

**Выводы.** Результаты исследований показывают, что наибольшая продуктивность гриба шиитаке наблюдается в типе леса ясеневольно-березовая урема, где данные грибы находят самые благоприятные условия для роста и развития: оптимальные почвенные и температурные условия, влажность, а также наличие валежной древесины. Проведение лесохозяйственных мероприятий, направленных на снижение полноты до 0,5 дает увеличение продуктивности грибов на 25 %.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Булах Е.М. Грибы – источник жизненной силы / Е.М. Булах. – Владивосток: Русский остров, 2001 – 64 с.
2. Грабовский В.И. Модели оценки запасов валежа по данным учетов на трансектах / В.И. Грабовский, Д.Г. Замолотчиков // Лесоведение. – 2012. – № 2. – С. 66-73.
3. Скворцова Е.Б. Экологическая роль ветровалов / Е.Б. Скворцова, Н.Г. Уланова, В.Ф. Басевич. М.: Лесн. пром-сть, 1983. –192 с.
4. Сукачев В.Н. Методические указания к изучению типов леса / В.Н. Сукачев, С.В. Зонн. – М.: Изд-во АН СССР, 1961. – 144 с.

УДК 57.083.12\*13:582.475.4:630\*232

А.В. Константинов, науч. сотр.;  
С.В. Пантелеев, вед. науч. сотр.;  
И.А. Хархасова, аспирант, мл. науч. сотр.;  
М.Я. Острикова, ст. науч. сотр.  
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», г. Гомель)

#### ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКОРИЗОБРАЗУЮЩЕГО ГРИБА *PAXILLUS* *INVOLUTUS* (BATSCH) FR.

Главная функция грибов в микробном сообществе почв состоит в интенсивном разложении органических остатков и обеспечении круговорота биогенных элементов. Вместе с тем считается, что до 98 % высших растений способны вступать в симбиоз с почвенными грибами. Так эктомикоризу формирует большинство древесных видов, произрастающих в бореальной зоне. Значение микотрофности в первую очередь заключается в улучшении роста за счет оптимизации минерального питания и водного обмена, в особенности на бедных почвах. При этом микоризация сеянцев зачастую обеспечивает лучшие условия для приживаемости [1].

Наличие микоризы на корнях и степень ее развития выступают одним из показателей качества посадочного материала. При этом

эффективность взаимодействия корней древесных растений и грибного мицелия тесно связано как с их видовой принадлежностью, так и составом микробиома почвы, кроме того существенное влияние на образование эктомикоризных ассоциаций оказывает комплекс климатических и эдафических факторов (показатели среднесуточных температур, суммы осадков, уровня рН, объем запасов азота и гумуса и др) [2, 3]. Показано, что на начальных этапах микоризообразования грибной компонент проявляет признаки паразитического поведения, снижая активность ростовых процессов сеянцев [4].

С учетом хозяйинной (гостальной) специфичности эктомикоризных грибов, грибы-генералисты, наиболее распространенные в лесах умеренного пояса, играют особую роль в обеспечении колонизации корневых систем как поздних сукцессионных видов деревьев, так и посадочного материала, используемого при создании лесных культур [5]. Так, достаточно широкой специализацией по отношению к различным видам деревьев, обладают представители родов *Cortinarius* (Pers.) Gray, *Inocybe* (Fr.) Fr., а также виды *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., *Amanita vaginata* (Bull.) Lam., повсеместно распространенные в светлых лиственных и хвойных лесах. Вид Свинушка тонкая (*Paxillus involutus*) является одним из наиболее изученных и модельных видов для экологических и физиологических исследований, а ряд авторов сообщают о существенной морфофизиологической изменчивости различных изолятов. Указанные свойства позволяют проводить скрининг наиболее активных штаммов [6, 7], перспективных для использования при микоризации [8]. Чистую культуру микоризообразователя получают в асептических условиях путем выделения грибного материала (спор или экспланта вегетативной ткани), что требует подбора условий стерилизации материала и питательных сред для культивирования [9].

Исходя из выше сказанного, целью данной работы являлось введение свинушки тонкой в чистую культуру для изучения ростовых параметров и морфологических особенностей при выращивании на питательных средах.

В качестве объекта исследования были использованы плодовые тела свинушки тонкой. Сбор плодовых тел проводили в сосновых насаждениях на территории Гомельского опытного лесхоза, в период их массового появления в сухую погоду. Выбирали молодые неповрежденные плодовые тела, хранили материал в течение 1 недели в холодильнике в промаркированных полиэтиленовых пакетах.

Плодовые тела очищали от растительных остатков и фрагментов почвы, быстро, чтобы исключить напитывание, вымывали в рас-

творе хозяйственного мыла и промывали в проточной воде. Дальнейшую обработку проводили в ламинар-боксе, подсушив материал на фильтровальной бумаге. Стерилизацию проводили в 70% этиловом спирте 1 минуту и, после отмывания стерильной дистиллированной водой, погружали в 0,1% раствор хлорида ртути (II), далее повторно ополаскивали стерильной дистиллированной водой.

Для выделения инокулюма использовали внутренние, стерильные части ткани. Обработанное плодовое тело одним стерильным скальпелем разрезали, а другим высекали фрагменты тканей размером около 0,5 см, из места перехода шляпки в ножку, перенося их по одному в чашки Петри на плотные питательные среды: 10% сусло-агар (СА) и Murashige-Skoog (MS), применяя в качестве уплотнителя агар-агар. Водородный показатель (рН) доводили до значений 5,6-5,8 и автоклавировали 20 минут при 0,5 атм (112°C). Чашки с инокулюмом плотно оборачивали полиэтиленовой пленкой для предотвращения пересыхания и помещали в термостат и культивировали при 24°C.

Подготовку лабораторной посуды и инструментов, посев и культивирование материала проводили согласно общепринятым методикам микробиологических работ [10]. Отмечали продолжительность культивирования до покрытия инокулюма растущими гифами, морфологические особенности развивающегося мицелия, а также срок до полного обрастания им поверхности среды. Верификацию видовой принадлежности исходного материала и полученной культуры гриба проводили с использованием молекулярно-генетических методов. ПЦР проводилась с использованием набора DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США) согласно прилагаемой инструкции. Для амплификации маркерного региона рДНК (ITS1) использовали праймеры ITS1F/ITS2 [11]. ПЦР-продукты секвенировались по Сэнгеру на базе генетического анализатора 3500 Applied Biosystems. Видовая идентификация осуществлялась в базе данных NCBI [12].

После 6 суток культивирования эксплантов из плодовых тел на питательной среде MS отмечали начало активного роста гиф, формирующих рыхлый мицелий коричневатого-бурого цвета. В случае использования среды СА указанный процесс начинался не ранее 10 суток, при этом часть эксплантов на чашках с данной средой некротизировала и не имела признаков роста. Через 2-3 суток начинался переход мицелия к росту по поверхности питательной среды, вначале в виде тонкой сети неокрашенных гиф, которые по мере развития утолщались, приобретали характерную пигментацию и, при этом, окрашивая среду (MS) в желтоватый цвет, чего на среде СА не наблюдали. Сле-

дует отметить, что интенсивность роста мицелия свинушки тонкой на среде MS была высокой, на 23 сутки культивирования уплощенные колонии достигали диаметра 4,2-5,6 см, полное зарастание чашек отмечали на 28-30 сутки. На среде СА формировались колонии диаметром до 2,8 см выпуклой линзообразной формы, полного зарастания до высыхания питательной среды не происходило. Проводили пересев чистых культур, как на аналогичные, так и на питательные среды другого состава. В случае последовательных субкультивирований без смены состава питательной среды, сохраняется стабильная интенсивность роста. В варианте с использованием сусло-агара после предкультивирования на среде MS, выявлено повышение продолжительности лаг-фазы (более 12 суток), в контрольном варианте (MS→MS) распространение мицелия по свежей среде начиналось не позднее 4 суток. Выделенный изолят *P. involutus* генетически верифицирован и депонирован в базу NCBI: OQ300431.

Таким образом, на основании полученных результатов установлено, что выделение и поддержание свинушки тонкой *in vitro* следует проводить на плотной питательной среде MS. Питательную среду СА можно использовать при длительном беспересадочном хранении чистой культуры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Finlay R.D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles // *Mycologist*. 2004. Vol. 18. P. 91–96.
2. Великанов Л.Л., Сидорова И.И., Александрова А.В., Воронина Е.Ю. Пространственное распределение мико- и микробиоты почв в колониях доминантных видов базидиомицетов в ельниках разного типа // *Микология и фитопатология*. 2005. Т. 39, Вып. 2. С. 19–26.
3. Timonen S., Jorgensen K.S. Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris* – *Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris* – *Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat // *Canadian Journal of Microbiology*. 1998. V. 44 (6). P. 499–513.
4. Summerbell R.C. Microfungi associated with the mycorrhizal mantle and adjacent microhabitats within the rhizosphere of black spruce // *Canadian Journal of Botany*. 1989. Vol. 67. P. 1085–1095.
5. Liao H., Chen Y., Vilgalys R. Metatranscriptomic study of common and host-specific patterns of gene expression between *Pines* and their symbiotic ectomycorrhizal fungi in the genus *Suillus* // *PLoS Genetics*. – 2016. Vol.12 (10). P. 1–24.
6. Fries N. Intersterility groups in *Paxillus involutus* // *Mycotaxon*. 1985. Vol. 24. P. 403–410.

7. Bresinsky A. Observations on mycobiota in Estonia // *Folia Cryptogam Est.* 2006. Vol. 42. P. 1–9.

8. Шубин В.И. Макромицеты лесных фитоценозов таежной зоны и их использование. – Л.: Наука. 1990. 197 с.

9. Molina R., Palmer J.G. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi // *Methods and principles of mycorrhizal research.* – St. Paul, MN: American Phytopathological Society. – 1982. P. 115–129.

10. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа. 2004. С. 149–165.

11. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, vol. 2, no. 2, pp. 113–118.

12. National Center for Biotechnological Information, NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 24.11.2022).

УДК 630\*232.32

В.В. Копытков, проф., зав. сектором, д-р с.-х. наук;

В.В. Савченко, соискатель, мл. науч. сотр.

(Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель);

А.А. Кулик, Министр

(Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь, г. Минск)

## **ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ЛЕСНЫХ ПОРОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ**

Интенсификация питомнического хозяйства и увеличение выхода стандартного посадочного материала в условиях открытого грунта с единицы площади может быть достигнуто на основе совершенствования агротехники, обеспечивающей интенсивное и целенаправленное выращивание сеянцев лесных пород с высокой степенью микоризности корней. Одной из главных причин выращивания сеянцев со слабой микоризованностью корневых систем является недостаточное обеспечение почв элементами питания и в первую очередь гумусом. Для повышения содержания гумуса в почве особо важную роль играют органические удобрения. При использовании органических удобрений создаются оптимальные условия для получения стандартного посадочного материала с микоризованной корневой системой [1, 2].

Исследования по изучению влияния органоминеральных субстратов на рост и развитие сеянцев сосны обыкновенной и дуба черешчатого проведены в постоянных лесных питомниках Кобринского и