

УДК 630.443 : 595.7

© 2012 К. В. Давиденко¹, В. Л. Мешкова²

¹. ДСЛП «Східлісозахист», ². Український НДІ лісового господарства та
агралісомеліорації ім. Г. М. Висоцького

МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ ОЦІНЮВАННЯ ПАТОГЕННОГО ВПЛИВУ ОФІОСТОМОВИХ ГРИБІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ КОРОЇДАМИ, НА САДЖАНЦІ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Наведено методичні підходи щодо визначення видового складу офіостомових грибів, пов'язаних із короїдами (*Circulionidae: Scolytinae*), та підтвердження постулатів Коха щодо можливості перенесення короїдами цих грибів. Розглянуто методики виділення грибів із поверхні жукув і саджанців, визначення видового складу грибів, зараження саджанців сосни міцелієм грибів та шляхом підсаджування контамінованих жукув на рослини, показники впливу на саджанці.

Ключові слова: офіостомові гриби, короїди, сосна звичайна.

Вступ. Штучні насадження сосни звичайної, особливо створені на зрубках і згарищах, часто пошкоджуються комахами та збудниками хвороб, причому ці чинники можуть підсилювати дію один одного [2, 3, 6, 11]. Зокрема, стовбурові комахи при додатковому живленні та заселенні дерев і лісової продукції створюють умови для поширення збудників хвороб, що призводить до ослаблення життєздатних дерев і погіршення якості лісової продукції [9, 13, 14].

Більшість досліджень взаємного впливу стовбурових комах і збудників хвороб стосуються грибів, які спричиняють синяву деревини (так званих *blue-stain fungi*) та належать до офіостомових грибів родів *Ceratocystis*, *Ceratocustioptosis*, *Ophiostoma*, *Grosmantia* [12, 14, 23, 25]. Протягом десятків років гриби цієї групи, незважаючи на відомі факти факультативного паразитизму, вважали видами з лише сапротрофним способом життя. Останнім часом було доведено на основі молекулярних досліджень і вивчення патогенезу, що деякі види офіостомових грибів спричиняють судинні мікози листяних і хвойних порід, уражують провідну систему живих дерев, що призводить до швидкого всихання листяних і хвойних лісів у Європі, Північній Америці [9, 12, 14, 23], Сибіру [7]. Офіостомовими грибами спричинені, зокрема, голландська хвороба ільмових і трахеомікоз дуба, які викликають швидку загибель листяних насаджень [9]. Один із найбільш агресивних видів, первинний патоген ялини *Ceratocystis polonica* (Siem.), спричиняє відпад ялини на значних площах протягом короткого часу [19, 23].

В Україні дослідження особливостей взаємодії стовбурових комах і збудників хвороб та їх спільної ролі в ослабленні дерев і погіршенні якості лісової продукції розпочаті порівняно нещодавно. Так, удосконалені існуючі та запропоновані нові методичні підходи до вивчення біологічних особливостей і рівня шкідливості стовбурових комах у різних видах субстрату (живих деревах, гілках, колодах, пнях тощо) [4]. У межах шведсько-українського проекту, пов'язаного з вивченням лісовідновлення й захисту лісу на згарищах, було встановлено, що шість видів короїдів (*Carphoborus minimus* (Fabricius, 1798), *Hylastes angustatus* (Herbst, 1793), *Hylastes ater* (Paykull, 1800), *Hylastes opacus*

(Erichson, 1836), *Hylurgus ligniperda* (Fabricius, 1787), *Ips sexdentatus* (Boerner, 1767), *Orthotomicus laricis* (Fabricius, 1792) та *Orthotomicus suturalis* (Gyllenhal, 1827), шість видів вусачів (*Monochamus galloprovincialis* (Olivier, 1795), *Pogonocherus fasciculatus* (Degeer, 1775), *Acanthocinus griseus* (Fabricius, 1792), *Acanthocinus aedilis* (Linnaeus, 1758), *Rhagium inquisitor* (Linnaeus, 1758) та *Molorchus minor* (Linnaeus, 1767) і два види златок (*Chrysobothris igniventris* (Reitter, 1895) та *Antaxia quadripunctata* (Linnaeus, 1758) можуть бути переносниками офіостомових грибів [17, 18, 22]. Водночас методи кількісного оцінювання спільного впливу комах і збудників хвороб на санітарний стан дерев і якість лісової продукції розроблені недостатньо, хоча це є важливим для обґрунтування проведення лісогосподарських і лісозахисних заходів.

Згідно з постулатами Коха, для доказу того, що організм є збудником певної хвороби, необхідно довести такі постулати: гриб виявлено у хворих рослинах; при зараженні чистою культурою гриба виникає хвороба здорової рослини; гриб може бути ізолюваний із експериментально зараженої рослини [15].

У зв'язку з цим, метою наших досліджень було уточнення методичних аспектів визначення видового спектра офіостомових грибів, пов'язаних із короїдами (Curculionidae: Scolytinae), та підтвердження постулатів Коха щодо можливості перенесення короїдами цих грибів і оцінювання рівня їх патогенності для сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.).

Матеріали й загальні методичні підходи. Згідно з метою дослідження, нами було проаналізовано публікації [5, 13, 14, 20, 23, 25] та апробовані й адаптовані до завдань досліджень доступні для виконання підходи.

Польові дослідження проведені у лісових культурах сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) віком до 25 років у Луганській, Донецькій і Харківській областях, а камеральні – в лабораторії захисту лісу Українського НДІ лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г. М. Висоцького і на Державному спеціалізованому лісозахисному об'єднанні "Східлісозахист" у 2009 – 2012 рр.

У дослідях з оцінювання виявленого різноманіття офіостомових грибів при вирощуванні на селективному середовищі використовували по 196 особин жуків *Ips acuminatus* (Gyllenhal, 1827) та *Tomicus minor* (Hartig, 1834), які заселяють дерева сосни в області тонкої кори [9]. У дослідях щодо виявлення можливості перенесення комахами офіостомових грибів і визначення рівня їх патогенності для сосни використано по 288 жуків коренежилів *Hylastes angustatus* (Herbst, 1793) і *H. ater* (Paykull, 1800), які здійснюють додаткове живлення на молодих деревах сосни [6] та спроможні переносити гриби рр. *Ophiostoma* і *Ceratocystis* [1, 17].

Згідно із метою досліджень, основні розроблювані методичні підходи включали:

- визначення видового складу грибів, пов'язаних із короїдами;
- експериментальне зараження саджанців сосни звичайної;
- ізоляцію грибів із саджанців із ознаками хвороби та їх ідентифікацію;
- оцінювання прояву шкідливої дії виділених грибів на саджанцях сосни.

Результати. Видовий склад грибів, виділених як із короїдів, так і з інокульованих саджанців, визначали за допомогою молекулярних технологій та ізолюванням грибів у чисту культуру. При використанні молекулярних методів геномну ДНК екстрагували СТАВ-буфером (2М Tris, 5 М NaCl, 0,5 М EDTA, 5 % СТАВ) [21], очищували хлороформ-ізопропаноловою сумішшю і залишали при кімнатній температурі протягом однієї години. Після цього проводили центрифугування при 10000 об. / хв. протягом 15 хвилин, супернатант без інтерфази переносили у чисті пробірки. ДНК осаджували ізопропанолом при кімнатній температурі протягом 2–10 годин. Після цього проводили центрифугування

при 12000 об./хв. протягом 10 хв. для видалення супернатанту, осад підсушували і розчиняли його у 30 мкл води [19, 21, 24].

При використанні методу вкладеної ПЦР (*nested PCR* (англ.) застосовували дві пари праймерів і проводили дві послідовні реакції. Для першої реакції застосовували грибні праймери NLC2 (GAGCTGATT CCCAAACAACCTC) та NSA3 (AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA) та проводили ампліфікацію за таких умов: 1) 94°C — 5 хв.; 2) 94°C — 30 сек.; 68°C — 30 сек.; 72°C — 45 сек. — усього 35 циклів; 3) 72°C — 10 хв. Ампліфікацію ДНК 18S, 25S і ITS всередині ампліфікованої ділянки продукту першої реакції проводили з використанням другої пари неспецифічних грибних праймерів ITS 1F (СТТGGTCATTTAGAGGAAGTAA) та ITS4 (TCCTCCG°СТТАТТGАТATGC). Для другої реакції змінювали лише температуру віджигу праймерів з 68 на 55°C. Реакційна суміш для ампліфікації складалася із 0,2 мкл праймерів (прямого і зворотного); 1,5 мкл dNTP; 1,5 мкл буфера; 0,45 MgCl₂ та 0,1 мкл полімерази (DreamTaq, Fermentos); 9,9 мкл води та 1,15 мкл ДНК. Загальний об'єм реакційної суміші становив 15 мкл. Електрофорез проводили в 1 % агарозному гелі, детекцію ДНК здійснювали в УФ-світлі [19, 24].

Для ізоляції офіостоматоїдних грибів у чисту культуру використовували звичайні та селективні середовища на основі солодового агару з додаванням суміші антибіотиків, які пригнічують розвиток дріжджових і цвілевих грибів, у т. ч. видів р. *Trichoderma* Pers. Для цього відбирали по 196 *Ips acuminatus* та *Tomicus minor*, причому 98 особин використовували для прямого секвенування, а 98 для ізолювання грибів методом викладення на селективне (з додаванням антибіотиків) та неселективне середовище. Антибіотики додавали з розрахунку 200 µg/ml хлорамфеніколя, 100 µg/ml стрептоміцин сульфату і 400 µg/ml циклогексаміда [12, 20]. За ростом колоній грибів спостерігали протягом місяця, кожну колонію ізолювали в чисту культуру шляхом перенесення кінчиків гіф міцелію у стерильну чашку Петрі із середовищем без антибіотиків. Отримані культури розподіляли за морфотипами за допомогою світлового мікроскопа Leica DM LS з цифровим зображенням. Кожен морфотип використовували для визначення виду за морфологічними ознаками або молекулярними методами.

Види грибів ідентифікували за морфологічними ознаками спораношень, використовуючи визначник грибів [25] і дані електронної бази Fungal Databases Nomenclature and Species Banks Online Taxonomic Novelties Submission (Mycobank: URL: <http://www.mycobank.org>), Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Fungal Databases (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm>). При проведенні молекулярних дослідів отриману послідовність ділянки ДНК виду ідентифікували методом порівняння з базою даних генного банку NCBI (Fungal Databases of National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [8].

Аналіз отриманих даних свідчить, що використання селективного середовища для культивування грибів призводить до зменшення часток дріжджових і пліснявих грибів і не впливає негативно на ріст офіостомових грибів і (табл. 1). Так, при додаванні антибіотиків у середовище частка офіостомових грибів, ізольованих із *I. acuminatus*, вища в 3,1 разу, а ізольованих із *T. minor* — у 2,1 разу порівняно з середовищем без антибіотиків.

Додавання антибіотиків у середовище перешкоджає, зокрема, поширенню таких "небезпечних" видів як *Trichoderma sp.*, яка завдяки швидкому росту на середовищі навіть за наявності 1–2 спор переростає види з повільним ростом, швидко займає всю поверхню чашки Петрі, що позбавляє можливості ізолювати інші види грибів у чисту культуру.

Використання антибіотиків призводить до уповільнення або припинення розвитку мукових грибів та *Aspergillus sp.*, які швидко розростаються протягом кількох днів, утворюючи спорангії з кількома тисячами спор у кожному, що запобігає ізолюванню інших видів у чисту культуру. Додавання антибіотиків уповільнює також ріст і розвиток

дріжджових і пліснявих грибів, у зв'язку з чим з'являється можливість швидше ізолювати офіостомові гриби. Таким чином, селективне середовище доцільно використовувати при визначенні різноманітності офіостомових грибів, пов'язаних із короїдами.

Проведені дослідження свідчать, що використання молекулярних технологій дає можливість визначити в 1,3–1,4 разу більше видів грибів, асоційованих із короїдами, ніж за методом чистих культур. Зокрема молекулярним аналізом виявлено у 7 і 1,7 разу більше базидіальних із *I. acuminatus* та *T. minor* відповідно порівняно з методом чистих культур (див. табл. 1).

Експериментальне зараження саджанців сосни звичайної здійснювали як безпосередньо міцелієм відповідних штамів грибів із чистої культури, так і шляхом підсаджування жуків, контамінованих цими грибами з поверхні.

За першим підходом по десять 3-річних саджанців сосни звичайної інокулювали міцелієм відповідних штамів із чистої культури, а 10 контрольних саджанців — шматочками стерильного агару.

1. Поширеність грибів різних груп при різних методах їх ізолювання із жуків *Ips acuminatus* та *Tomicus minor* (кількість отриманих видів / частка від загальної кількості видів, %)

Групи грибів	Ізолювання на середовищі				Ідентифікація молекулярним методом		Загальна кількість	
	селективному		неселективному		I. acuminatus	T. minor	I. acuminatus	T. minor
	I. acuminatus	T. minor	I. acuminatus	T. minor				
Офіостомові	<u>44</u> 46,32	<u>37</u> 27,01	<u>14</u> 15,38	<u>19</u> 12,67	<u>23</u> 20,18	<u>42</u> 22,58	<u>81</u> 27,00	<u>98</u> 20,72
Дріжджі	<u>6</u> 6,32	<u>8</u> 5,84	<u>8</u> 8,79	<u>11</u> 7,33	<u>32</u> 28,07	<u>59</u> 31,72	<u>46</u> 15,33	<u>78</u> 16,49
Плісняві	<u>29</u> 30,53	<u>31</u> 22,63	<u>25</u> 27,47	<u>34</u> 22,67	<u>3</u> 2,63	<u>14</u> 7,53	<u>57</u> 19,00	<u>79</u> 16,71
<i>Trichoderma</i> sp.	<u>2</u> 2,10	<u>3</u> 2,19	<u>16</u> 17,58	<u>29</u> 19,33	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0	<u>18</u> 6,00	<u>32</u> 6,77
<i>Aspergillus</i> sp.	<u>0</u> 0	<u>1</u> 0,73	<u>4</u> 4,40	<u>12</u> 8,00	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0	<u>4</u> 1,33	<u>13</u> 2,75
<i>Mucor</i> sp.	<u>0</u> 1	<u>4</u> 2,92	<u>6</u> 6,59	<u>19</u> 12,67	<u>4</u> 3,51	<u>0</u> 0	<u>10</u> 3,33	<u>23</u> 4,86
Basidiomycota	<u>1</u> 1,05	<u>3</u> 2,19	<u>0</u> 0	<u>4</u> 2,67	<u>8</u> 7,02	<u>7</u> 3,76	<u>9</u> 3,00	<u>14</u> 2,96
Сапрофіти (<i>Chaetomium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. etc.)	<u>8</u> 8,42	<u>23</u> 16,79	<u>12</u> 13,19	<u>16</u> 10,67	<u>7</u> 6,14	<u>26</u> 13,98	<u>27</u> 9,00	<u>65</u> 13,74
Інші види	<u>0</u> 0	<u>19</u> 13,87	<u>0</u> 0	<u>1</u> 0,67	<u>21</u> 18,42	<u>21</u> 11,29	<u>21</u> 7,00	<u>41</u> 8,67
Невизначені види	<u>5</u> 5,26	<u>8</u> 5,84	<u>6</u> 6,59	<u>5</u> 3,33	<u>16</u> 14,04	<u>17</u> 9,14	<u>27</u> 9,00	<u>30</u> 6,34
Загальна кількість	<u>95</u> 100	<u>137</u> 100	<u>91</u> 100	<u>150</u> 100	<u>114</u> 100	<u>186</u> 100	<u>300</u> 100	<u>473</u> 100

За другим підходом для підтвердження можливості перенесення офіостомових грибів жуками на кожен саджанець підсаджувати по 5 живих жуків-коренежилів роду *Hylastes*, яких попередньо на одну годину вміщували у чашку Петрі з міцелієм відповідного виду гриба. У цих дослідах використовували потомство жуків, які були виловлені у насадженнях і згідно з розробленою нами методикою [4] підселені у лабораторних умовах у колоди та гілки, котрі не мали ознак поширення офіостомових грибів. У контролі п'ять живих жуків викладали на селективне середовище для визначення видового складу грибів на поверхні та виключення цих грибів із розрахунків.

Саджанці оглядали через 1,5–2 місяці після інокуляції, реєстрували наявність і кількість пошкоджень, заподіяних жуками при додатковому живленні, та некрозів, спричинених розвитком грибів. Оцінювали санітарний стан кожного саджанця, реєстрували кількість некрозів і вимірювали їх довжину.

Для виявлення видового складу грибів у саджанцях, як інокульованих міцелієм, так і ушкоджених контамінованими жуками, а також підтвердження факту перенесення збудників жуками вирізали з кожного саджанця на 3–5 мм вище місця розташування некрозу шматок деревини розміром 1 × 2 мм та вміщували у стерильну пробірку (типа Епіндорф). З метою запобігання росту контамінантної мікрофлори у лабораторних умовах поверхню зразків стерилізували у 96 %-му етиловому спирті, потім протягом 1 хвилини у 5 %-му розчині гіпохлората натрію і промивали у спирті, а потім підсушували та викладали на селективне агарове середовище.

Протягом чотирьох тижнів спостерігали за ростом колоній грибів для визначення наявності або відсутності певних видів у досліджуваному зразку.

Рівень патогенності офіостомових грибів оцінювали за розміром некрозів на стовбурцях, а також за розподілом уражених саджанців за показниками росту (діаметром кореневої шийки, висотою, приростом у висоту) й санітарним станом.

Використання зазначених методичних підходів дало змогу експериментально довести патогенність офіостомових грибів *Ophiostoma ips*, *O. picea*, *O. nigrocarpum*, *O. minus*, виділених із коренежилів (*Hylastes angustatus*, *Hylastes ater*) [1, 5, 10] для 2–3-річних саджанців сосни звичайної, на яких ці жуки здійснюють додаткове живлення.

Висновки. Уточнено методичні підходи щодо визначення видового складу та патогенності офіостомових грибів, пов'язаних із короїдами (Curculionidae: Scolytinae), а також підтвердження постулатів Коха щодо можливості перенесення комахами цих грибів і визначення показників їх патогенності для сосни звичайної. Схема досліджень включає виділення грибів із поверхні жуків, визначення видового складу грибів, виділення офіостомових грибів у чисті культури, експериментальне зараження саджанців сосни звичайної безпосередньо міцелієм грибів та опосередковано шляхом підсаджування контамінованих жуків на рослини, ізоляцію грибів із саджанців, визначення видового складу виділених грибів, вимірювання розмірів некрозів на стовбурцях, оцінювання санітарного стану та показників росту саджанців.

Бібліографічний список: 1. Давиденко Е. В. Комплекс грибів семейства *Ophiostomatacea*, переносимих двумя видами корнежилов в культурах сосны обыкновенной Левобережной Украины Е. В. Давиденко // Болезни и вредители в лесах России: век XXI. Материалы Всероссийской конф. с международным участием и V ежегодных чтений памяти О. А. Катаева. Екатеринбург, 20–25 сентября 2011 г. — Красноярск: ИЛ СО РАН. — 2011. — С. 42–44. 2. Давиденко К. В. Збудники хвороб хвої у соснових культурах Харківської області / К. В. Давиденко, В. Л. Мешкова // Біологічне різноманіття і сучасна стратегія захисту рослин: Матеріали міжнарод. наук.-практ. конференції до 90-річчя з дня народження д. б. н. проф. Б. М. Літвінова. — Х.: ХНАУ. —

2011. — С. 40–41. **3. Давиденко К. В.** Поширеність збудників хвороб хвої та пагонів в однорічних соснових культурах Харківської області / К. В. Давиденко, В. Л. Мешкова, // Вісник ХНАУ (Серія «фітопатологія та ентомологія»). — 2011. — № 9. — С. 57–62.
- 4. Мешкова В. Л.** Методические аспекты изучения стволовых насекомых / В. Л. Мешкова, К. В. Давиденко, О. Н. Кукина, И. Н. Соколова, Ю. Е. Скрыльник // Известия С-ПЛТА. — СПб., 2009. — Вып. 187. — С. 201–209. **5. Мешкова В. Л.** Офиостомовые грибы, переносимые короedами-корнежилами в сосновых культурах Левобережной Украины / В. Л. Мешкова, Е. В. Давиденко // Изв. Санкт-Петербургской ЛТА. — СПб, 2012. — Вып. 200. — С. 106–113. **6. Мешкова В. Л.** Энтомологические проблемы на вырубках и гарях в сосновых лесах Лесостепи и Степи Украины / В. Л. Мешкова // Вестник Московского государственного университет леса. "Лесной вестник". — 2009. — № 5 (68). — С. 72–79. **7. Пашенова Н. В.** Изучение грибов синевы древесины в хвойных лесах Центральной Сибири / Н. В. Пашенова, Г. Г. Полякова, Е. Н. Афанасова // Хвойные бореальной зоны. — 2009. — XXVI, № 1. — С. 22–28.
- 8. Altschul S. F.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman // Nucleic Acids Res. — 1997. — Vol. 25. — P. 3389–3402. **9. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a synthesis** /ed. by F. Lieutier, K. R. Day, A. Battisti, J.-C. Gregoire, H. F. Evans. — Dordrecht-Boston-London: Kluwer Acad. publishers, 2004. — 570 pp. **10. Davydenko K.** Fungi associated with bark-beetle *Hylurgus ligniperda* in pine forest of Steppe zone of the Left-bank Ukraine / K. Davydenko, V. Meshkova, A. Menkis, R. Vasaitis // Abstracts of joint IUFRO 7.03.06 "Integrated management of forest defoliating insects" and 7.03.10 "Methodology of forest insect and disease survey" Working Party Meeting. Palanga, Lithuania, 10–14 September 2012. — P. 23. **11. Davydenko K.** Insect and Fungi in Pine plantations in Burnt areas and Clear-cuts / K. Davydenko // Delb, H., Pontuali, S.(eds.): Biotic Risks and Climate Change in Forests. Proceedings of the Working Party 7.03.10 Methodology of Forest Insect and Disease Survey in Central Europe, 10th Workshop September 20th-23rd, 2010, Freiburg, Germany. BerichteFreiburger Forstliche Forschung. — 2011. Heft 89. — FVA. — P. 91–95. **12. Harrington T. C.** The *Ceratocystis* species on conifers / T. C. Harrington , M. J. Wingfield // Can. J. Bot. — 1998. — Vol. 76. — P. 1446–1457. **13. Jankowiak R.** Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedling // Annals of Forest Science. — 2006. — Vol. 63. — P. 801–808. **14. Kirisits T.** Fungi isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus* in the Białowieża forest in north-eastern Poland /T. Kirisits // Forest Pathology. — 2010. — Vol. 40. — P. 100–110. **15. Koch R.** Über die Milzbrandimpfung. Eine Entgegnung auf den von Pasteur in Genf gehaltenen Vortrag // R. Koch. — Leipzig 1882, Verlag von Georg Thieme //Gesammelte Werke von Robert Koch (Band 1) /J. Schwalbe. — S. 207–231. **16. Krokene P.** Pathogenicity of four blue-stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles / P. Krokene, H. Solheim // Phytopathology. — 1998. — Vol. 88. — P. 39–44. **17. Kukina O.** Bark Beetles of Genus *Hylastes* and Fungal Community on Pine Seedlings in the burnt area / O. Kukina, Y. Skrylnyk, V. Meshkova, A. Menkis, J. Stenlid, R. Vasaitis // IUFRO WP 7.03.05: Novel risks with bark and wood boring insects in broadleaved and conifer forests, 7–9 September 2011, Sopron, Hungary. — Sopron, Hungary. — 2011. — P. 23. **18. Meshkova V.** Fungal community of *Orthotomicus suturalis* in fire-damaged pine stands (*Pinus sylvestris* L. and *P. nigra pallasiana* (Lamb.) Holmb) of the Left-bank Ukraine / V. Meshkova, K. Davydenko, A. Menkis, R. Vasaitis // Abstracts of joint IUFRO 7.03.06 "Integrated management of forest defoliating insects" and 7.03.10 "Methodology of forest insect and disease survey" Working Party Meeting. Palanga, Lithuania, 10–14 September 2012. — P. 7–8. **19. Persson, Y.** Fungi vectored by the bark beetle *Ips typographus* following hibernation under the bark of standing trees and in the

forest litter /Y. Persson, R. Vasaitis, B. Långström, P. Öhrn, K. Ihrmark, J. Stenlid // *Microbial Ecology*. — 2009. — Vol. 58. — P. 651–659. **20. Reay S. D.** A survey of *Ophiostoma* species vectored by *Hylastes ater* to pine seedlings in New Zealand / S. D. Reay, J. M. Thwaites, R. L. Farrell // *Forest Pathology*. — 2005. — Vol. 35(2). — P. 105–113. **21. Rogers O.** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / O. Rogers, A. J. Bendich // *Plant Molecular Biology*. — 1985. — Vol. 5. — P. 69–76. **22. Skrylnyk Y.** Insect-fungi associations in pine stands of Kharkov region of Ukraine / Y. Skrylnyk, O. Kukina, V. Meshkova, A. Menkis, J. Stenlid, R. Vasaitis // IUFRO WP 7.03.05: Novel risks with bark and wood boring insects in broadleaved and conifer forests, 7–9 September 2011, Sopron, Hungary. — P. 32. **23. Solheim H.** Fungi associates with the spruce bark beetle *Ips typographus* in an endemic area in Norway / H. Solheim // *Scandinavian Journal of Forest Research*. — 1993. — Vol. 8. — P. 118–122. **24. White T. J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics /T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. W. Taylor // M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. — Academic Press, San Diego, USA. 1990. — P. 315–322. **25. Wingfield M. J.** *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity / M. J. Wingfield, K. A. Seifert, J. F. Webber (eds.) // *American Phytopathological Society Press*, St Paul, MN, USA. 1993. — 304 pp.

UDC 630.443 : 595.7

Davydenko K. V., Meshkova V. L. Methodical aspects of evaluation of pathogenic influence of Ophiostomatoid fungi, associated with bark beetles, on *Pinus sylvestris* L. seedlings // The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series «Phytopathology and Entomology». — 2012. — № 11 — P. 57–63.

Methodical approaches on species identification of Ophiostomatoid fungi, associated with bark beetles (Curculionidae: Scolytinae), as well as confirmation of Koch's postulates on possibility of vectoring these fungi by bark beetles are presented. Methods of fungi isolation from beetles surface and seedlings, fungi identification, inoculation of pine seedlings with fungi mycelium and with fungi contaminated beetles, and indices of fungi influence on seedlings are given.

Key words: Ophiostomatoid fungi, bark beetles, *Pinus sylvestris* L.

Tab. 1. Bibl. 25.