

Посіви бука на лісокультурних площах повністю знищуються або дуже пошкоджуються мишовидними гризунами, популяції яких збільшуються в лісі в урожайні для бука роки. Без ефективних заходів боротьби з цими шкідниками посіви культур бука дуже ризиковані.

Найбільш продуктивними і біологічно стійкими у Карпатах є мішані за складом деревних порід насадження бука за участю природних супутніх лісоутворювачів, перелік і кількісне співвідношення яких характерні для конкретних висотно-екологічних умов і відповідають корінним деревостанам. Для підвищення стійкості насаджень і конкурентоздатності вирощуваних порід їх розміщують кулісами, кулісно-ланковим способом або біогрупами розміром не менше 5×5 м.

Належне обґрунтування способів і технології сезонного зберігання горішків бука, вирощування садивного матеріалу та створення культур, перевірка наукових розробок у практиці лісового господарства Карпат забезпечили основи штучного вирощування букових насаджень у виробничих масштабах.

Література

1. Бочковский В.П. Искусственное выращивание бука в условиях Карпат// Лесное хозяйство, 1955, № 1.
2. Гаврусевич А.М. Штучне відновлення бука лісового в Українських Карпатах// VI Симпозіум JUFRO з проблем бука. Тези доповідей. – Львів, 1995. – 38 с.
3. Корпель Ш., Матіч С. Лісові культури бука в Центральній та Східній Європі// VI Симпозіум JUFRO з проблем бука. Тези доповідей. – Львів, 1995. – С. 42-43.
4. Молотков П.И. Естественное и искусственное возобновление буковых лесов Карпат// Расширенная сессия ученого совета УкрНИИЛХА. Тезисы докладов. – Харьков, 1958. – С. 7-8.
5. Молотков П.И., Гаврусевич А.М. Ріст і розвиток сіянців бука лісового при різному світловому режимі// Вісник сільськогосподарської науки. 1960, № 11. – С. 90-95.
6. Молотков П.И. Естественное возобновление и рубки в буковых лесах// Естественное возобновление лесов. – Ужгород; Карпаты, 1971. – С. 67-91.
7. Третяк Ю.Д. Поновлення бука і його супутників природним шляхом та культурами. – Львів: Лісотехнічний ін-т, 1958. – 19 с.
8. Швиденко А.Й. Культура бука в Черновицкой области. – Ужгород: Карпаты, 1964. – 21 с.
9. Крокер В., Бартон Л. Физиология семян. – М.: Изд-во ин. лит-ры, 1955. – 399 с.
10. Болеслав Сушка, Клаудіне Муллер Марк Боннет-Масім Берт. Nasiona lesnych dzwew lisciastych od zbioru do siewu. – Warszawa-Poznań: Wydawnictwo naukowe PWN, 1994. – 299 с.

УДК 630*165.3:630*64: 630*12

Асист. Р.М. Гречаник, канд. с.-г. наук;

асист. О.Ф. Базюк; аспір. З.Д. Бондаренко – УкрДЛТУ;

технолог Л.В. Федяй – приватне біотехнічне підприємство "Поплета"

ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ ГІБРИДУ ОСИКИ І ТОПОЛІ ЧОРНОЇ ТА МІКОРИЗАЦІЇ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ

З огляду на те, що осика формує ектомікоризний тип симбіозу, для проведення експериментів ми зупинились на свинушці тонкій – *Paxillus involutus* (Batsch. Fr.). Метою було вивчення можливості сумісного культивування мікросаджанців гібридної форми осики в умовах *in vitro* разом з виділеною чистою культурою вищих грибів та вирощування інокулюму даного гриба-симбіонта за методом Marx et al. (1982).

Ризогенез мікроживців гібриду осики проводили на середовищі MSMN, яке попередньо було інокульоване чистою культурою *Paxillus involutus*. Інгібування росту коріння осики як і росту грибниці не відбувалося. Ефективність мікоризації у стерильних умовах була досить високою.

Стерильну культуру *Paxillus involutus* вирощували за температури 25°C протягом 1.5 тижня на модифікованому Melin-Norkrans (MNM) агаризованому середовищі. Міцелярні диски із стандартних чашок Петрі використовували для ініціації масового розмноження інокулюму, який ми вирощували в різноманітних контейнерах на сфагновому моші. Даний інокулюм використовували для інокуляції адаптованих до умов навколишнього середовища саджанців гібриду осики в нестерильних умовах.

Ключові слова: мікориза, мікроклональне розмноження, інокулюм, середовище.

*Assist. R. Grethanik; assist. O. Bazyuk;
doctorate Z. Bondarenko – USUFWT; L. Fedyaj – "Popleta"*

Usage of biotechnological methods at propagation of aspen hybrids and mycorrhizal inoculation of planting material

In view of the fact, that aspen forms ectomycorrhizal type of symbiosis, the object of our researches was *Paxillus involutus* (Batsch. Fr.). We studied the possibility of co-cultivation of micro-seedlings of hybrid aspen at in vitro conditions together with pure culture of higher fungies inoculum production of the given mushroom by Marx et al. (1982) method. Rhizogenesis of microcuttings of hybrid aspen was done on MSMN medium, which was preinoculated by pure *Paxillus involutus* culture. Growth inhibition of aspen roots and of mycelium was not observed. Mycorrhizal inoculation effectiveness was quite high at axenic conditions.

Sterile culture of *Paxillus involutus* grew at 25°C during 1.5 week on modified Melin-Norkrans (MNM) medium. Mycelial disks from Petri dishes were used for initiation of inoculum mass propagation, which was grown at different vegetation containers on peat moss. Given vegetation inoculum was used for mycorrhization of adapted to ex vitro environment conditions hybrid aspen seedlings.

Key words: mycorrhiza, micropagation, inoculum, environment.

Вступ

Мікориза – це симбіоз специфічного ґрунтового гриба з дрібними коренями багатьох лісових дерев та кущів. Гриб-симбіонт слугує продовженням кореневої системи рослини, транспортуючи воду та поживні елементи до коріння. Засвоєння фосфору та азоту є специфічною функцією мікоризного гриба, який віддає дереву ці макроелементи у формі, що є доступною для нього. Взаємно, рослина є первинним джерелом енергії для гриба, надаючи прості цукри та вітаміни, що продукуються у процесі фотосинтезу, переносяться у коріння і у подальшому до симбіонта.

Згідно зі сучасними дослідженнями та класифікаціями щодо мікоризи, то її основні види є такими: екто-, судинно-арбускулярна, ерикоїдна та орхідна мікоризи. Цей розподіл залежить як від залучених організмів, так і від розвитку симбіонтних органів, а також і від їх анатомії та функцій (Carlile M.J., 1994).

Використання специфічних грибів для формування ектомікоризи на саджанцях лісових порід у розсаднику може значно покращити їх ріст та адаптацію після висадки. Древа багатьох видів не будуть нормально рости та розвиватися без них. Зусилля на залісення видами, що потребують ектомікоризи, коли цей тип симбіозу буде відсутнім на лісокультурній площі, як правило, будуть безуспішними. Протягом останніх трьох десятиліть було чіт-

ко проілюстровано значення інокуляції селективними ектомікоризними грибами в умовах лісового розсадника з метою покращення якості заліснення звичайних лісових земель та деградованих територій (Bowen, 1965; Mikola, 1973; Trappe, 1977; Molina and Trappe, 1982; Marx and Cordell, 1988).

У подальших роботах Marx et al. (1982) вперше запропонували спосіб вирощування вегетативного інокулюму *Pisolithus tinctorius* (Pers.) у промислових масштабах та інокуляцію ним саджанців лісових порід, які вирощувались із відкритою кореневою системою у контейнерах.

На сьогодні застосовуються такі методи інокуляції мікоризи:

- інокуляція спорами чи плодовими тілами;
- перемішування тепличного ґрунту з лісовим гумусним покривом (цей метод вважається одним із найефективніших, якщо не брати до уваги затрати на транспортування, але існує досить великий ризик зараження ґрунту);
- інокуляція мікоризним інокулюмом на основі сфагнового моху та вермикуліту в теплицях на розсадниках;
- інокуляція мікросаджанців в умовах *in vitro* чистою міцелярною культурою;
- інокуляція попередньо-інокульованими сіянцями ("чисті" сіянці висаджуються поряд інокульованих);
- інокуляція ендомікоризою за методом INVAM (США);
- метод Dr. Egic Danell (Швеція) для мікоризного симбіозу сосна –лисичка;
- використання "синтетичних" спор (мікориза у формі кульок із захисним покривним шаром), що виробляються у Франції.

Ми проводили дослідження в таких напрямках:

- 1) вивчення можливості сумісного культивування мікросаджанців гібридної форми осики *Populus tremula* x *P. tremuloides* в умовах *in vitro* разом з виділеною чистою культурою вищих грибів;
- 2) вирощування інокулюму за методом Маркса (Marx, 1982), де носієм був сфагновий мох.

1. Матеріали і методи

Експлантанти для ініціації міцелярної культури брались з плодового тіла гриба, у подальшому продезінфікованого (гіпохлорит натрію, 90 % етиловий спирт) і просушеного у стерильних умовах. Виділення експлантантів проводили з основи ніжки і переносили на поживне середовище в чашки Петрі. В експериментах застосовувались різні типи поживних середовищ.

Згідно з 1-им напрямком досліджень для цього була ініційована культура адвентивних пагонів гібриду осики шведської селекції D-06 із сплячих бруньок, яка і слугувала вихідним рослинним матеріалом для подальших робіт. Базовим поживним середовищем було середовище Мурасіге-Скуга із 0.8 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) та 0.1 мг/л НОК (нафтилоцтова кислота).

Джерелом експлантантів були молоді пагони з бічними і верхівковими бруньками. У процесі роботи найбільш вдалим виявився вибір у ролі експлантантів бруньок, розібраних до серединного апекса. Із бруньок видаляли покривні лусочки і вичленяли меристемний купол розміром близько 4 мм. Термінальні бруньки звільняли від молодих листочків, а з латеральних бруньок молоді листочки не видаляли.

Під час експерименту випробовували чотири варіанти стерилізації експлантантів. Але спершу сегменти промивали у проточній воді з додаванням детергенту, потім занурювали їх у стерилізуючі розчини, а після закінчення стерилізації промивали їх стерильною дистильованою водою.

Концентрації стерилізуючих розчинів, послідовність їх застосування і час стерилізації:

1. 70 %-ий розчин етилового спирту – 20 с; 0,2-процентний розчин хлориду ртуті – 30 хв.; 0,25-процентний розчин хлорного вапна – 2×10 хв.; триразове промивання стерильною дистильованою водою.
2. 70% розчин етанолу – 20 с; 0,2-процентний розчин хлориду ртуті – 40 хв.; 7-процентний розчин перекису водню – 5 хв.; одноразове промивання стерильною дистильованою водою.
3. 70 %-ий розчин етанолу – 20 с; 2-процентний розчин гіпохлориту натрію – 6 хв.; 7-процентний розчин хлораміну – 20 с; одноразове промивання стерильною дистильованою водою.
4. 70 %-ий розчин етанолу – 20 с; 0,1-процентний розчин хлориду ртуті – 20 хв.; 0,25-процентний розчин хлорного вапна – 2×10 хв.; триразове промивання стерильною дистильованою водою.

У наших дослідах ми використовували різні поживні середовища, які характеризувалися різними співвідношеннями мікро- і макроелементів, з метою визначення найбільш оптимального середовища з точки зору відповідно до природних умов росту рослини.

Культури вирощувались на таких середовищах: модифіковане середовище MS-1 і MS-2 [51], середовище для деревних порід – WPM, модифіковане середовище DKW.

З метою вивчення дії різних регуляторів росту ми аналізували дію БАП (6-бензиламінопурин), НОК (нафтилоцтова кислота), ІМК (індолілмасляна кислота) в різних концентраціях і поєднаннях на процеси морфогенезу пагонів і ризогенезу.

Для механічного закріплення експлантантів у поживному середовищі використовувався стерильний перліт і різні види агару. Джерелом вуглецю була сахароза, оптимальна концентрація якої підбиралась експериментально. Поживне середовище стерилізували протягом 20 хв за температури $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску $1,1\text{--}1,2\text{ кгс/см}^2$.

Експлантанти вирощувались за температури $20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тривалості світлового дня 16 год. Освітлення проводилось флуорисцентними лампами (ЛДЦ) з інтенсивністю 4-8 кЛк.

Вкорінені проростки (а з метою експерименту – і невикорінені) висаджувались у культивацийні торфові брикети (Jiffi-pots, виробництво Канада) і проходили поступову акліматизацію до умов навколишнього середовища у культивацийній кімнаті протягом двох тижнів, після чого вони були готові до висаджування у відкритий ґрунт.

Паралельно вирощування міцеліальної культури проводили шляхом посіву базидіоспор безпосередньо із плодових тіл за методом Н. Фріза (2) на сусло-агарі. Пророщування базидіоспор проводили за температури $+24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для забезпечення оптимального їх проростання вологість повітря підтримувалась не нижче 80 %. Для її збереження в чашках Петрі останні переносили в ексікатор чи заклеювали парафіллом.

На перших етапах досліджень з метою інгібування росту бактерій, що забруднювали грибну культуру, проводили виділення на підкислений сусло-агар (рН = 4.5-5.0), добавляли антибіотики в різних поєднаннях (пеніцилін – 200 одиниць, стрептоміцин – 100 одиниць у 1 мл середовища). Для виділення культур у деяких штаммах мухомора червоного кусочки плодового тіла поміщали спочатку у стерильні чашки Петрі на вологий фільтрувальний папір і лише після появи ростучого міцелію переносили на агаризоване середовище з антибіотиками. Основний наголос ми робили на абсолютній чистоті вихідної маточної культури, оскільки це має особливе значення для вирощування життєздатного інокулюму на поживних носіях.

Маточні культури даних базидіоміцетів зберігали під стерильним вазеліновим маслом у морозильній камері, а похідні пасажі підтримувалися методом пересіву на сусло-агар 1 раз на 10-11 місяців.

2. Результати досліджень

2.1. Розмноження гібриду осики та тополі чорної методом культури тканин

Важливим і складним моментом у мікроклональному розмноженні є одержання стерильного вихідного матеріалу, тому що поверхневі тканини органів рослин заражені епіфітними бактеріями, грибками та їх спорами. Правильний вибір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб нейтралізувати епіфітну мікрофлору і не пошкодити тканину рослини. Крім цього, дезинфікуюча речовина повинна добре змиватися і не проникати в тканину рослини. Тому режим стерилізації треба підбирати експериментально для кожної рослини та органу окремо.

Під час стерилізації експлантантів осики найкращих результатів було досягнуто при використанні 4-го варіанту стерилізації, тобто:

- 70 % C_2H_5OH – 20 с;
- 0,1 % $HgCl_2$ – 20 хв.;
- 5 % хлорне вапно – 2×10 хв.;
- 3-разове промивання стерильною дистильованою водою.

Така послідовність застосування хімічних агентів викликана специфікою їхньої дії. Спочатку спирт руйнує восковий наліт, полегшуючи тим самим доступ детергенту до живих тканин рослин. Застосування $HgCl_2$ у даній концентрації зменшило кількість інфікованих експлантантів (у середньому 2-3 експлантанти на 10 шт.), а сам хлорид ртуті при цьому не мав інгібуючого впливу на експлантант. Залишки сулеми негативно впливають на життєздатність експлантантів, тому застосування хлорного вапна для видалення цих залишків було необхідним, тим більше, що він мав ще й додаткову стерилізуючу дію. Застосування перекису водню було неефективним.

Культури вирощувались на середовищі MS-1 при освітленні 5000 Лк і тривалості світлового дня 16 год. На цих культурах ми досліджували вплив регуляторів росту цитокінінового типу – 6-бензиламінопурина (БАП) та наф-

тилоцтової кислоти (НОК) на приживлюваність експлантів і на морфогенез пагонів.

З точки зору приживлюваності експлантів і морфогенезу пагонів найбільш вдалою була концентрація БАП 0,8 мг/л. Вона давала 100 % приживлюваності експлантів і найбільшу інтенсивність пагоноутворення (див. рис. 1 і 2).

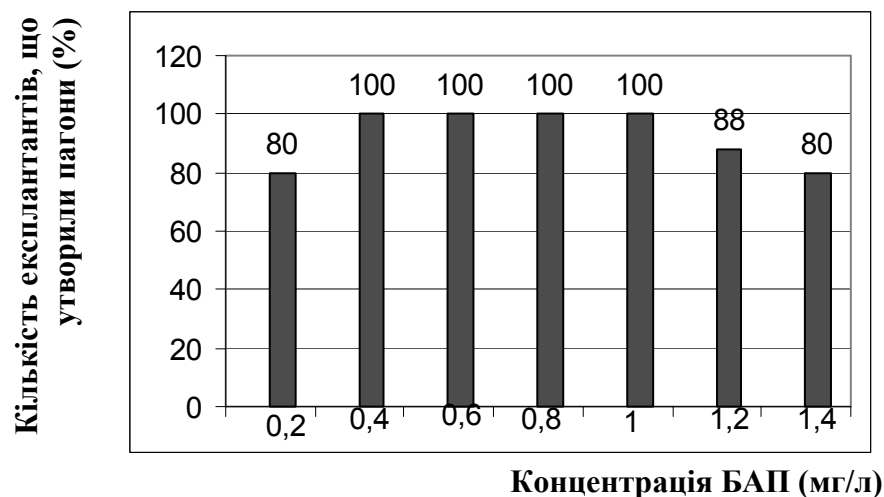


Рис. 1 Вплив БАП на приживлюваність експлантів

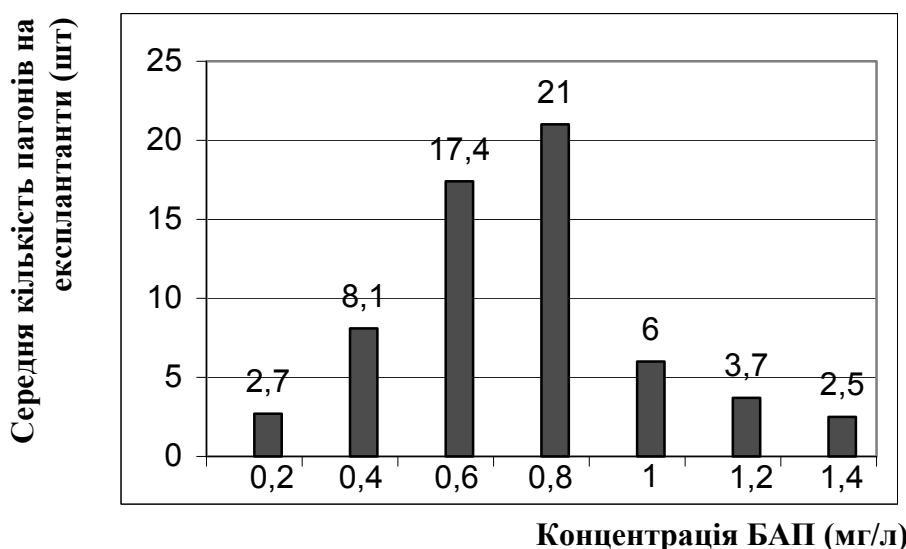


Рис. 2 Вплив БАП на морфогенез пагонів при вмісті НОК 0.1 мг/л

Після цих маніпуляцій культури пересаджувались на середовище для індукції ризогенезу. Це було середовище MS з додаванням синтетичних регуляторів росту ауксинового типу – НОК та ІМК у різних концентраціях. Взагалі, вкорінення пагонів у культурах можливе за наявності лише одного з цих регуляторів – НОК. Але в літературі є дані (Абуїа, 1987) про те, що застосування кількох регуляторів росту ауксинового типу в різних поєднаннях значно підвищує інтенсивність ризогенезу. З цієї причини, а також для прискорення вкорінення мікропагонів, ми вирішили застосувати одночасно два регулятори росту – НОК та ІМК (табл. 1).

Табл. 1. Ризогенез мікроживців гібриду осики залежно від концентрацій НОК та ІМК через 9 і 14 днів від початку культивування

Концентрація НОК, мг/л	Концентрація ІМК, мг/л	9 днів		14 днів	
		середня кількість коренів на експ.	кількість експлантатів, які утворюють корені, %	середня кількість коренів на експ.	кількість експлантатів, які утворюють корені, %
0,0	0,0	1,8 + 0,5	80	2,5 + 0,6	88
0,01	0,01	2,8 + 0,3	92	3,9 + 0,4	92
0,1	0,1	4,3 + 0,3	100	7,7 + 0,4	100
0,2	0,2	5,5 + 0,1	100	7,7 + 0,2	100
1,0	1,0	0,7 + 0,4	44	1,0 + 0,4	64

Як видно з отриманих результатів, кількість коренів збільшується з 9-го до 14-го дня культивування, що свідчить про те, що 9 днів – ще недостатній термін для того, щоб робити висновки про вплив регуляторів росту на ризогенез. Оптимальним терміном для цього є 14 днів. Але як і для 9-денних, так і для двотижневих культур, з точки зору формування коренів оптимальною була концентрація НОК – 0,2 мг/л та ІМК – 0,2 мг/л. За такої концентрації спостерігається найвища кількість утворених коренів на 1 експлантат, причому ризогенез відбувся у 100 % експлантантів. Концентрації НОК 1 мг/л і ІМК 1 мг/л негативно впливали на ризогенез у культурі, що говорить про те, що перевищення концентрації цитокінінових регуляторів може мати інгібуючий вплив на вкорінення і викликати некроз листя і верхівок пагонів.

У літературі є дані, що успішне культивування деревних порід залежить не лише від правильно підібраних співвідношень регуляторів росту, але й від багатьох інших факторів (Bonga, Ahuja, Thogre,...), зокрема, від концентрації солей у середовищі, від вмісту сахарози, рН середовища і деяких інших факторів. Тільки правильне поєднання регуляторів росту з цими факторами забезпечує успіх мікроклонального розмноження обраної рослини.

2.2. Підбір оптимального середовища для вкорінення гібридів осики та росту культури ектомікоризних грибів

Дані літературних джерел говорять про те, що різні співвідношення сахарози і регуляторів росту можуть підвищувати інтенсивність утворення пагонів і коренів у культурах (Bowen G.D., 1965). Ми вирішили підібрати оптимальну концентрацію цукрів у середовищах для морфогенезу кореня у гібриду осики, модифікуючи їх глюкозою з додаванням солодового екстракту. В основу цього експерименту була покладена ідея використання цукрів та їм подібних додатків з середовища MNM для розмноження грибів (без яких досліджувані гриби не можуть рости) при загальному зменшенні макроелементів у 2 рази відповідно до середовища Мурасіге-Скуга, і це кінцеве середовище було назване як MSMN. Концентрацію солодового екстракту ми не змінювали (3 г на літр), але концентрація глюкози змінювалась від 10 до 40 г на літр поживного агаризованого середовища.

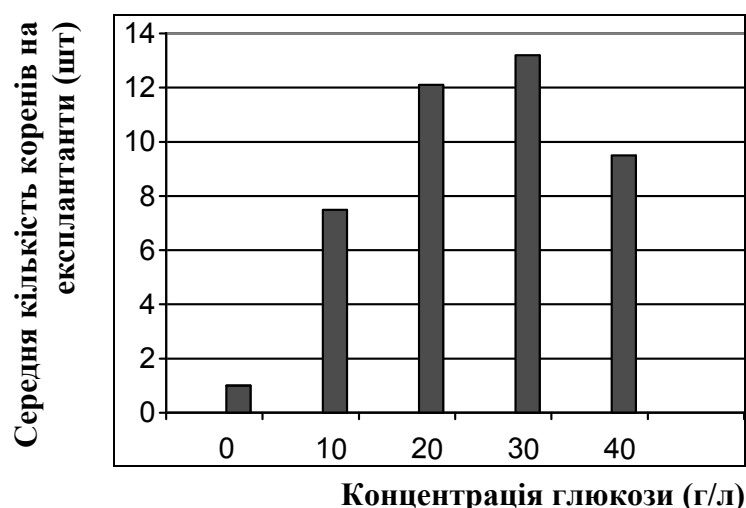


Рис. 3. Вплив концентрації глюкози на ризогенез у культурі гібриду осики на середовищі MSMN і вмісті 0,2 мг/л НОК та 0,2 мг/л ІМК)

Процеси коренеутворення вимагають, поряд з цитокініновими регуляторами, досить високої концентрації глюкози. Найбільше корінців на один експлант утворювалось при 30 % глюкози у середовищі.

Найбільш вдало міцелій утворював колонію в термостаті в експериментах зі свинушкою тонкою на сусло-агарі.

Ми перевіряли інтенсивність росту *Rhizoglyphus involutus* на середовищі MSMN без культури осики. Можна стверджувати, що культура ектомікоризних грибів проявляла досить інтенсивний ріст на даному середовищі, хоча і відставала приблизно на 25 % по росту від модифікованого середовища Меліна-Норкранс.

Ризогенез мікроживців гібриду осики проводили на середовищі MSMN, яке попередньо було інокульоване чистою культурою *Rhizoglyphus involutus*. Інгібування росту коріння осики, як і росту грибниці, не відбувалося. Ефективність мікоризації в умовах *in vitro* була досить високою.

2.3. Апробація способу масового намноження інокулюму на сфагновому мосі

Вегетативний інокулюм свинушки тонкої вирощували за згаданою вище методикою (Marx et al., 1982). Стерильну культуру *Rhizoglyphus involutus* вирощували за температури 25 °C протягом 1,5 тижня на модифікованому (MNM) агаризованому середовищі. Міцелярні диски із стандартних чашок Петрі використовувались для ініціації масового розмноження інокулюму, який ми вирощували в різноманітних контейнерах: лабораторні колби з кришками з алюмінієвої фольги та спеціальні вегетаційні 1-літрові ємкості для росту міцелію із поліпропіленовою кришкою з ватним фільтром.

Середовище MNM складалось із 0,05 г хлористого кальцію, 0,025 г хлориду натрію, 0,5 г одно-заміщеного фосфату калію, 0,25 г дво-заміщеного фосфату амонію, 0,15 г сульфату магнію, 1,2 мл 1 % хлориду заліза, 100 мг тіамін-НСІ, 3 г солодового екстракту та 10 г глюкози у 1 л дистильованої води. Додавали 15 г агару для формування твердого середовища. Після автоклавування рН як рідкого, так і агаризованого середовища, було в межах 5,5-5,7.

У контейнери клали добре порізаний мох, попередньо насичений рідким поживним середовищем, зливали залишки середовища, закривали кришкою та автоклавували протягом 1 год за температури 121 °C. Після охолодження контейнерів, субстрат інокулювали чистою культурою штаму *Raxillus involutus* Pd-121, який характеризувався надзвичайно агресивним ростом. Ця культура була отримана шляхом відбору та отриманий дикаріон ми використовували як вихідну маточну культуру надалі в усіх дослідженнях.

Первинний стерильний інокулюм на сфагновому мосі ми використовували для апробації способу масового намноження інокулюму. З метою адаптації до виробничих умов, що існують на окремих виробництвах (в нашому випадку – лісорозсадниках) ми не бачимо можливості налагодження стерильної технології вирощування інокулюму, оскільки це без спеціально підготовленого персоналу та досить дорогого обладнання (автоклави, ламінари та інше лабораторне устаткування) є неможливим для малих виробництв.

На нашу думку, доцільним є використання технологій, що вже працюють досить ефективно у виробничих умовах, як це є у випадку вирощування сапрофітних їстівних грибів (*Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Volvariella* та інші). Тобто пропонуємо замість методу жорсткої стерилізації субстрату застосувати спосіб семі-стерилізації, або як його ще називають – метод ксеротермічної обробки субстрату. Цей метод був вперше застосований в Угорщині у кінці 70-х років під час енергетичної кризи для вирощування гливи, у подальшому він був вдосконалений у країнах Південно-Східної Азії.

Суть методу зводиться до того, що попередньо підготовлений (подрібнений) субстрат обробляється парою за температури 95-100 °C протягом досить короткого часу (60-90 хв), після цього зволожується водою із вапном та сполуками беномилу (фунгістатик). Вапно додають до субстрату з метою підняття рівня рН до 7-8, фунгістатик беномил (який міститься у комерційних продуктах – таких як фундазол (виробник Угорщина) чи бенлат (виробник Швеція) проявляє фунгістатичну дію на нижчі гриби і при певних концентраціях не впливає на ріст вищих базидіальних грибів.

Для перевірки дії різних фунгістатиків та їх концентрації на ріст міцеліальної культури *Raxillus involutus* ми випробовували такі хімічні сполуки: беномил, манкозєб, іпродіон, прохлораз.

Багато фунгіцидів, доступних на вітчизняному ринку, є дуже ефективними проти грибків і мають досить незначний негативний вплив на рослини і тварин. Такі сполуки мають високу біохімічну специфічність, взаємодіючи з окремим компонентом клітини чи біохімічним процесом. Їх селективність походить тільки з того елемента, що є присутнім у клітині патогенного гриба, чи зі сполуки, яка стає активною, тільки в межах клітини патогена.

Беномил є представником бензімідазолів, що використовуються для запобігання чи лікування рослинних хвороб, які викликаються досить широким спектром грибів. Бензімідазоли мають інгібуючий вплив на хід мітотичного поділу, а тому і на ріст організму. Вони діють шляхом запобігання полімеризації тубуліну і витягування мікротрубочок в ядрі. Тому цей хімічний агент має фунгістатичну дію.

Щоб переконатись в ефективності застосування беномилу для намноження синтетичного інокулюму на сфагновому мосі ми провели експеримент із використанням інокуляції чашок Петрі з агаризованим MNM середовищем такими патогенними нижчими грибами як *Trichoderma auroviride* та *Cladobotrum asperoformum* у поєднанні з *Paxillus involutus* із додаванням різних фунгіцидів (у різних концентраціях) (табл. 2).

Табл. 2. Частка інгібування *Trichoderma auroviride* та *Cladobotrum asperoformum* і *Paxillus involutus* під дією фунгіциду, %

Фунгіцид	Концентрація, ppm	<i>Trichoderma auroviride</i>	<i>Cladobotrum asperoformum</i>	<i>Paxillus involutus</i>
Беномил	1	50,5	44,6	0
	10	100	100	0
	50	100	100	0
	100	100	100	10
Манкозеб	1	51,6	54,0	0
	10	100	100	0
	50	100	100	5
	100	100	100	20
Iprodione	1	0	0	0
	10	50,5	28,8	0
	50	61,3	35,3	0
	100	65,4	45,6	67
Prochloraz	1	85,2	100	0
	10	100	100	0
	50	100	100	0
	100	100	100	52

Примітка: відсоток інгібування замірювався по діаметру колонії.

З табл. 2 бачимо, що найменш токсичним для *Paxillus involutus* і порівняно ефективним із наведених вище патогенів є все-таки беномил. Якщо взяти до уваги, що дію фунгістатика перевіряли на стерильних субстратах, то можна стверджувати, що для практичного застосування на пастеризованих субстратах беномил необхідно застосовувати у концентраціях 50 ppm. Знаючи, що комерційні продукти, такі як фундазол та бенлат містять 50 % беномилу, то у кінцевому випадку необхідно застосовувати концентрацію 100 ppm фундазолу чи бенлату для обробки субстрату.

У лабораторних умовах ми таким чином модифікували метод отримання інокулюму на пастеризованому субстраті із стерильного інокулюму:

1. Проводили попереднє замочування подрібненого сфагнового моху протягом 2 год у модифікованому середовищі Меліна-Норкранса в інертному посуді.
2. Додавали 1 % крейди до зволоженого субстрату (відсоток крейди розраховувався відповідно до маси вологого субстрату) з метою підвищення рН субстрату до рН 7-8. Така висока ініціальна лужність середовища є необхідною (з практичного досвіду вирощування субстрату їстівних грибів) для інгібування росту нижчих грибів. У подальшому рН субстрату падає, що є результатом росту міцеліальної культури та ефекту "самопідкислення".

3. Фунгістатик було вирішено додавати методом оприскування з пульверизатора після проведення ксеротермічної обробки.
4. Технологічний етап семі-стерилізації проводили в автоклавах ВК-75 при тиску 0.3 атм ($t = 97^{\circ}\text{C}$) у поліпропіленових пакетах бельгійської фірми *Mucelia* зі стрічковим антимікробним фільтром (пори < 0.2 мк), що витримують автоклавування.
5. Пакети після інокуляції герметично запаювались.
6. Інокульований субстрат переносили в термостат у температуру 24°C .
7. Заростання субстрату проходило 2-3 тижні залежно від кількості інокульому (простерилізованого інокульому).

Завдяки високій чистоті культури та агресивності штаму було отримане абсолютне заростання носія культурою *Rhizoctonia involutus*.

Отриманий інокульом використовували для "зараження" вирощених гібридів у контейнерах із продезінфікованою (розчином формаліну) ґрунто-сумішшю.

Висновки

- Мікоризація в умовах *in vitro* виявилась досить ефективною, хоча найбільш трудомісткою і складною технологічно, що для практичного застосування є досить проблематичним. Цей метод найбільше підходить для лабораторних фізіологічних та біотехнологічних досліджень.
- Другому напрямку досліджень необхідно приділити більшу увагу з метою впровадження для практичного застосування. На нашу думку, вирощування стерильного інокульому на сфагновому моші підходить для менш агресивних мікоризо-утворюючих грибів, таких як *Boletus edulis*, *Suillus*, тощо.
- У майбутньому, з метою підвищення ефективності мікоризації доцільним є використання мікроорганізмів (препарати "Біоспорин", "Різоплан", тощо) для сприяння росту ектомікоризи та інгібування нижчих мікроорганізмів.
- Для практичного застосування найбільш доцільним є використання лише зарубіжних генетичних банків культур (таких як CBS в Нідерландах, АТТС у США) для отримання чистих культур більш швидкоростучих штамів мікоризоутворюючих грибів, що значно економить зусилля та кошти та є найбільш надійним з метою уникнення помилок із введенням у культуру.

Література

1. **Ahuja M.R.** Aspen. In: Evans DA, Sharp WR and Ammirato PJ (Eds.)// Handbook of Plant Cell Culture. Macmillan Publishing Company. New York, 1986. – pP. 626-651.
2. **Ahuja M.R.** In vitro propagation of poplar and aspen// Bonga JM and Durzan DJ (Eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol.3. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987. – pP. 207-223.
3. **Ahuja M.R., Krushe D. and Melchior G.H.** Determination of plantlet regeneration capacity of selected aspen clones in vitro// Ahuja MR (Ed.) Somatic Cell Genetics of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988. – pP. 127-135.
4. **Bowen G.D.** Mycorrhiza inoculation in forestry practice// Aust For 29, 1965. – pP. 231-237.
5. **Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. и др.** Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. – К.: Наук. думка, 1983. – 312 с.
6. **Бухало А.С.** Актуальные проблемы глубинного культивирования съедобных грибов// Производство высших съедобных грибов в СССР. – К.: Наук. думка. 1978. – С. 24-29.
7. **Carlile M.J., Watkinson S.C.** The Fungi// Academic Press Inc SanDiego, 1994. – pP. 23-35.

8. Marx et al. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container – grown tree seedlings// Forest Sci 28, 1982. – pP. 373-400.

9. Mikola P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice// Ectomycorrhizae: their ecology and physiology (G.C. Marks and T.T. Kozlowski, eds.). Academic Press, New York, 444, 1973. – pP. 383-411.

10. Theodorou C. and G.D. Bowen. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi// Aust For 34, 1970. – pP. 183-191.

11. Varma A., B. Hock (Eds.) Mycorrhiza. Structure, Function// Molecular Biology and Biotechnology. Springer-Verlag, 1995.

12. Vozzo J.A., and E. Hacskeylo. Inoculation of *Pinus caribea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico// Forest Sci 17, 1971. – pP. 239-245.

13. Бондаренко З.Д., Гречаник Р.М. Мікроклональне розмноження деяких видів роду *Populus*// Наук. вісник УкрДЛТУ: Лісівницькі дослідження в Україні. – 2002. – С. 233-236.

УДК 630*181.28

Доц. Ю.М. Дебринюк, канд. с.-г. наук – УкрДЛТУ

ЯЛИНА ЄВРОПЕЙСЬКА (СМЕРЕКА) ЯК ВИСОКОПРОДУКТИВНА ПОРОДА МАЛОГО ПОЛІССЯ

Розглянуті питання продуктивності *Picea abies* [L.] Karst. в чистих і змішаних лісових культурах Малого Полісся. Рекомендовано типи лісових культур за участю ялини.

Doc. Yu.M. Debrinuk – USUFWT

Norwau Spruce as highly productive species of Male Polissya

It is discussed aspects of *Picea abies* [L.] Karst. productivity at pure and mixed forest cultures of Male Polissya. It is recommended types of forest cultures with spruce admixture.

Ялина європейська за поширеністю серед хвойних порід Славутського ДЛГ, на території якого проводились дослідження, знаходиться на другому місці, займаючи площу 1143 га або 5,5 % вкритих лісом земель. Попит на породу (новорічні ялинки, рудстійка, баланси тощо) в регіоні є достатньо високим, що стало наслідком широкого впровадження ялини в лісові культури регіону. Про значне розширення території зростання *Picea abies* свідчать дані [6]. Так, в XX столітті в рівнинній частині України створено більше 42000 га насаджень з перевагою ялини та значну кількість змішаних насаджень. За даними М.А. Голубця [2], якщо межі природного поширення ялини охоплювали площу 480 тис. га, то територія її сучасного суцільного поширення зросла більш ніж вдвоє. Площа одиничного розселення теж збільшилась з 1000 до 1800 тис. га.

Існує багато прикладів високопродуктивних ялинових насаджень у позаареальних умовах. В оптимальних умовах зростання ялина європейська є швидкокорослою високопродуктивною породою, здатною за порівняно короткі терміни накопичувати значні запаси деревини [11, 4]. Зокрема, штучні ялиники Малого Полісся Г.А. Порицький [8] відносить до типу деревостанів з прискореним ростом у молодому віці.

В.О. Бузун [1] вказував на високий рівень рентабельності вирощування ялинових насаджень в умовах Українського Полісся та малий термін окуп-