*. Вивчена мінливість культурально-морфологічних ознак штамів *P. gigantea*, ізольованих з грибів, що зростали в однакових і різних екологічних умовах. Виявлено, що за формою і забарвленням колоній на сусло-агаровому середовищі досліджені штами були подібними, але за текстурою міцелію вони підрозділені на дві групи. У першій із них (штами Р-1-96, Д-1-85, Д-2-95, ХП-1-99) міцелій у першу добу росту був пухко-повстяно-шерстистим, згодом ущільнювався, приймав зернисто-порошкоподібну форму в периферичній частині колонії. Другу групу (штами Р-2-97 і М-1-98) відрізняв рідкий, павутинний, притиснутий до середовища і злегка порошистий міцелій. Плодові тіла і їх зачатки в культурі не утворювалися. Мікроскопірування вегетативного міцелію показало, що основну його масу складали тонкостінні слабозгалужені генеративні гіфи. Ширина гіф зануреного міцелію становила 3,8-7,2 мкм із середнім значенням 5,0-5,6 мкм, повітряного міцелію –

1,9-3,7 мкм із середнім значенням 2,3-2,9 мкм. Пряжки виявлялися дуже рідко, в основному на стовщених скелетних гіфах, ширина яких знаходилася в межах 4,4-11,7 мкм із середнім значенням 6,1-6,9 мкм. Під час попарного порівняння штамів *P. gigantea* за мікроморфологічними ознаками гіфальної системи була виявлена гомогенність за цим показником лише в штамів, ізольованих із грибів, що зростали в однакових екологічних умовах (Д-1-85, Д-2-95, Р-1-96 і Р-2-97): показник подібності варіював від 0,93 до 0,99, коефіцієнт ідентичності – від 0,82 до 0,96. У всіх досліджених культур *P. gigantea* спостерігалася стадія анаморфи, яка є суттєвим таксономічним критерієм на рівні виду у вищих *Basidiomycetes* (Решетников, 1991): повітряний міцелій на третю добу росту фрагментувався на короткі паличкоподібні артроконідії (оїдії). Найбільша кількість оїдій формувалася міцелієм на 9-12 добу росту гриба. Виявлено поліморфізм отриманих штамів *P. gigantea* за інтенсивністю артроконідогенезу (табл. 1). За показником швидкості росту отримані культури були віднесені, за класифікацією А.С. Бухало (1988), до категорії швидкоростучих ($PK > 80$), проте у досліджених штамів була відсутня синхронність у динаміці росту. Це виявлялося в розходженні значень питомої швидкості росту (μ_{max}), часу подвоєння показників біомаси (g), тривалості експоненціальної фази росту і часу досягнення максимальних значень накопичення біомаси міцелію (табл. 1).

Встановлено достовірну залежність швидкості росту і споруутворюючої активності *P. gigantea* від складу випробуваних лабораторних середовищ. Так, для росту вегетативного міцелію й артроконідогенезу більшості штамів найкращим живильним середовищем виявилось пивне суцло. Найнижчими ростові показники й інтенсивність споруляції були на середовищі Чапека-Докса.

Таблиця 1 – Ріст й інтенсивність споруляції штамів *P. gigantea* на пивному суслі

Штами <i>P. gigantea</i>	Питома швидкість росту (μ_{max}), год ⁻¹	Час подвоєння показників біомаси (g), год	Тривалість експоненціальної фази росту, діб	Час досягнення максимальних значень накопичення біомаси міцелію, діб	Ростовий коефіцієнт (PK)	Інтенсивність споруляції, тис. шт. оїдій на 1 мл спорової суспензії
Д-1-85	0,0196	35,36	8	10	91,4	1242,8±24,1
Д-2-95	0,0244	28,40	6	8	96,7	851,2±29,1
Р-1-96	0,0244	28,40	6	8	103,8	1282,2±34,2
Р-2-97	0,0194	35,72	8	10	88,2	627,2±16,3
М-1-98	0,0180	38,50	8	10	88,8	795,4±12,7
ХП-1-99	0,0196	35,36	8	10	90,0	685,2±23,1

Таким чином, морфологічні ознаки гіфальної системи, швидкість росту й інтенсивність артроконідогенезу *P. gigantea* залежать від індивідуальних особливостей штамів і змінюються в залежності від складу субстрату.

Культурально-морфологічна характеристика моноартроконідіальних культур штаму *P. gigantea* P-1-96. Дослідження показали, що за морфологією колоній на сусло-агаровому середовищі моноартроконідіальні культури майже не відрізнялися від материнського штаму P-1-96. Проте спостерігалася варіабельність мікроструктури вегетативного міцелію. Згідно з коефіцієнтами варіації довжина ($CV=7-15\%$) і ширина ($CV=7-16\%$) оідій і їх співвідношення ($CV=9-17\%$) виявилися стабільнішими ознаками, ніж ширина генеративних гіф зануреного ($CV=17-30\%$) і повітряного ($CV=18-30\%$) міцелію. Швидкість росту міцелію й інтенсивність артроконідіогенезу також були сильно мінливими ознаками моноартроконідіальних культур *P. gigantea* (рис. 1). Так, концентрація біомаси міцелію на глюкозо-пептонному середовищі варіювала від $258,3 \pm 14,8$ до $436,6 \pm 5,2$ мг/100 мл, а інтенсивність споруляції – від $496 \pm 7,3$ до $1100 \pm 9,7$ тис. оідій на 1 мл спорової суспензії.



Рис. 1. Ріст та інтенсивність споруляції моноартроконідіальних культур штаму *P. gigantea* P-1-96

Отже, досліджені моноартроконідіальні культури *P. gigantea* істотно відрізнялися за культурально-морфологічними ознаками як між собою, так і в порівнянні зі штамом, від якого вони виникли.

ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ *PENIOPHORA GIGANTEA*

Вплив температури на ріст та інтенсивність споруляції штамів *P. gigantea*. З'ясовано, що досліджені штами *P. gigantea* є мезофілами, тому що ріст і вегетативна споруляція спостерігалися в діапазоні температур $16-32^{\circ}\text{C}$ (виняток складав штам M-1-98, у якого мінімальна температура росту була 7°C) з оптимумом $24-30^{\circ}\text{C}$. Вегетативний міцелій дослідного гриба мав дуже високу стійкість до дії різних несприятливих температурних факторів, проте краще зберігався в життєдіяльному стані при впливі екстремальних низьких температур (до -30°C), ніж високих (підвищена температура, від 42°C і вище, чинила летальний вплив на грибницю).

Вплив кислотності середовища на ріст і артроконідіогенез штамів *P. gigantea*. Встановлено, що кардинальні значення рН для накопичення біомаси міцелію й артроконідіогенезу штамів *P. gigantea* залежать від складу живильного середовища і знаходяться в межах рН 2,6-9,4. Оптимальні значення концентрації іонів водню для росту (рН 4,6-5,4) й споруотворюючої активності (рН 3,8-4,6) не збігаються, тому доцільно використовувати комбінований кислотний режим культивування гриба: спочатку підтримувати кислотність, яка сприяє активному росту міцелію, а потім – інтенсивному артроконідіогенезу.

Вплив різних ділянок спектру світла, інтенсивності освітленості й фотоперіоду на ріст і споруотворюючу активність штамів *P. gigantea*. Виявлено, що швидкість лінійного росту міцелію досліджених штамів *P. gigantea* не залежала від якісного складу світла, проте інтенсивність артроконідіогенезу під час освітлення культур фіолетовим ($\lambda = 420$ нм) і синім ($\lambda = 481,5$ нм) світлом перевищувала темновий контроль у 2,2-2,5 рази. В синьо-фіолетовій області спектру фізіологічно активними виявилися довжини хвиль 422 нм і 622 нм. Локалізація максимумів у спектру поглинання витяжок міцелію штамів *P. gigantea* в органічних розчинниках дозволило нам висловити припущення про те, що пігмент-сенсibilізатор фотостимуляції споруляції гриба відноситься до каротиноїдної природи, зокрема, за спектром поглинання наближається до флавохрому. Встановлено, що оптимальними умовами для росту міцелію є освітленість – 220-320 лк, фотоперіод – 12-18 год; для інтенсивного артроконідіогенезу гриб потребує більшу освітленість (320-920 лк) з фотоперіодом 18-24 год. Виявлено стимулюючу дію двофазового періоду культивування на споруотворюючу активність *P. gigantea*: 5-добове вирощування гриба в темряві при температурі 24-28⁰С і, відповідно, 5-добове вирощування гриба на видимому світлі при температурі 24-26⁰С і освітленості не менше 400 лк збільшувало інтенсивність споруляції на 37-46% щодо темного контролю й на 11-23% – щодо світлового. Всі досліджені штами *P. gigantea* мали майже ідентичний характер залежності від впливу світлового фактору.

ФІЗІОЛОГІЯ ЖИВЛЕННЯ *PENIOPHORA GIGANTEA*

Вплив різних джерел вуглецевого живлення на ріст і артроконідіогенез штамів *P. gigantea*. Встановлено, що штами *P. gigantea* проявили достатньо високий ступінь фізіологічної однорідності в особливостях вуглецевого живлення. Ріст міцелію і споруотворююча активність гриба спостерігалися на всіх досліджених речовинах, що містили вуглець, проте найбільш сприятливими для *P. gigantea* були арабіноза, глюкоза, галактоза й целюлоза.

Вплив різних джерел азотного живлення на ріст і артроконідіогенез штамів *P. gigantea*. Вивчено споживання *P. gigantea* 11 різних органічних і мінеральних джерел азотного живлення. Найбільшу живильну цінність для гриба мали органічні сполуки азоту у формі пептону. З мінеральних сполук у більшому ступені стимулювали ріст та інтенсивність артроконідіогенезу солі

амонію. Проте досліджені штами по-різному ставились до солей амонію: штам Р-1-96 краще утилізував амоній азотнокислий; штам Д-1-85 – амоній сірчанокислий і амоній фосфорнокислий однозамінний; штам Р-2-97 – амоній фосфорнокислий однозамінний. Ця обставина свідчить про те, що під час добору оптимальних інгредієнтів живильного середовища необхідно враховувати фізіологічну різноякісність штамів *P. gigantea*.

Вплив різних співвідношень вуглецю і азоту на ріст і споруутворюючу активність штамів *P. gigantea*. З метою пошуку оптимальних співвідношень вуглецю і азоту в живильному середовищі для культивування *P. gigantea* був проведений повний факторний експеримент 3^2 (ПФЕ- 3^2). За результатами дослідження були складені рівняння регресії, відповідно до яких побудовані поверхні функцій відгуків виходу біомаси міцелію і споруутворюючої активності *P. gigantea* до зміни концентрації глюкози і пептону в живильному середовищі. Аналіз поверхонь відгуків показав, що найбільше накопичення біомаси міцелію й інтенсивний артроконідіогенез у штамів *P. gigantea* спостерігалися на живильному середовищі, де співвідношення вуглецю й азоту складало приблизно 7:1.

Добір природних субстратів для вирощування *P. gigantea* в поверхневій культурі. Виявлено, що ріст гриба може відбуватися на всіх досліджених природних субстратах з відходів промислового і сільськогосподарського виробництва, дешевих і доступних у Донецькому регіоні, проте склад живильного середовища істотно впливав на морфологічні ознаки колоній *P. gigantea*, а також на швидкість росту міцелію й інтенсивність артроконідіогенезу. Найбільш придатними для культивування гриба визнані середовища з полови і соняшникового лушпиння, на яких споруутворююча активність була на 70-98% вище в порівнянні з сусло-агаровим середовищем. З комбінованих субстратів максимальну продуктивність утворення оїдій забезпечувало живильне середовище наступного складу (мас. %): половина – 13,3; пшеничні висівки – 6,7; вода – 80, на якому інтенсивність споруляції складала $56,5 \pm 1,7$ млн оїдій на 1 мл спорової суспензії.

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ *PENIOPHORA GIGANTEA*

Дегідрогеназна активність штамів *P. gigantea*. Окислювання органічних речовин у *P. gigantea* здійснюється при участі численних дегідрогеназ, проте рівень дегідрування різних органічних сполук неоднаковий. Найбільша дегідрогеназна активність у досліджених штамів була встановлена під час використання в якості субстрату окислювання яблучної кислоти (кількість відновленого трифенілтетразолія хлористого за 1 год на 1 г сирого міцелію в період досягнення максимуму активності ензиму варіювала від $1964,5 \pm 12,8$ до $3242,4 \pm 21,4$ мкг). Активність ферменту на інших субстратах окислювання (бурштиновій, лимонній, глутаміновій кислотах) була дещо нижчою. Характерною рисою досліджених дегідрогеназ *P. gigantea* було те, що всі вони досягали

максимальних значень у період інтенсивного росту гриба, коли спостерігався максимум біосинтезу білку. При подальшому рості міцелію дегідрогеназна активність знижувалася, і в 30-добовій культурі досягала мінімальних величин малатдегідрогеназа й глутаматдегідрогеназа, у той час як активність цитратдегідрогенази й сукцинатдегідрогенази була відсутня в 25- і 30-добовому міцелії. Виявлена значна мінливість середньої активності дегідрогеназ у вегетативному міцелії штамів *P. gigantea*, що свідчить про наявність високої лабільності обмінних процесів у дослідного гриба, яка забезпечує йому виживання у відповідних умовах середовища, до яких адаптується організм.

Порівняльна активність ферментів штамів *P. gigantea*, які приймають участь у біодеструкції деревного субстрату. Встановлено, що *P. gigantea* має активні ферментні системи, які беруть участь у деградації таких складних полімерів, як целюлоза, лігнін і пектинові речовини. Однак середня активність як целюлозолітичних і пектолітичних ферментів, так і окисно-відновних ферментів, які приймають участь у розкладанні лігніну, була гетерогенною у штамів *P. gigantea*. Проте досліджені штами були подібними між собою за динамікою активності цих ензимів. Біосинтез ферментів целюлазного комплексу й пектиназ спостерігався вже на п'яту добу культивування. Максимальних значень досягала активність С₁- і С₂-целюлази через 15 діб, активність енд-1,4-β-глюканази і целобіогідролази – через 20 діб, активність β-глюкозидази – через 30 діб. Неоднорідність динаміки активності ферментів целюлазного комплексу пов'язана, очевидно, із різною функціональністю цих ферментів. Пектолітичні ферменти (пектинестераза й екзополігалактуроназа), на відміну від ферментів целюлазного комплексу, досягали максимальних значень значно раніш, і після 10-ї доби, коли спостерігався активний синтез целюлозолітичних ферментів, активність пектиназ знижувалася. Для досліджених оксидоредуктаз відмічено два піки активності. Максимальних значень активності в культуральних фільтратах штамів *P. gigantea* пероксидаза досягала на 5-у добу, поліфенолоксидаза – на 25-у добу культивування гриба.

Гетерогенність водорозчинних білків у міцелії штамів *P. gigantea*. Аналіз електрофореграм водорозчинних білків дозволив встановити достатньо високу подібність між штамами *P. gigantea* (S=74-92%). Зі збільшенням віку міцелію відбувалася кількісна і якісна зміна білкового спектру (подібність водорозчинних білків за електрофоретичною рухливістю між 15- і 30-добовим міцелієм складала приблизно 33-48%), що, очевидно, пов'язано з тим, що спрямованість обміну речовин у грибному організмі контролюється віком культури. Це припущення підтверджується дослідями з вивчення динаміки вмісту водорозчинних білків у вегетативному міцелії *P. gigantea*. Виявлено, що максимальне накопичення водорозчинних білків відбувалося на 5-у добу росту досліджених штамів, потім їх вміст знижувався, залишаючись статистично незмінним на 15-20-у добу, а в 30-добовому міцелії цей показник досягав мінімальних значень. Вміст білку в міцелії культур *P. gigantea* значно варіював, що вказує на різну швидкість протікання процесів метаболізму в

їх організмі, від чого, мабуть, і залежить фізіолого-біохімічна різноякісність одержаних штамів гриба.

Дереворуйнівна активність моноартроконідіальних культур штаму P-1-96. З'ясовано, що за показником втрати сухої речовини моноартроконідіальні культури і материнський штам P-1-96 можна віднести до активних редуцентів деревини. Через 120 діб росту міцелію втрати сухої речовини склали 17,3-32,5%. У цей період моноартроконідіальні культури і вихідний штам *P. gigantea* P-1-96 стабільно розкладали як целюлозу, так і лігнін. Проте спостерігалася незначна перевага (в 1,1-1,4 рази) в розкладанні целюлозного компоненту деревини *P. sylvestris*, ніж лігнінового. За дереворуйнівною активністю моноартроконідіальні культури істотно різнилися як між собою, так і в порівнянні з вихідним штамом P-1-96 (рис. 2).



Рис. 2. Дереворуйнівна активність моноартроконідіальних культур штаму *P. gigantea* P-1-96

ВИВЧЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОГО ВПЛИВУ *PENIOPHORA GIGANTEA* НА *HETEROBASIDION ANNOSUM* IN VITRO ТА IN VIVO

Характеристика взаємовідносин штамів *P. gigantea* і *H. annosum* на сусло-агаровому середовищі та природних субстратах. Результати досліджень показали, що під час культивування *P. gigantea* і *H. annosum* у змішаній культурі на сусло-агаровому середовищі й природних субстратах (лісовій підстилці й зразках деревини *P. sylvestris*) однобічний і взаємний вплив грибів один на одного відбувався задовго до зустрічі їх колоній. Явна антагоністична активність досліджених штамів *P. gigantea* просліджувалася під час наростання антагоніста на протикультури, що призводило до лізису міцелію патогена в результаті “інтерференції гіф”, і *H. annosum* цілком припиняв свою життєдіяльність. Виявлено, що штами *P. gigantea* за ступенем антагоністичної активності, а ізоляти *H. annosum* за ступенем стійкості до антагоніста характеризувалися поліморфізмом (рис. 3). Висловлено припущення, що поліморфізм антагоністичної дії досліджених штамів *P. gigantea* знаходиться в прямій залежності від неоднорідності їх фізіолого-біохімічних особливос-

тей, тому що була виявлена позитивна кореляція між антагоністичною активністю штамів гриба-антагоніста та їх середніми значеннями швидкості росту міцелію, активності целюлозолітичних ферментів, вмісту водорозчинних білків у вегетативному міцелії і дереворуйнівної активності.

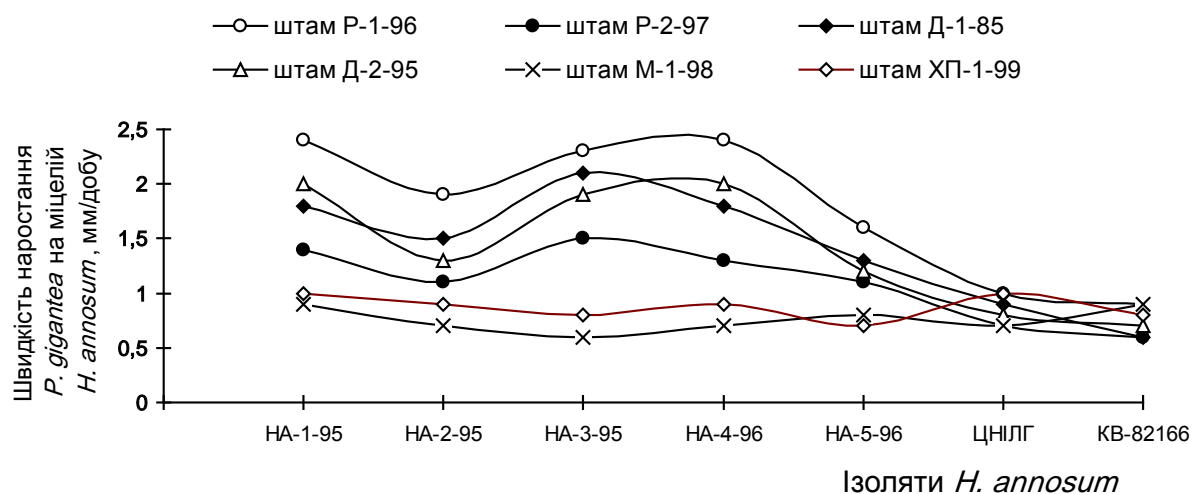


Рис. 3. Антагоністична активність штамів *P. gigantea* на сусло-агаровому середовищі

Антагоністична активність моноартроконідиальних культур штаму *P. gigantea* P-1-96. Встановлено, що всі досліджені моноартроконідиальні культури проявили антагоністичну дію щодо ізолятів *H. annosum*, однак за ступенем антагоністичної активності (АА) вони були віднесені нами до трьох груп: із підвищеною АА (30%), середньою АА (40%) і низькою АА (30%) (рис. 4). Множинний кореляційний аналіз дозволив виявити достовірну залежність АА (x) моноартроконідиальних культур від їх дереворуйнівної активності (y) й накопичення біомаси міцелію (z) ($r_{xyz}=0,58$). Розглянута можливість використання одержаних культур для селекції штамів *P. gigantea* із підвищеною АА.

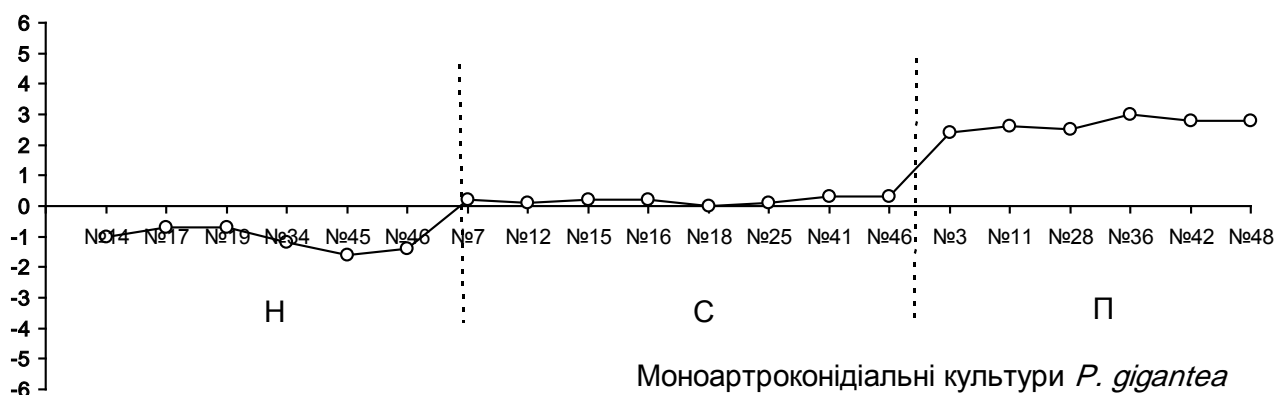


Рис. 4. Відхилення середніх значень антагоністичної активності (АА) моноартроконідиальних культур *P. gigantea* від середнього значення АА материнського штаму Р-1-96:

Н – моноартроконідіальні культури з низькою АА; С – моноартроконідіальні культури з середньою АА; П – моноартроконідіальні культури з підвищеною АА

Вплив метаболітів *P. gigantea* на ріст ізолятів *H. annosum* і проростків *P. sylvestris*. Виявлено, що антагоністична дія *P. gigantea* щодо *H. annosum* здійснюється через конкурентні трофічні зв'язки й метаболіти. Культуральні фільтрати і водні екстракти міцелію, що містили продукти життєдіяльності штамів *P. gigantea*, достовірно знижували накопичення біомаси міцелію всіх досліджених ізолятів *H. annosum* на 45-62 % в порівнянні з контролем. Екзометаболіти антагоніста були більш термостабільними й токсичними для патогена, ніж ендометаболіти. Активна секреція цих метаболітів спостерігалася під час безпосереднього контакту гіф *P. gigantea* і *H. annosum*. Дослідження хімічної природи екзометаболітів антагоніста, які чинили інгібуючу дію на ріст *H. annosum*, дозволили виявити антибіотичну активність культуральних фільтратів штамів *P. gigantea*. Біоавтографічний прояв хроматограм, де в якості тест-мікроба застосовували *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, показав, що антибіотичні речовини, синтезовані *P. gigantea*, за характером своєї дії близькі до гліотоксину. Антагоністична дія дослідного гриба значною мірою пов'язана й з екзоферментами. Так, особливої уваги заслуговує глюкозооксидазна активність, що вносить певний внесок у прояв антагонізму. Перекис водню, який утворювався під впливом глюкозооксидази *P. gigantea*, інгібував ріст *H. annosum*. В КФ штамів *P. gigantea* виявлено наявність щавлевої кислоти, яка в підхожих умовах також значно гальмувала швидкість росту патогена. Перелік екзометаболітів антагоніста, які пригнічують життєдіяльність *H. annosum*, не обмежується перерахованими групами з'єднань, тому необхідно продовжити їх пошук. Ці продукти обміну речовин *P. gigantea* можуть знайти практичне застосування в біологічній боротьбі з патогеном.

З'ясовано, що екзометаболіти штамів *P. gigantea*, які стримували ріст *H. annosum*, не були фітотоксичними для проростків *P. sylvestris*. Енергія проростання й схожість насіння сосни при замочуванні їх у КФ штамів *P. gigantea* достовірно не відрізнялися від контролю, проте 15- і 30-добові КФ штамів антагоніста в концентрації 5% збільшували загальну довжину проростків щодо контролю на 5-11%.

Вплив *P. gigantea* на ступінь усихання й пероксидазну активність проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*, інфікованих *H. annosum*. Під час сумісного інфікування проростків сосни *H. annosum* і *P. gigantea* в 1,2-6,8 рази знижувався процент їх усихання в порівнянні з інфікуванням проростків лише *H. annosum* (рис. 5). Найменш ефективною виявилася антагоністична дія дослідного гриба до ізоляту *H. annosum* KB-82166.

У відповідній реакції проростків сосни на грибну інфекцію велику роль відіграють окисно-відновні ферменти, зокрема, пероксидаза (Серова, Подчуфаєва, Гесь, 1982). Нами встановлено, що на більш пізніх стадіях інфекції пероксидаза втрачала здатність функціонувати як каталізатор, тому що всі досліджені ізоляти *H. annosum* достовірно знижували в 1,3-1,6 рази в порівнянні з ко-

нтролем активність пероксидази 14-добових інфікованих проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana*. Під час інгібування патогенності *H. annosum* антагоністом пероксидаза продовжувала регулювати процеси дезотоксикації чужорідних з'єднань, тобто активність ферменту проростків сосни на 14-у добу після сумісного їх інфікування *H. annosum* і *P. gigantea* не знижувалася щодо контролю, а залишалася на рівні 7-добових інфікованих проростків. Отже, *P. gigantea* може приймати активну участь у системі біологічного захисту молодих насаджень *P. sylvestris* і *P. pallasiana* від пошкодження патогеном.

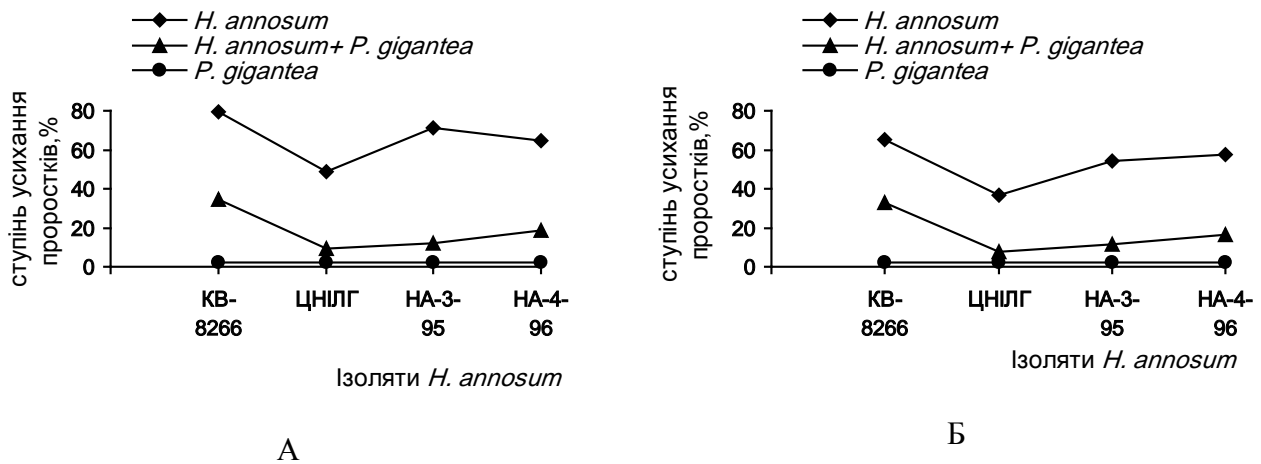


Рис. 5. Ступінь усихання проростків *P. sylvestris* (А) і *P. pallasiana* (Б) під час сумісного й окремого їх інфікування штамом *P. gigantea* P-1-96 та ізолятами *H. annosum*

Антагоністична активність *P. gigantea* щодо *H. annosum* у відкритих штучних екосистемах. Нами разом з к.б.н. Л.П. Фільчаковим був розроблений лабораторний регламент одержання біопрепарату “Пеніофорін”, основу якого складала спорова суспензія селектованих штамів *P. gigantea* Д-1-85 і P-1-96. Під час польових досліджень ефективності застосування біопрепарату для біологічної боротьби з *H. annosum* в південно-східній частині України були одержані позитивні результати (рис. 6). Пні, оброблені споровою суспензією *P. gigantea*, ставали практично недоступними для поселення *H. annosum*. Через рік після інокуляції гриба спостерігалася поява на пнях численних плодових тіл і поширення тяжів міцелію всередину деревини пнів і коренів. Це свідчить про можливість природного поширення *P. gigantea* від місць інокуляції на інші деревні субстрати, що значно полегшує і прискорює створення в соснових насадженнях високого інфекційного фону антагоніста.

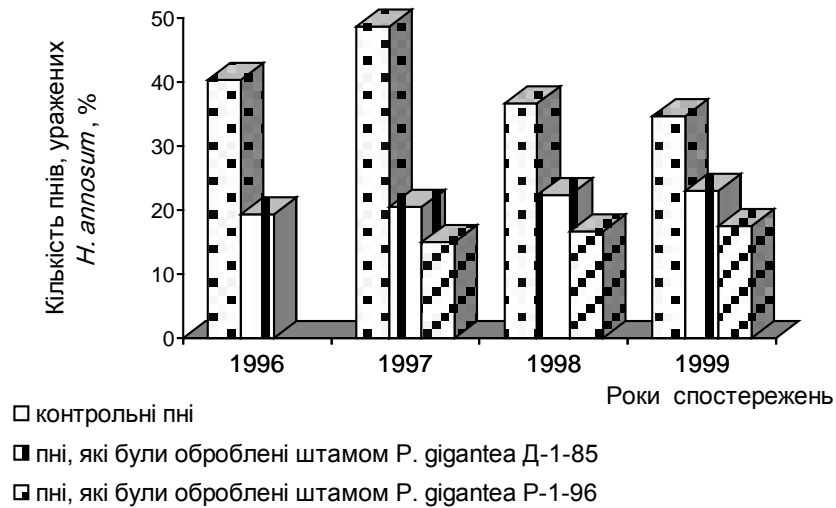


Рис. 6. Ефективність біозахисту пнів *P. sylvestris* від природної інфекції *H. annosum*

ВИСНОВКИ

З плодових тіл *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass., що зростали в різних еколого-географічних умовах, ізольовані чисті культури, які мають виражену антагоністичну дію щодо *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Порівняльне дослідження культурально-морфологічних, екологічних, фізіолого-біохімічних і антагоністичних особливостей одержаних штамів дозволило виявити внутрішньовидову неоднорідність *P. gigantea* і встановити механізм антагоністичної дії цього гриба на *H. annosum*.

2. Відзначено, що морфологічні ознаки гіфальної системи, швидкість росту й інтенсивність артроконідіогенезу залежать від індивідуальних особливостей штамів *P. gigantea*. Широкий діапазон мінливості культурально-морфологічних ознак, дереворуйнівної і антагоністичної активності встановлений і для одержаних моноартроконідіальних культур штаму *P. gigantea* Р-1-96. Виявлено позитивну кореляцію між середніми значеннями швидкості росту штамів *P. gigantea* і їх антагоністичною активністю.

3. Підібрано придатні для культивування вегетативного міцелію *P. gigantea* лабораторні середовища і живильні субстрати з відходів сільськогосподарського виробництва. Розроблено оригінальне комбіноване середовище (мас. %): полова – 13,3; пшеничні висівки – 6,7; вода – 80, що забезпечує хороший ріст і інтенсивний артроконідіогенез гриба в штучних умовах.

4. Встановлено, що оптимальними умовами для росту культур *P. gigantea in vitro* є температура $-24-30^{\circ}\text{C}$, рН середовища – 4,6-5,4, освітленість – 220-320 лк, фотоперіод – 12-18 год. При цьому виявлено, що для інтенсивного артроконідіогенезу потрібно більш низьке значення рН живильних середовищ (3,8-4,6) і більш висока освітленість (320-920 лк) із фотоперіодом 18-24 ч. Доведено, що спороутворюючу активність *P. gigantea* стимулює синьо-фіолетова частина спектру, а фізіологічно активними є довжини хвиль 422 і 462 нм. Для збільшення інтенсивності споруляції

рекомендовано двофазовий період культивування з чергуванням темного (5 діб) і світлового (5 діб) етапів.

5. З'ясовано, що склад субстрату істотно впливає на активність росту й артроконідіогенез *P. gigantea*. З досліджених джерел вуглецевого й азотного живлення найбільш сприятливими для росту культур *P. gigantea* є целюлоза і пептон, для артроконідіогенезу – арабіноза, целюлоза, глюкоза, галактоза і пептон при оптимальному співвідношенні вуглецю й азоту в живильному середовищі 7:1.

6. Доведено, що дослідженим штамам *P. gigantea* властивий поліморфізм щодо прояву сукцинат-, малат-, глютамат- і цитратдегідрогеназної активності. Максимум активності дегідрогеназ у вегетативному міцелії спостерігається в період інтенсивного росту гриба. Одним із кращих субстратів дегідрування в штамів *P. gigantea* є яблучна кислота.

7. Встановлено, що при наявності в живильному середовищі целюлози штами *P. gigantea* спроможні синтезувати целюлозолітичні ферменти (C_1 - і C_2 -целюлазу, ендо-1,4- β -глюканазу, целобіогідролазу і β -глюкозидазу), пектолітичні ферменти (пектинестеразу і екзополігалактуроназу) і оксидоредуктази (пероксидазу і поліфенолоксидазу). Досліджені штами *P. gigantea* подібні між собою за динамікою активності цих ферментів. Виявлено позитивну кореляцію між активністю целюлозолітичних ферментів штамів *P. gigantea* і їх дереворуйнівною і антагоністичною активністю.

8. Водорозчинні білки в міцелії різних штамів *P. gigantea* за електрофоретичною рухливістю мають подібність на 73,52-94,29%. У ході індивідуального розвитку культур *P. gigantea* спостерігається кількісна і якісна зміна білкових компонентів. Найбільш високий вміст водорозчинних протеїнів у міцелії *P. gigantea* визначений в експоненціальній фазі росту. Виявлено позитивну кореляцію між антагоністичною активністю штамів *P. gigantea* і середніми значеннями вмісту водорозчинних білків у міцелії гриба.

9. З'ясовано, що антагоністична дія *P. gigantea* щодо *H. annosum* виявляється через конкурентні трофічні зв'язки і метаболіти, причому екзометаболіти є більш токсичними, ніж ендометаболіти. В культуральних фільтратах штамів *P. gigantea* поряд із щавлевою кислотою і глюкозооксидазою виявлені речовини, які за характером дії близькі до гліотоксину й інгібують ріст патогена.

10. Показано, що штами *P. gigantea* в 1,8-6,8 рази знижують ступінь усихання проростків *Pinus sylvestris* L. і *Pinus pallasiana* D. Don., інфікованих *H. annosum*. В присутності *P. gigantea* збільшується стійкість проростків сосни до патогенної дії *H. annosum*, що виявляється в збільшенні активності пероксидази проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana* на пізніх стадіях інфекції, у той час як ізоляти *H. annosum* викликають різке зниження активності пероксидази проростків сосни. Екзометаболіти штамів *P. gigantea*, на відміну від *H. annosum*, не чинять фітотоксичної дії на проростання насіння і ріст проростків *P. sylvestris*.

11. Селектовано штам *P. gigantea* P-1-96, який має високу швидкість росту й антагоністичну активність щодо *H. annosum*. Базуючись на результатах дослідження, розроблено лабораторний регламент одержання біопрепарату “Пеніофорін” і складено інструкцію з його застосування. Польові дослідження продемонстрували високу ефективність використання цього біопрепарату для біологічної боротьби з *H. annosum* у південно-східній частині України: у відкритих штучних екосистемах “Пеніофорін” знижував заселеність пнів патогеном на 45-67% і запобігав подальшому поширенню інфекції.

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Демченко С.И. Влияние условий освещения на процессы роста и споруляции пениофоры гигантской // Вопросы биоиндикации и экологии. – Запорожье: Изд-во Запорожск. ун-та. – 1997. – Вып. 2. – С. 36-42.

2. Демченко С.И. Оптимізація умов культивування *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. (*Corticaceae*) // Укр. бот. журн. – 1999. – Т. 56, № 2. – С. 192-197.

3. Демченко С. И. Характер взаимоотношений пениофоры гигантской и корневой губки на искусственных и естественных средах // Вісник проблем біології і медицини. – 1999. – Вип. 2. – 76-81.

4. Демченко С.И. Использование *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. для биологической борьбы с возбудителем корневой гнили хвойных насаждений // Экологическая и техногенная безопасность. – Харьков: ХИСП. – 2000. – С. 216-221.

5. Демченко С.И. Влияние экзо- и эндометаболитов штаммов *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. на рост фитопатогенного гриба *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Збірник наук. праць Луганського держ. аграрн. ун-ту. – Луганськ: Вид-во ЛДАУ. – 2001. – № 9 (21). – С. 78-83.

6. Демченко С.И., Вовк Н.В. Вплив культуральних виділень *Peniophora gigantea* і *Pleurotus ostreatus* на проростання насіння і ріст проростків *Pinus sylvestris* L // Наук. вісник Нац. аграрн. ун-ту: Лісівництво. – 2000. – Вип. 27. – С. 286-292.

7. Демченко С.И., Макогон И.В. Дегидрогеназная активность штаммов *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. // Ученые записки Таврического нац. ун-та: Серия “Биология”. – 2001. – Т. 14, № 1. – С. 61-64.

8. Демченко С.И., Сухомлин М.Н. Исследование антагонистической активности *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. для использования в биологической борьбе с корневой губкой // Бюллетень Никитского бот. сада. – 2000. – Вып. 76. – С. 52-54.

9. **Негруцький С.Ф.**, Демченко С.І., Бойко М.І. Перспективи використання гриба *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. для біологічної боротьби з кореневою гнилизною хвойних порід // Наук. вісник Нац. аграрн. ун-ту: Лісівництво. – 2000. – Вип. 25. – С. 308-313.

10. Пат. 32942 А України, МКВ А 01N 63/00. Штам соматичних структур макроміцета *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. для біологічної боротьби з кореневою губкою хвойних порід: Пат. 32942 А України, МКВ А 01N 63/00. / М.І. Бойко, С.І. Демченко, О.В. Федотов, М.М. Сухомлин (Україна). – № 98084370; Заявл. 11.08.98; Опубл. 16.02.2001, Бюл. № 1. – 2 с.

11. Демченко С.І. Влияние температуры на рост и вегетативную репродуктивность пениофоры гигантской // Тези Міжн. конф. “Питання біоіндикації і екології”. – Запоріжжя, 1998. – С. 90.

12. Демченко С.І. Влияние культуральных выделений корневой губки на рост и вегетативную репродуктивность пениофоры гигантской // Матер. 1-й Межд. конф. “Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных соединений и пищевых продуктов”. – Донецк, 1997. – С. 49-51.

13. Демченко С.І., Макогон І.В. Влияние различных источников азотного питания на рост и артроконидиогенез *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. – природного антагониста *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Праці наук. конф. Дон. нац. ун-ту за підсумками наук.-досл. роботи за період 1999-2000 р.р.: Секція біол. наук. – Донецьк, 2001. – С. 115-117.

14. Демченко С.І., Морозова Н.М. Вплив *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. на ступінь усихання й пероксидазну активність проростків *Pinus sylvestris* L. та *Pinus pallasiana* D. Don., інфікованих *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Тези міжн. конф. “Проблеми сучасної екології”. – Запоріжжя, 2000. – С. 98.

Демченко Світлана Іванівна. Біологічні особливості гриба *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass.– природного антагоніста *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.21 – мікологія. – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, Київ, 2001.

Дисертація присвячена вивченню біологічних особливостей різних штамів *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. У роботі розглянуто міжштамову специфічність *P. gigantea* за культурально-морфологічними, екологічними, фізіолого-біохімічними і антагоністичними особливостями. Вивчено механізм антагоністичної дії *P. gigantea* щодо *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., який викликає кореневу гниль хвойних деревних рослин. Встановлено хімічну природу екзометаболітів *P. gigantea*, що інгібують ріст патогена. Оптимізовано світловий, кислотний і температурний ре-

жим культивування *P. gigantea in vitro*. Підібрані лабораторні середовища й поживні субстрати з відходів сільськогосподарського виробництва, які забезпечують хороший ріст і інтенсивний артроконідиогенез *P. gigantea*. Вперше виявлено мінливість моноартроконідіальних культур *P. gigantea* за культурально-морфологічними ознаками, антагоністичною і дереворуйнівною активністю та показано перспективність їх використання в селекції штамів *P. gigantea* з підвищеною антагоністичною активністю. Розроблено лабораторний регламент одержання біопрепарату “Пеніофорін” і досліджено ефективність його застосування для біологічного контролю за *H. annosum* у південно-східній частині України.

Ключові слова: *гриб-антагоніст, патогенний гриб, штами, моноартроконідіальні культури, метаболіти, біологічний метод, антагоністична активність.*

Демченко Светлана Ивановна. Биологические особенности гриба *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass. – природного антагониста *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.21 – микология. – Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев, 2001.

Диссертация посвящена изучению биологических особенностей штаммов *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass., изолированных из грибов, произрастающих в одинаковых и разных экологических условиях. Обнаружена внутривидовая неоднородность *P. gigantea* в вегетативной стадии роста, о чем свидетельствует большой диапазон изменчивости у исследуемых штаммов морфологических признаков гифальной системы, скорости роста мицелия, интенсивности артроконидиогенеза, дереворазрушающей и антагонистической активности, количественного и качественного содержания водорастворимых белков в мицелии, активности дегидрогеназ и ферментов, принимающих участие в биодеструкции различных компонентов древесины. Установлено, что *P. gigantea* является мезофилом (рост и артроконидиогенез возможен в диапазоне температур от 7⁰ до 32⁰С с оптимумом 24-30⁰С), при этом вегетативный мицелий гриба способен удовлетворительно переносить высокие и низкие экстремальные температуры. Выяснено, что оптимальные значения кислотности сред для накопления биомассы мицелия (рН 4,6-5,4) и спорообразовательной активности (рН 3,8-4,6) исследуемых штаммов не совпадают. Оптимизирован световой режим культивирования *P. gigantea*. Доказано, что сине-фиолетовая область спектра света стимулирует интенсивность споруляции гриба, причем физиологически активными выявлены длины волн 422 и 462 нм. Подобраны лабораторные среды и питательные субстраты из отходов сельскохозяйственного производства, обеспечивающие хороший рост и интенсивный артроконидиогенез *P. gigantea*. Разработана комбинированная питательная среда (мас.%): полова – 13,3; пшеничные отруби – 6,7;

вода – 80., на которой интенсивность споруляции составляла $56,5 \pm 1,7$ млн оидий на 1 мл споровой суспензии. С помощью метода математического планирования установлено оптимальное соотношение источников углерода и азота в питательной среде для культивирования *P. gigantea in vitro*. Выявлено, что антагонистическое действие *P. gigantea* по отношению к *H. annosum* осуществляется через конкурентные трофические связи и метаболиты, причем культуральные фильтраты штаммов антагониста обладают большей антифунгальной активностью, чем водные экстракты мицелия. Впервые обнаружено, что продукты обмена веществ патогена стимулируют секрецию метаболитов *P. gigantea*, ингибирующих рост *H. annosum*. В культуральных фильтратах штаммов антагониста обнаружены вещества, которые по характеру действия близки к глиотоксину, а также щавелевая кислота, глюкозооксидаза и целлюлозолитические ферменты, угнетающие жизнедеятельность патогенного гриба. В присутствии *P. gigantea* в 1,6-6,8 раза снижается процент усыхания проростков *Pinus sylvestris* L и *Pinus pallasiana* D.Don., инфицированных *H. annosum*. Установлена достоверная зависимость антагонистической активности исследуемых штаммов *P. gigantea* от их скорости роста мицелия, активности целлюлозолитических ферментов, содержания водорастворимых белков в вегетативном мицелии и дереворазрушающей активности. Выявлено, что экзометаболиты штаммов *P. gigantea* не оказывают фитотоксического действия на прорастание семян и рост проростков сосны обыкновенной. У моноартроконициальных культур *P. gigantea* впервые обнаружена вариабельность культурально-морфологических признаков, антагонистической и дереворазрушающей активности, а также показана перспективность их использования для селекции штаммов *P. gigantea* с повышенной антагонистической активностью. Разработан лабораторный регламент получения биопрепарата “Пениофорин” и исследована эффективность его использования для биологической борьбы с *H. annosum* в юго-восточной части Украины.

Ключевые слова: *гриб-антагонист, патогенный гриб, штаммы, моноартроконициальные культуры, метаболиты, биологический метод, антагонистическая активность.*

Demchenko S.I. The biological features of a fungus *Peniophora gigantea* (Fr). Mass.– natural antagonist of *Heterobasidion annosum* (Fr). Bref. – Manuscript.

The thesis for a candidate's degree by speciality 03.00.21 – mycology. – M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, 2001.

The thesis is devoted to study of biological features of various *Peniophora gigantea* (Fr). Mass. strains. The interstrain specificity of *P. gigantea* on cultural-morphological, ecological, physiological, biochemical and antagonistic properties is considered in the present work. The mechanism of antagonistic action of *P. gigantea* to *Heterobasidion annosum* (Fr). Bref., which causes root rot of coniferous trees is investigated. There have been established the chemical nature of *P. gigantea* exometabolites which brake

the growth of pathogenic fungus. The light, acid and temperature modes of cultivation of *P. gigantea in vitro* are optimized. The laboratory media and nutritious substrates from waster of agricultural, which provide good growth and intensive arthroconidiogenesis of *P. gigantea* are picked up. The variability of *P. gigantea* monoarthroconidial cultures on cultural-morphological features, antagonistic and wood-attacking activity is considered for the first time. The prospect of their use in selection of *P. gigantea* strains with the increased antagonistic activity is shown. The laboratory rules of reception of a biopreparation “Peniophorin” are developed. The efficiency of its application as the biological control for *H. annosum* in a southeast part of Ukraine is investigated.

Key words: *antagonistic fungus, pathogenic fungus, strains, monoarthroconidial cultures, metabo-lites, biological method, antagonistic activity.*