

Э. ПАРМАСТО

РАСПРОСТРАНЕНИЕ АФИЛЛОФОРОВЫХ ГРИБОВ БАЗИДИОСПОРАМИ

1. Методика исследования споруляции трутовых грибов

Огромный ущерб нашему лесному хозяйству причиняют трутовые грибы — разрушители древесины. Уже больше столетия ученые изучают возможные способы контроля над естественным процессом гниения древесины и, хотя в этой области достигнуты определенные успехи, вопрос в целом еще не решен.

Главные направления изучения защиты леса и лесоматериалов от дереворазрушающих грибов:

- 1) изучение процесса гниения;
- 2) изучение влияния условий среды и состояния древостоя на зараженность (сюла относятся и многочисленные исследования по определению степени зараженности и причиняемого гниением ущерба);
- 3) изучение вопросов иммунитета лесных пород к дереворазрушающим грибам, работы по селекции и разведению гнилостойких рас деревьев;
- 4) разработка и изучение эффективности лесохозяйственных мероприятий против дереворазрушающих грибов;
- 5) разработка и изучение эффективности химических мер борьбы с гниением обработанного лесоматериала, деревянных построек и других сооружений;
- 6) изучение видового состава и географического распространения разрушителей древесины (главным образом трутовых грибов).

В исследованиях этих направлений достигнуты значительные успехи. Однако почти незатронутыми остались другие стороны изучения биоповреждений древесины, имеющие также немаловажную роль:

- 1) образование плодовых тел, продукция спор и их выделение;
- 2) распространение спор дереворазрушающих грибов;
- 3) процесс заражения деревьев в естественных условиях.

Исследование этих вопросов важно как для более глубокого изучения жизни грибов, причиняющих гниение, так и для полного понимания процесса гниения древесины с вытекающими отсюда выводами о мерах борьбы.

В Институте зоологии и ботаники Академии наук Эстонской ССР в 1953—1955 гг. и начиная с 1966 г. проводятся исследования по образованию плодовых тел и споруляции трутовых грибов. Результаты исследований 1953—1955 гг. частично опубликованы (Пармасто, 1955, 1958, 1959; Parmasto, 1956). В серии статей, первой из которых является настоящая, будут освещаться результаты работ, начатых в 1966 г., а также неопубликованные до сих пор данные 1953—1955 гг.

Одна из причин немногочисленности подобных исследований — слабая разработка методики. Этому вопросу уделяется ниже особое внимание.

Изучение фенологии споруляции трутовых грибов

Обзор и критика применяемых методов приведены автором ранее (Пармасто, 1958). Ниже с некоторыми изменениями и исправлениями описываются методические приемы, проверенные во время полевых работ в Эстонской ССР.

1) Изучение фенологии споруляции большого количества плодовых тел глазомерным определением количества спор (методика Бьёрнекера, усовершенствованная автором).

Под исследуемое плодовое тело на полоске гибкой жести (оцинкованная кровельная жесь толщиной 0,5 мм) помещается коробочка (пробка от лимонадной бутылки), на дне которой находится диск из темной (желательно черной) глянцевиной бумаги (рис. 1, 2). При наличии споруляции на диске образуется слой выделенных спор.

Коробочки должны быть расположены максимально близко к гименофору, но их прикосновение (даже временное — при замене коробочек) к гименофору абсолютно недопустимо, так как ведет к гибели нежных гиф гименофора. Осмотр спороуловителей проводится ежедневно, через каждые два дня или раз в неделю. При удачном выборе участка леса в течение рабочего дня можно просмотреть 100—150 плодовых тел. Споруляция определяется глазомерно по шкале:

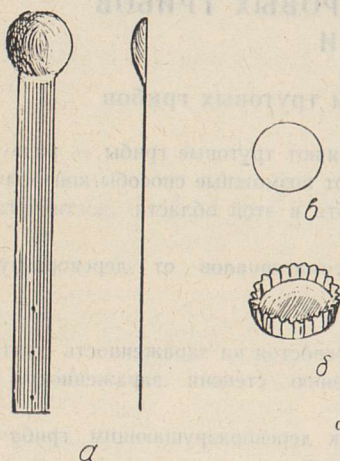
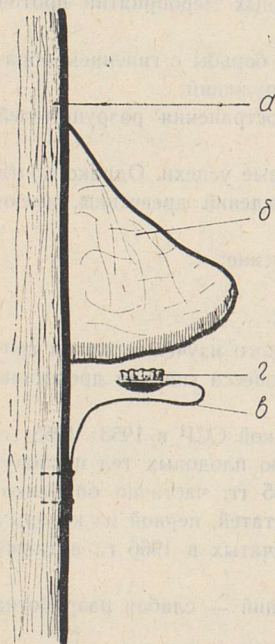


Рис. 1. Спороуловитель:

а — полоска гибкой жести, б — коробочка от лимонадной бутылки, в — диск глянцевиной бумаги.

Рис. 2. Схема расположения спороуловителя под плодовым телом трутового гриба.

а — субстрат (ствол, пень), б — плодовое тело, в — полоска упругой жести, г — коробочка с диском глянцевиной бумаги.



0 — налета спор нет;

1 — нежный налет, который хорошо заметен только при косом расположении диска (провести пальцем над диском!);

2 — налет спор меняет окраску диска (напр., черный диск стал белым);

3 — толстый (иногда до 2—3 мм!) налет спор.

Повторная проверка микроскопированием показала, что при отсутствии видимого невооруженным глазом налета споры действительно всегда отсутствовали.

Иногда при небольших плодовых телах в коробочки (которые не помещались полностью под плодовым телом) попадает дождевая вода. В таком случае наличие или отсутствие спор нужно проверить микроскопированием. По-

стройка хотя бы небольших крышек над плодовыми телами недопустима, так как это заметно влияет на естественный ход споруляции (см. Mikalajkevičius, 1958; Микалайкевичус, 1959).

Изучать споруляции можно как у плодовых тел, расположенных на небольшой высоте, так и у находящихся высоко (как часто бывает у сосновой губки). В последнем случае к деревьям сооружаются прочные лестницы.

В центре территории, на которой растут деревья с исследуемыми плодовыми телами, устанавливается в типичном для данного фитоценоза месте небольшая метеостанция с недельными термографом и гигрографом, максимальным и минимальным термометрами. Правильность показаний гигро- и термографов определяется аспирационным психрометром при каждом обходе. Данные об осадках можно получить на ближайшей метеостанции.

Время начала и конца наблюдений зависит от климатических условий. Как правило, споруляция многих трутовых грибов начинается вскоре после повышения среднесуточной температуры выше нуля и кончается в том же году, когда температура опускается ниже нуля. Нередко в середине лета, в самое жаркое время, в споруляции наступает перерыв. Не исключена возможность, что в южных районах нашей страны у некоторых трутовых грибов споруляция наблюдается и зимой.

2) Изучение фенологии споруляции с применением предметных стекол.

Под плодовое тело при помощи полоски гибкой жести помещается обыкновенное предметное стекло так, чтобы определенный участок стекла находился возможно ближе к гименофору (рис. 3). При замене новое стекло нужно положить в точно такое же положение, в каком находилось заменяемое. Обилие споруляции определяется микрофотографированием сухого предметного стекла (без покровного стеклышка); высчитывается (суммарное) количество спор в 10 полях зрения, которые (при помощи препаратодителя) расположены в одних и тех же местах предметного стекла и просматриваются всегда с одинаковым увеличением. При применении микроскопа МБИ-6 удобно пользоваться окуляром 7X и эпиобъективом 21X (исследование проводится при отраженном свете с применением светлого или темного поля). Для транспортировки стекол в лабораторию надо иметь специальные коробки; хотя споры прикрепляются к предметным стеклам довольно прочно, при соприкосновении стекол друг с другом или с другими предметами некоторые из них отпадают.

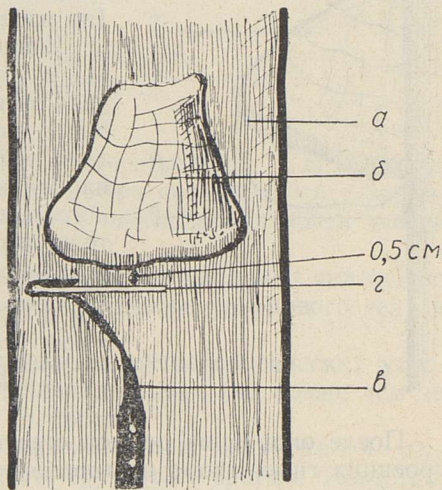


Рис. 3. Прикрепление предметного стекла под гименофор трутового гриба.

а — субстрат (ствол, пень), б — плодовое тело, в — полоска гибкой жести, г — предметное стекло.

Последний метод — более трудоемок и менее удобен, чем первый, он целесообразен при изучении споруляции у плодовых тел с сильно наклонной или почти отвесной поверхностью гименофора. Некоторые исследователи (напр., Riley, 1952) заблуждаются относительно точности цифровых

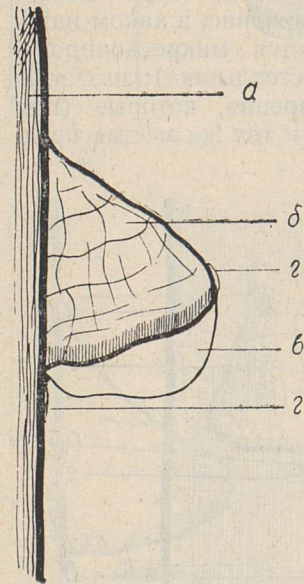
данных, полученных методом предметных стекол. Действительно, количество спор в одном (или даже 100) поле зрения можно сосчитать очень точно. Но следует учесть, что только небольшая часть выделенных спор попадает на предметное стекло* — большинство уносится течениями воздуха, а характер и скорость последних очень изменчивы. Также практически невозможно при замене стекол положить новое всегда точно в то же положение, в котором было заменяемое.

Изучение количества выбрасываемых трутовыми грибами спор

В своей статье, посвященной результатам изучения споруляции трутовых грибов (Пармасто, 1958), автор дал обзор всех применявшихся до сих пор методов, выразив свой скептицизм относительно даже наиболее приемлемого из них. Автор считает, что закрытие гименофора на 24 ч плотной бумагой не может не влиять на естественный ход споруляции. Опыты, проведенные в 1966—1968 гг., убедили нас, что влияние это, по-видимому, все же не очень существенно, а лучшего метода до сих пор еще не удалось разработать.

Метод улавливания спор описан уже А. Бондарцевым (1936); ниже добавим некоторые технические усовершенствования его.

Плодовое тело трутового гриба обвертывается снизу листом плотной тонкой гладкой бумаги, желательнее не промокающей в воде (калька, тонкий пергамент). Края бумаги прикрепляются герметически к поверхности плодового тела и к дереву (или пню) полосками лейкопластыря (лентой шириной в 2 см) (рис. 4). Бумага не должна прикасаться к гименофору. Прикрепление и снятие ее необходимо проводить очень осторожно, чтобы не повредить плодовое тело и не потерять выделенные споры. Бумагу снимают ровно через 24 ч и помещают в полиэтиленовый мешочек, который плотно закрывают лейкопластырем. До обработки пробы (если она проводится не скоро) желательнее мешочки хранить в холодильнике (во избежание прорастания спор).



Лейкопластырем удобно пользоваться только в сухую погоду — к мокрому плодовому телу он не приклеивается. Мы испытали разные виды изоляционных лент, но хорошего заменителя лейкопластыря для дождливой погоды пока найти не удалось. Применение обыкновенного клея недопустимо: он портит плодовое тело, а снятие бумаги без потери спор почти невозможно.

Рис. 4. Плодовое тело трутового гриба с прикрепленной к нему бумагой для сбора выделяемых спор (в разрезе). а — субстрат (ствол, пень), б — плодовое тело, в — плотная бумага, г — полоски лейкопластыря.

После окончания опытов определяется площадь гименофора (вернее, проекция гименофора на горизонтальную поверхность), а также и гимения (с учетом длины трубочек, числа пор на 1 мм² и их среднего диаметра).

* В одном нашем опыте с *Polyporus squamosus* Fr. споры, падавшие на предметное стекло, составляли менее 4% от общего количества выделяемых в течение суток спор. При этом предметное стекло было прикреплено на расстоянии 0,5 см от гименофора.

Для установления количества спор, выделяемых в течение определенного промежутка времени (24 или 1 ч), они смываются с бумаги и из мешочка водой специально укороченной 25-миллиметровой пипеткой в широкую стеклянную посуду. Суспензию, полученную при многократном смывании, вливают в измерительный цилиндр. Желательный объем суспензии при очень маленьких плодовых телах — 50 мл, при более крупных — 100 мл (при подсчете спор, выделенных в течение 1 ч), а для подсчета суточной продукции спор — соответственно 250 и 500 мл (или даже до 2000 мл). Вода может быть не дистиллированной, а чистой водопроводной.

После тщательного перемешивания маленькой (напр., одномиллиметровой) пипеткой берется 10 раз суспензия и определяется количество спор под маленьким увеличением микроскопа при помощи обыкновенной счетной камеры (напр., системы Горяева). Руководство по пользованию камерой можно найти во многих медицинских справочниках, а также в книге Б. Ромейса (1953); камера широко используется медиками для установления количества элементов крови. Если в одном большом квадрате (площадью $1/25 \text{ мм}^2$) сетки камеры окажется в среднем меньше одной споры, подсчитываются споры во всех 100 больших квадратах; если спор от одной до трех — в 40 квадратах (10 крестообразно расположенных на сетке четвертей квадратов) и, если спор в квадрате четыре или больше — в 10 крестообразно расположенных квадратах. Если в одном квадрате спор слишком много (невозможно точно сосчитать), то суспензию следует разбавить.

Зная объем одного квадрата ($1/250 \text{ мм}^3$), нетрудно вычислить количество спор в 1 мм^3 , а потом — во всем объеме суспензии, т. е. общее количество спор. Для обработки одной пробы спор (вместе с вычислениями) необходимо 40—60 мин. Для ускорения работы желательно иметь 3—5 камер Горяева.

Для исследования берут только 10 капель суспензии, несмотря на объем (50 или 500 мл). Чтобы убедиться, что количество достаточное, можно определить вероятность полученного результата по формуле:

$$t = \frac{\bar{x}}{\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}} = \frac{\bar{x}}{\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{90}}},$$

где \bar{x} — среднее (из десяти исчислений) количество спор, а x_i — число спор при каждом исчислении. Полученная цифра сравнивается с таблицей t -распределения по Стьюдену. В наших наблюдениях почти всегда вероятность результата была больше 99%.

При сравнении данных о продукции спор разных плодовых тел нужно учитывать площадь гименофора и гимения данного плодового тела и количество спор на 1 см^2 того и другого.

Для выяснения зависимости споруляции от метеорологических условий около изучаемых плодовых тел устанавливается (не позже чем за 24 ч до начала изучения) термограф и гигрограф.

Особенно интересные данные можно получить при изучении суточной динамики споруляции и трутовых грибов. Известно, что гербарные экземпляры многих видов (особенно многолетних) трутовых грибов иногда не имеют развитых базидий и спор даже в том случае, если они собраны во время споруляционного периода. Объяснение такому странному явлению было получено при изучении суточной динамики количества выделенных спор: летом в сухую погоду некоторые (возможно, что и многие) виды, например, *Fomes fomentarius* (Fr.) Fr.,

спорулируют вечером и ночью. Следовательно, самое хорошее время для сбора гербарного материала таких видов — раннее утро и поздний вечер.

Для выяснения приблизительной картины динамики споруляции в течение суток можно применять и значительно менее точный, но сравнительно малотрудоемкий метод ловли спор предметными стеклами. Как показал опыт, целесообразно ставить предметное стекло под гименофор гриба дважды в час на 30 мин. Количество выделенных спор указывается в пересчете: число спор на 1 мм² в час. Для получения в какой-то мере сравнимых данных рекомендуем предметное стекло всегда ставить на расстоянии примерно 0,5 см от гименофора.

Для получения более точных данных необходимо пользоваться описанной выше методикой количественного учета спор. В наших опытах обычно количество спор, выделенных в течение 30 мин, определялось через каждые 2 ч. Одна серия наблюдений продолжалась не менее 36 ч и требовала участия четырех человек (работающих попарно). При достаточной привычке можно одновременно собирать пробы спор у 5—10 экземпляров, находящихся недалеко друг от друга.

ЛИТЕРАТУРА

- Бондарцев А. С., 1936. Наблюдения над выбрасыванием спор трутовиком *Glyphoderma applanatum* (Pers.) Pat. Сов. ботаника 1936 (6) : 144—149.
- Микалайкевичус В. М., 1959. Сердцевинная гниль осины в лесах Литовской ССР. Автореф. канд. дисс. Вильнюс.
- Пармasto Э., 1955. Трутовые грибы зеленых насаждений Эстонской ССР. В кн.: Рефер. докл. науч.-коорд. совещ. по защите зеленых насаждений от вредителей и болезней. М.
- Пармasto Э. Х., 1958. Развитие плодовых тел и споруляция трутовых грибов. Изв. АН ЭССР. Сер. биол. 7 (2) : 83—93.
- Пармasto Э. Х., 1959. Трутовые грибы Эстонской ССР. Тр. Ботан. ин-та АН СССР 12 : 213—273.
- Ромейс Б., 1953. Микроскопическая техника. М.
- Bjørnekaer K., 1938. Undersøgelser over nogle danske Poresvampes Biologi med særligt Hensyn til deres Sporefaelding. Friesia 2 (1) : 1—41.
- Mikelaikėvičius V., 1958. Kai kurie drebulinės pinties (*Phellinus tremulae* Bond. et Boriss.) biologijos klausimai. Lietuvos Mišku Ūkio Mokslinio Tyrimo Instituto Darbai 3 : 187—203.
- Parmasto E., 1956. Juurepessu (*Fomitopsis annosa*) biologiast. ENSV TA Toimet., Biol. 5 (3) : 256—261.
- Riley C. G., 1952. Studies in Forest Pathology. IX. Fomes igniarius Decay of Poplar. Canad. J. Bot. 30 (6) : 710—734.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
16/XII 1968

E. PARMASTO

TORIKULAADSETE LEVIMINE KANDEOSTEGA

1. Torikuliste sporulatsiooni uurimise meetodika

Resümee

Esitatakse juhendid torikuliste sporulatsiooni kvalitatiivse ja kvantitatiivse külje uurimiseks seostatuna meteoroloogiliste vaatlustega. Kirjeldatakse sporulatsioonifenoloogia jälgimist tumedale läikpaberile langeva eostekirme järgi ja alusklaasile kogunevate eoste mikroskopeerimise teel, ööpäeva (või lühema ajavahemiku) jooksul viljakehast eralduvate eoste hulga määramist ning ööpäevase sporulatsiooni dünaamika selgitamist.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
16. XII 1968

E. PARMAS TO

ON THE DISPERSAL OF APHYLLOPHORACEOUS FUNGI BY BASIDIOSPORES

I. Methods for investigation of polyporaceous fungi

Summary

In the study of the decay of timber and living trees, inconsiderable attention has been paid hitherto to three essential questions that are discussed in the beginning series of articles: 1) the forming of fruit-bodies of Polyporaceous and other Aphylloporaceous fungi, production of spores and sporulation; 2) dispersal of spores; 3) infection of wood under natural conditions.

The main obstacle in the study of the first problem was the weakness of relevant methodology; the present article deals with methodological devices applied by the Institute of Zoology and Botany of the Academy of Sciences of the Estonian SSR in 1953—1955 and since 1966, which have proved efficient.

Study of sporulation phenology by visual estimation of the abundance of spores (K. Bjørnekaer's method supplemented by the present author). — Under the hymenophore of the fruit-body, a disc of dark glossy paper is placed, lying in a tin bottle-stopper (capsule) put upon the hollow end of a thin sheet-iron strip nailed to the tree-stem (Figs 1 and 2). Even in case of minimal sporulation, the disc will be covered with a thin coating, discernible by visual methods. The thickness of the coating is estimated according to a three-point scale. The stopper-capsule with the disc is exchanged for another one every day, or every 2 days, or once a week. For the determination of meteorological factors, a weekly thermograph and a weekly hygrograph are used; the amount of the precipitation is also recorded.

Study of sporulation phenology by microscoping spores that have fallen on a glass slide. That method is much more labour-consuming and complicated than the previously described one. It is possible to count precisely the detached spores, but that precision may prove misleading since but a very inconsiderable part of the spores (in the case of an experiment conducted on *Polyporus squamosus* Fr. — less than 4 per cent) reaches the slide.

Determination of the amount of spores discharged from the fruit body. The lower side of the fruit-body is surrounded by compact paper (tracing-paper, thin parchment-paper), sackwise, attached to the edges of the fruit-body and to the tree with adhesive tape (Fig. 4). After a lapse of 24 hours, the paper together with the spores fallen into the "sack" is placed into a polyethylene baglet and taken to the laboratory, where it is put into a refrigerator. The amount is determined haemocytometrically, in a spore-suspension that has been washed into a definite amount of water. The author of the article describes the technical devices used and presents a formula for determining the probability degree of the result of the spore count. For obtaining comparative data, the total amount of spores is recalculated to the amount per square mm of hymenium and of horizontal projection of the hymenophore of the fruit-body.

The study of the diurnal dynamics of sporulation was effected by a quantitative determination of the amount of spores discharged in 30 minutes, carried out every 2 hours by the above-described method. For an approximate assessment of the process of the diurnal sporulation, the slide-method suits best. The slide is placed at a distance of about 0.5 cm under the hymenophore, and it is replaced every 30 minutes. The spores are counted, with the help of the microscope, by tens, always in the same sample field. The index of sporulation is recalculated as the number of spores fallen on a square millimetre of the slide within one hour.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and Botany

Received
Dec. 16, 1968