УДК 632. 4. 01

ОНТОГЕНЕЗ МИКРОМИЦЕТА *GIBELLINA CEREALIS* PASS. *IN VITRO*

Горьковенко Вера Степановна,
д.б.н., профессор

Богословская Надежда Борисовна
аспирант
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

В статье рассматривается онтогенез микромицета *Gibellina cerealis* Pass. *in vitro*

Ключевые слова: ОНТОГЕНЕЗ, *GIBELLINA CEREALIS* PASS., *IN VITRO*, ПЕРИТЕЦИЙ, АСКИ, АСКОСПОРЫ, СТРОМА, МИЦЕЛИЙ

UDC 632. 4. 01

ONTOGENESIS OF MICROMYCETES *GIBELLINA CEREALIS* PASS. *IN VITRO*

Gorkovenko Vera Stepanovna
Dr.Sci.Biol., professor

Bogoslovskaya Nadezda Borisovna
postgraduate student
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

The article discusses the features of the pathogenesis of micromycetes *Gibellina cerealis* Pass. *in vitro*

Keywords: ONTOGENESIS, *GIBELLINA CEREALIS* PASS., *IN VITRO*, MYCELIUM, ASCI, ASCOSPORES, PERITHECIA

Одной из причин неэффективной защиты озимой пшеницы от возбудителя гибеллиноза является отсутствие единых, аргументировано обоснованных данных по условиям возникновения и особенностям патогенеза микромицета *Gibellina cerealis* Pass. на всех этапах онтогенеза как патогена, так и питающего растения [3, 7]. Большое практическое значение в разрешении этой проблемы является выявление у гриба тонких механизмов, обеспечивающих патологический процесс.

Микромицет *G. cerealis* по трофической специализации близок к облигатным паразитам, что делает крайне трудным культуральное исследование его жизненного цикла, который по этой причине практически не изучен [7]. Поэтому изучение особенности онтогенеза патогена *in vitro*, позволяет оценить его биологический потенциал при культивировании на искусственной питательной среде и определить характер последующих исследований *in vivo*.

Исследования проводились в 2011-2013 гг. в Кубанском государственном аграрном университете в лаборатории «Сертификации почвенной биоты» факультета защиты растений. В работе использован природный штамм гриба *G. cerealis*, выделенный в 2012 году в чистую культуру из поражённых тканей растений озимой пшеницы сорта Верта,

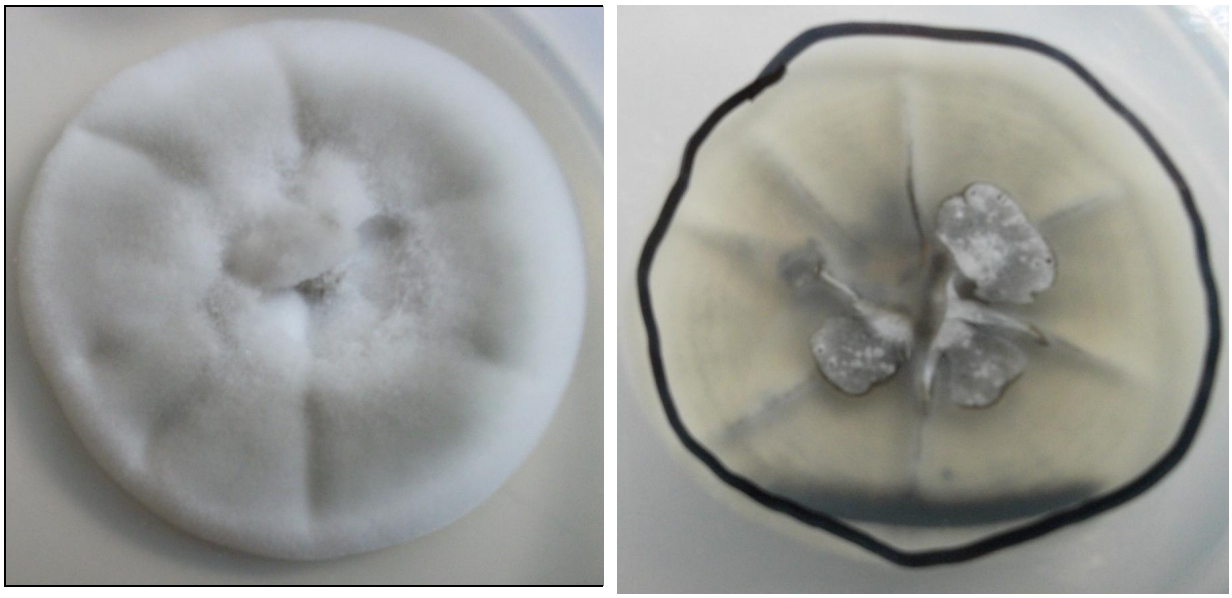
возделываемого по предшественнику горох в предприятии «Новобейсугское» Выселковского района Краснодарского края (рисунок 1).

Рисунок 1 – Изолирование микромицета *Gibellina cerealis* в чистую культуру из поражённых тканей растения озимой пшеницы (ориг.)

Изучение культуральных, морфологических признаков и репродуктивных особенностей микромицета *G. cerealis* осуществляли на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в чашках Петри в пяти кратной повторности. Культуру гриба выращивали в термостате при температуре 24 ˚С. Измерение линейного роста, характера строения и окраски колоний, описание микроструктур и интенсивность формирование телеоморфы гриба проводили с использованием методов экспериментальной микологии [1]. При описании окраски микроструктур гриба использовалась «Шкала цветов» [2,5]. Измерение мицелия, перитециев, аск, парафиз и аскоспор гриба проводили на экране проекционного микроскопа "Visopan" фирмы "Reichert". Измерения, проводимые винтовым окуляр микрометром на экране этого микроскопа, соответствуют по точности 0,01 мкм. Рисунки, выполненные на нем, из-за прямой проекции изображения на экран точны.

В результате проведенных исследований установлено, что гриб *G. cerealis* формирует белые (albus, candidus), с переходом от центра в

пепельные, пепельно-серые (cinereus, cineraceus), к краю вновь белые колонии поверхностного мицелия. Структурно колонии состоят из войлочного, шерстисто-плотного, гладкого мицелия. В центре колонии мицелий вначале несколько приподнят над субстратом, затем прижат и вновь высоко приподнят к краю колонии в зоне роста гриба. За счёт образовавшихся трещин в субстрате, колонии имеют радиальные лучи. С нижней стороны чашки Петри колонии дымчатые (fomosus), прослеживается нечёткая зональность из-за сочетания дымчатой и пепельно-серой (cineraceus) окраски. Центр колонии комковатый (рисунок 2).



1 2

Рисунок 2 –Колония микромицета *Gibellina cerealis* на КГА: верх (1) и низ (2) 14-дневной культуры (ориг.)

Диаметр колоний 14-дневной культуры микромицета *G. cerealis*, измеренный в двух взаимно перпендикулярных направлениях, в среднем составил 43±2 мм. Линейная скорость роста колоний патогена достигала 2,9-3,2 мм в сутки.

Гифы поверхностного мицелия, колонизирующие субстрат, гиалиновые, относительно толстые, 0,4-1,1 мкм, разветвленные, с

многочисленными септами. Боковые мицелиальные клетки большей частью вздутые, округлые, овальные, кегле- или бочковидной формы, с толстой оболочкой (рисунок 3).

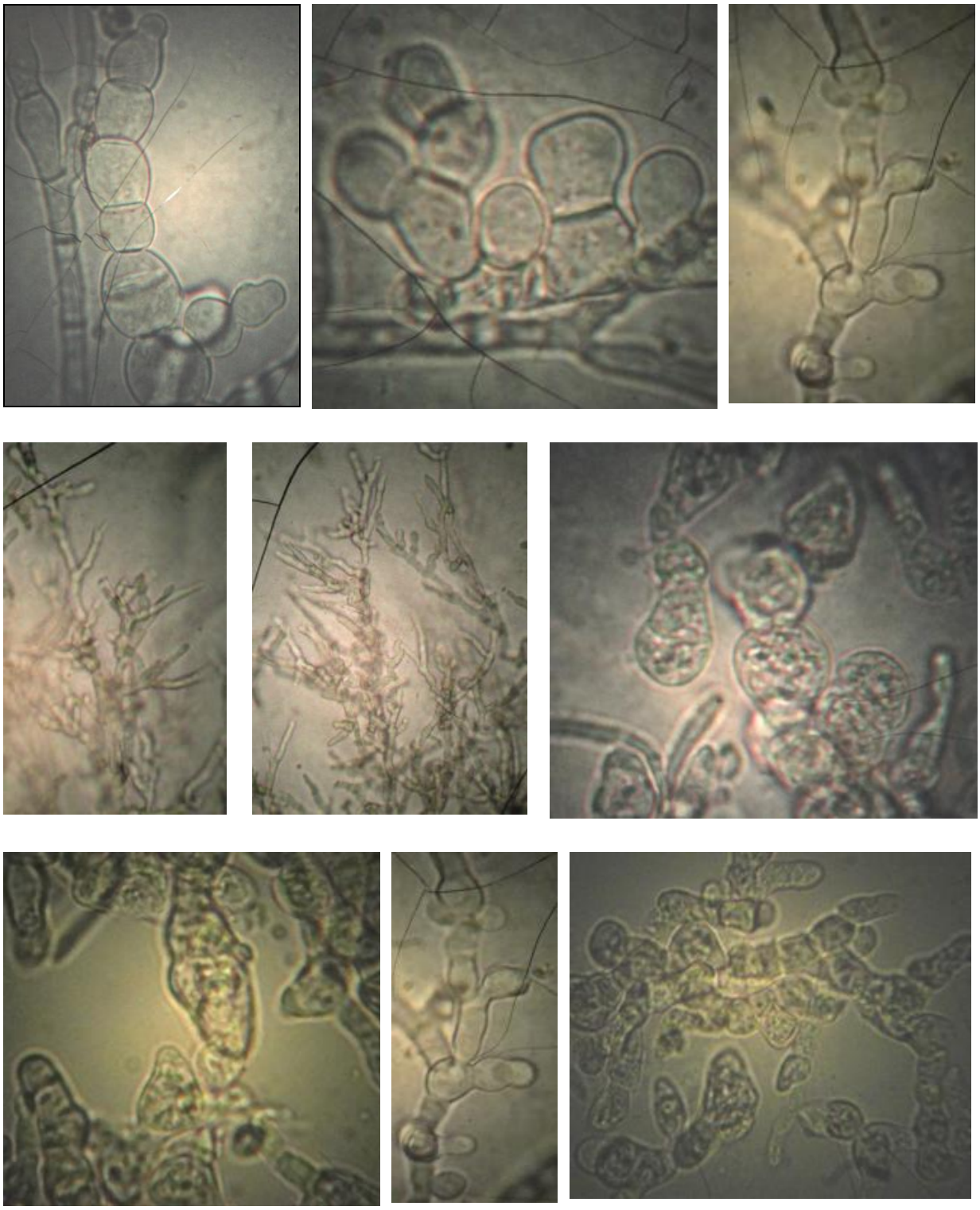


Рисунок 3 – Поверхностный мицелий микромицета *Gibellina cerealis* на КГА (ориг.)

Клетки субстратного мицелия более толстые, чем поверхностного, 8-15 мкм, с многочисленными септами, с толстой оболочкой, разнообразные по форме. Окраска субстратного мицелия в первый период культивирования гиалиновая, через 15-18 суток отдельные клетки приобретают темно-песочную (atro-arenicolor), позже коричневую (cinnamomeus) окраску. Прослежено, что некоторое количество интеркалярных и терминальных гиалиновых клеток субстратного мицелия так и не приобретали тёмную окраску даже на 45-50 день культивирования. Можно предположить, что их содержимое «перетекло» в темноокрашенные, тем самым, обогатив последние питательными веществами (рисунок 4).

В соответствии с современной таксономией [4, 6, 8, 9], патоген относится к царству *Fungi* – грибы; отделу (типу) *Ascomycota* – аскомицеты (аскомикота сумчатые грибы); классу *Sordariomycetes* (*Pyrenomycetes*) – сордариомицéтовые (пиреномицетовые); порядоку - *Incertae sedis* - «неопределённого положения» (положение таксона в системе неясно); семейству - *Magnaporthaceae*; роду - *Gibellina* – гибеллина; виду - *Gibellina cerealis* (Pass.) Pass. 1886 – гибеллина хлебная. В цикле развития микромицета имеется только телиоморфная стадия, анаморфная - не выявлена.

Отмечено, что репродуктивные органы в виде перитециев (аском) формируются на 35-40 день культивирования микромицета. Их развитию предшествовало образование мицелиального сплетения (субикулюма), на котором образовывались перитеции гриба *G. cerealis* (рисунок 5).

Перитеции образуются одиночно, полностью погруженые в мицелий и только выходным отверстием в виде хоботка выступающие на поверхность (рисунок 6). Перитеции гладкие с хорошо развитым перидием, шаровидной, иногда слегка овальной или приплюснутой формы, диаметром 360×680 мкм, чёрные (niger, ater). Верхушка перитециев имеет

длинный выводной канал (хоботок, шейка), заканчивающейся выходным отверстием – остиолюмом. Выводной канал по форме конический или

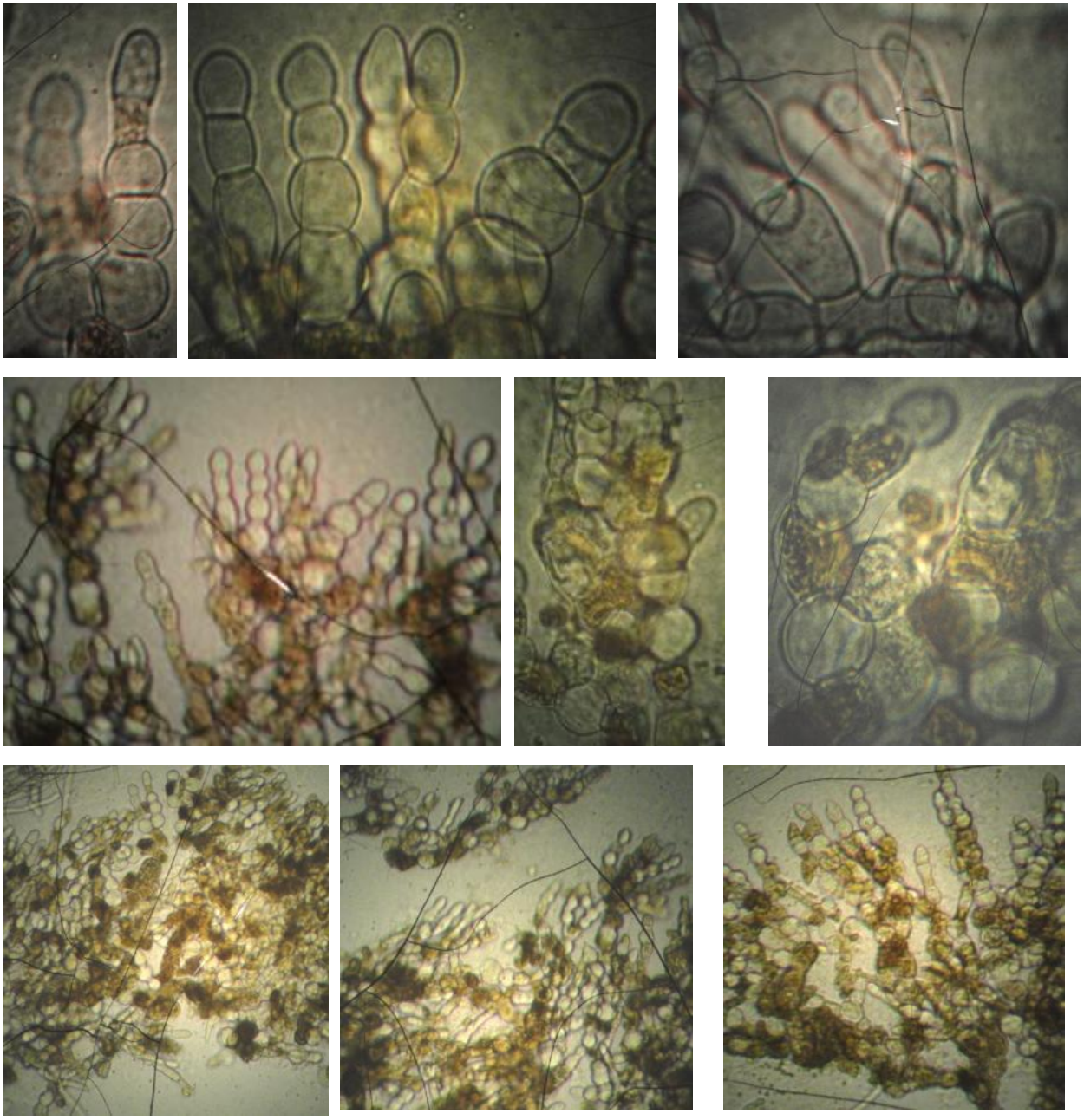


Рисунок 4 – Субстратный мицелий микромицета *Gibellina cerealis* на КГА (ориг.)

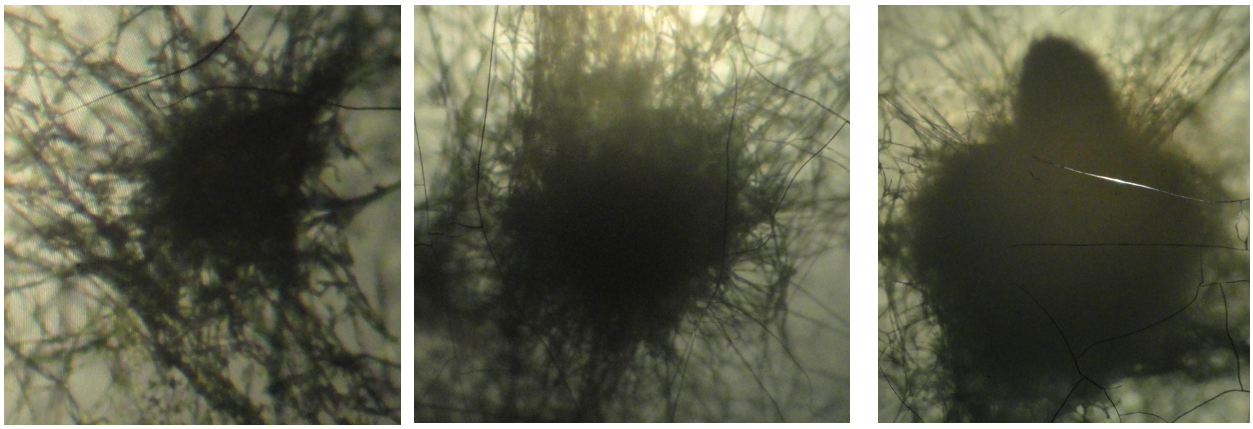


Рисунок 5 – Динамика формирования перитециев микромицета *Gibellina cerealis* на КГА (ориг.)

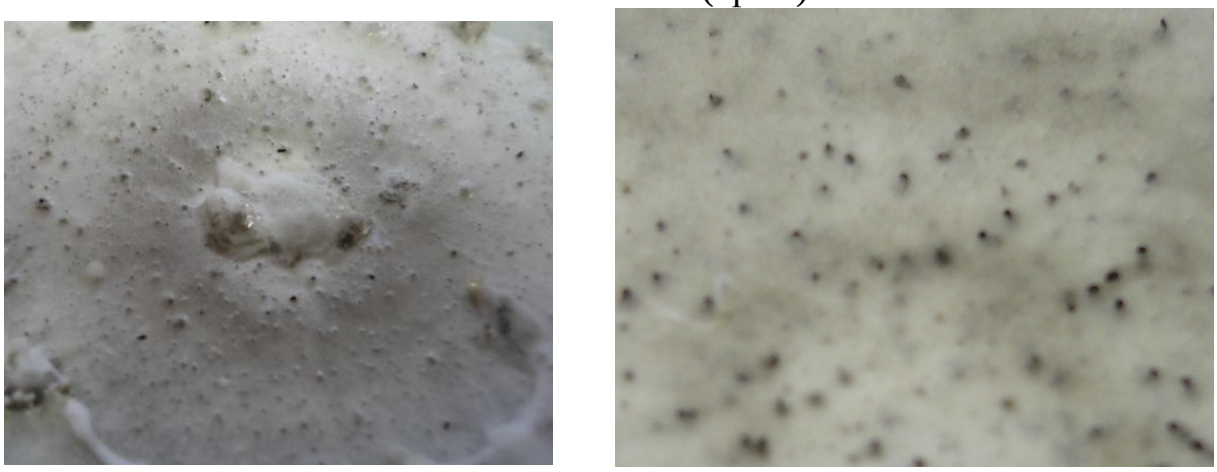


Рисунок 6 – Перитеции микромицета *Gibellina cerealis* выступающие выводным отверстием на поверхность субстрата, КГА, (ориг.)

цилиндрический, у вершины закруглённый, более светлый, длинной 120-280 мкм, расширен к основанию, 120-200 мкм, и сужен к вершине, 100-140 мкм (рисунок 7).

Перидий перитеция у микромицета представлен параплектенхимной тканью, состоящей из изодиаметрических клеток, длина и ширина которых одинаковы.

Интенсивность формирования перитециев патогена характеризует его репродуктивную способность, играет важную роль в распространении и реализации жизненной стратегии. Интенсивное спорообразование обусловливает высокий инфекционный потенциал патогена. Репродуктивную способность гриба *G. cerealis in vitro* определяли путём

подсчёта перитециев на 1 см^2 питательной среды. Установлено, что перитеции на питательной среде формировались неравномерно, максимальное их количество отмечалось ближе к центру колонии гриба. В среднем на 1 см^2 питательной среды формировалось 13±4 перитеция. По приблизительным подсчётам в одном перитеции образовывалось от 8 до 12 тысяч аскоспор.

В природе на естественном субстрате аски гриба созревают не одновременно, а последовательно на протяжении определённого

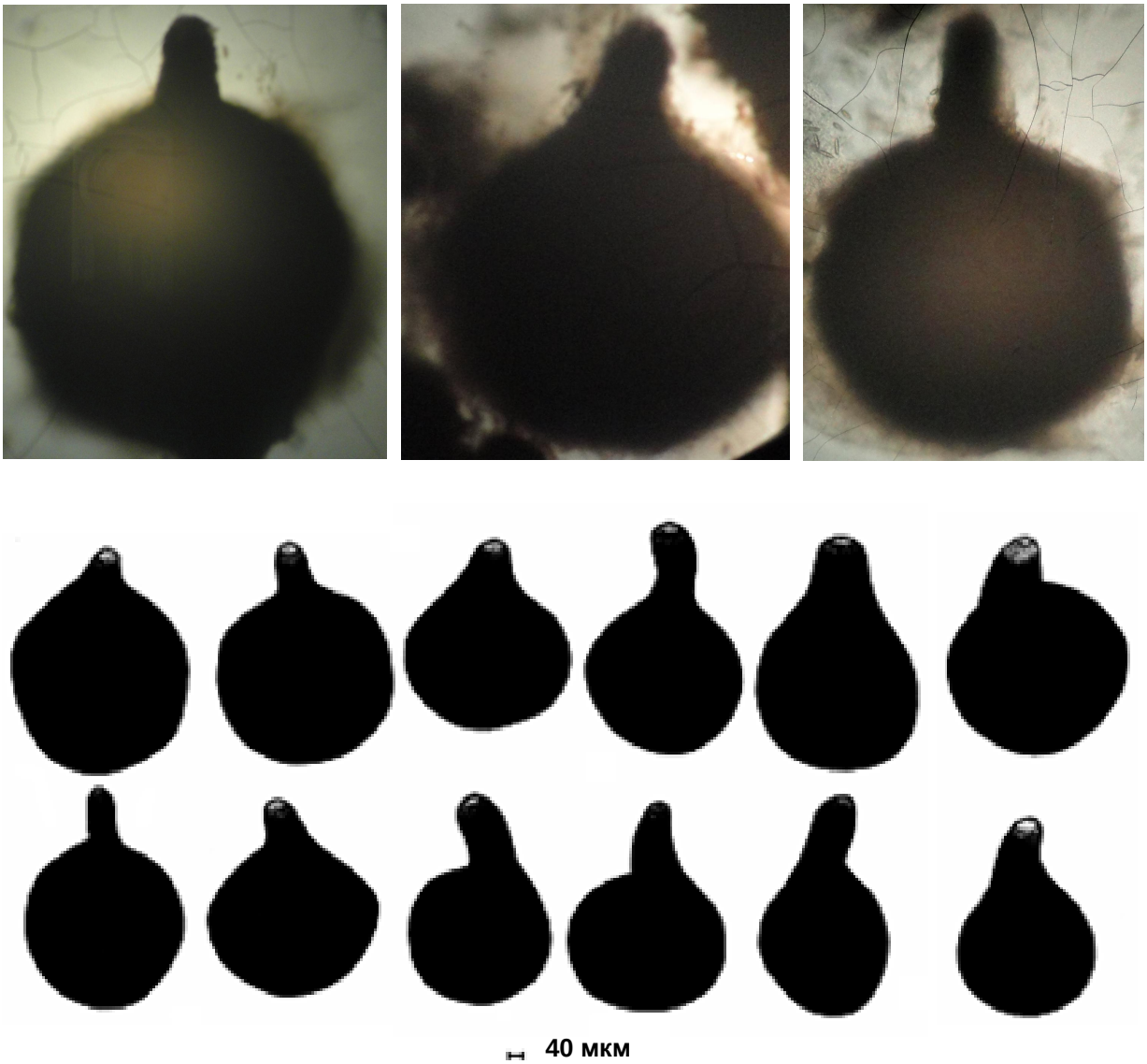


Рисунок 7 – Созревшие перитеции микромицета *Gibellina cerealis* на КГА (ориг.)

временного периода. При культивировании гриба *in vitro* аски, наоборот, созревают одновременно, их оболочка саморастворяется ещё внутри перитеция, освобождение аскоспор происходит массово, по типу «пикноспор из пикниды» (рисунок 8).

Аскоспоры гриба *G. cerealis* равнобоко или слегка изогнуто веретеновидные, гладкие с толстостенной, плотной оболочкой. Молодые аскоспоры бесцветные, по мере созревания приобретают восково-жёлтую (cerinus) и в конце коричневую (cinnamomeus) оболочку. На растении-

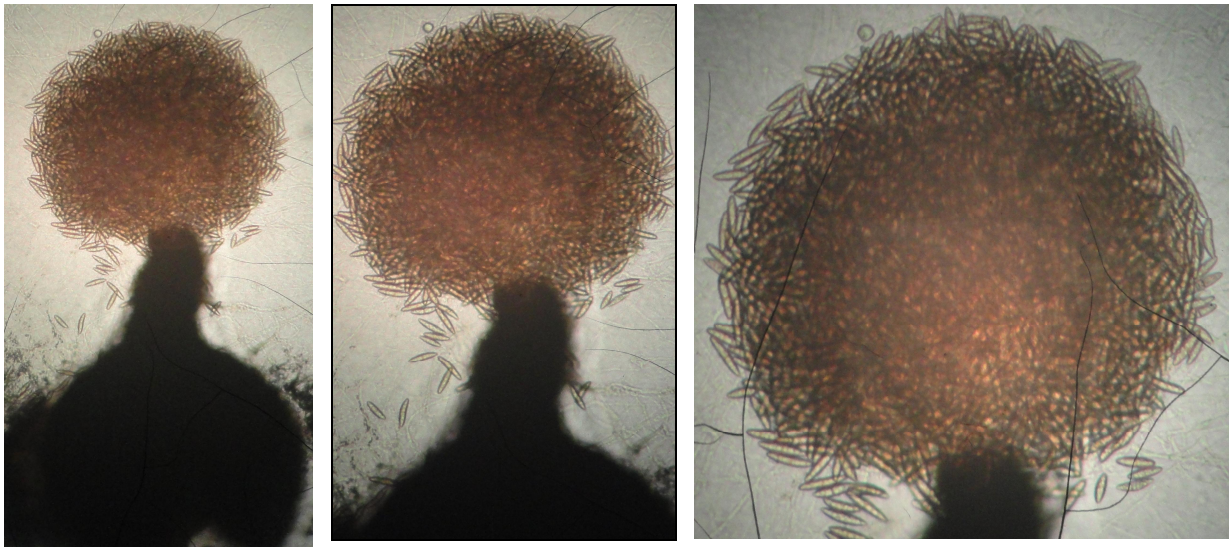


Рисунок 8 – Массовое освобождение созревших аскоспор из перитециев микромицета *Gibellina cerealis* при культивировании на КГА (ориг.)

хозяине патоген формирует аскоспоры с одной септой и очень редко (0,3-0,5 % случаев) – с двумя. *In vitro* микромицет также образовывал в основном аскоспоры с одной перегородкой, 15-35×6-7 мкм, однако в 5-7 % случаев встречались аскоспоры с двумя, 35-45×7-10 мкм и очень редко – с тремя и даже пятью септами (рисунки 9).

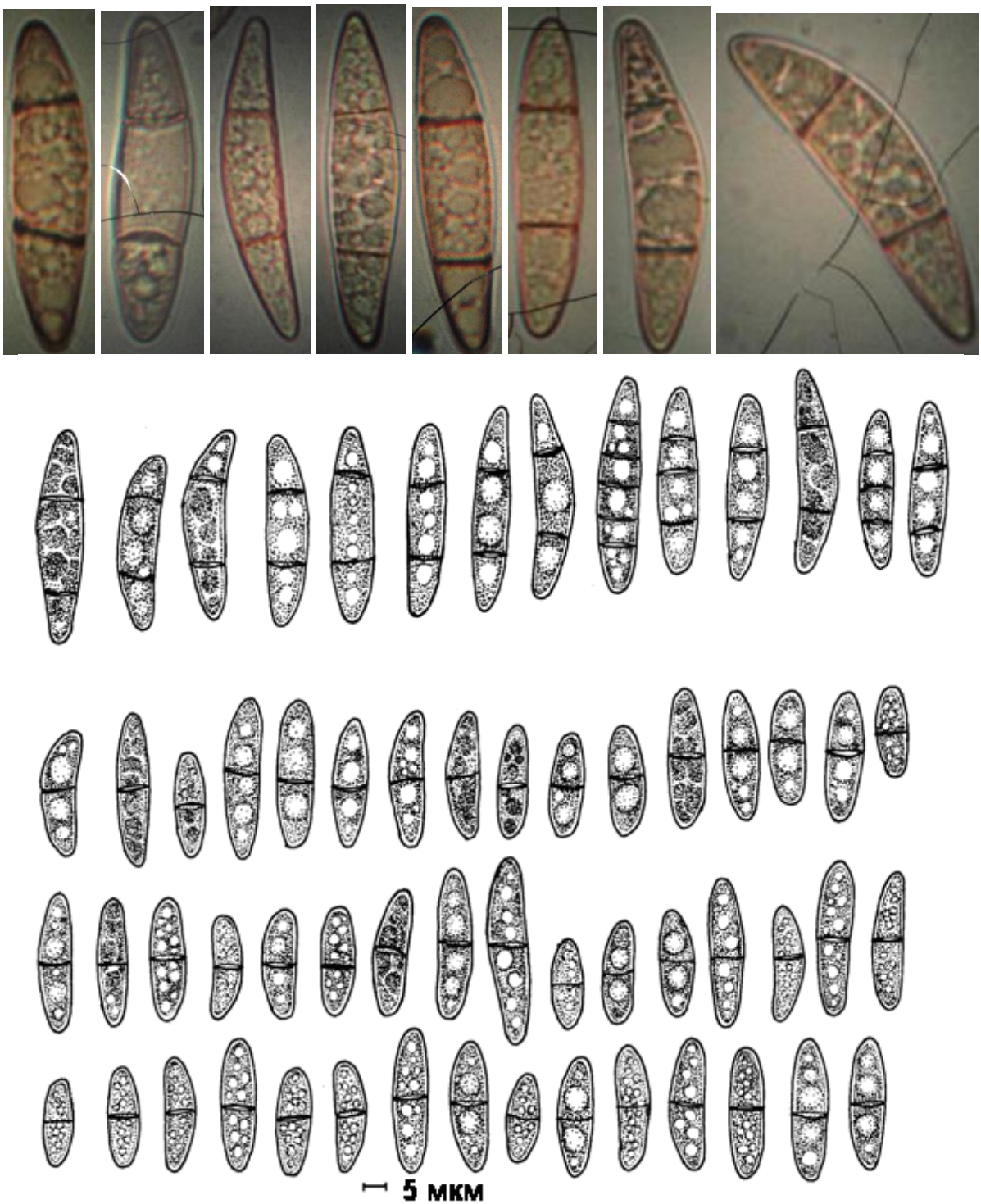


Рисунок 9 – Аскоспоры микромицета *Gibellina cerealis* на КГА (ориг.)

Следует отметить, что в перитециях образовались нетипичные для гриба *G. cerealis* споры, размером 50-70×7-13 мкм. В природных условиях споры такого типа нами не отмечались. Они формировались из сумок, в которых по каким-то причинам, возможно из-за дефицита питательных веществ, не последовало образование аскоспор. По форме споры

неравнобоко веретеновидные, многие с чётко выраженной, характерной только для сумок, ножкой; одноклеточные или с 1-3 септами, в зрелом состоянии гладкие с толстостенной, плотной, коричневой оболочкой (рисунок 10).

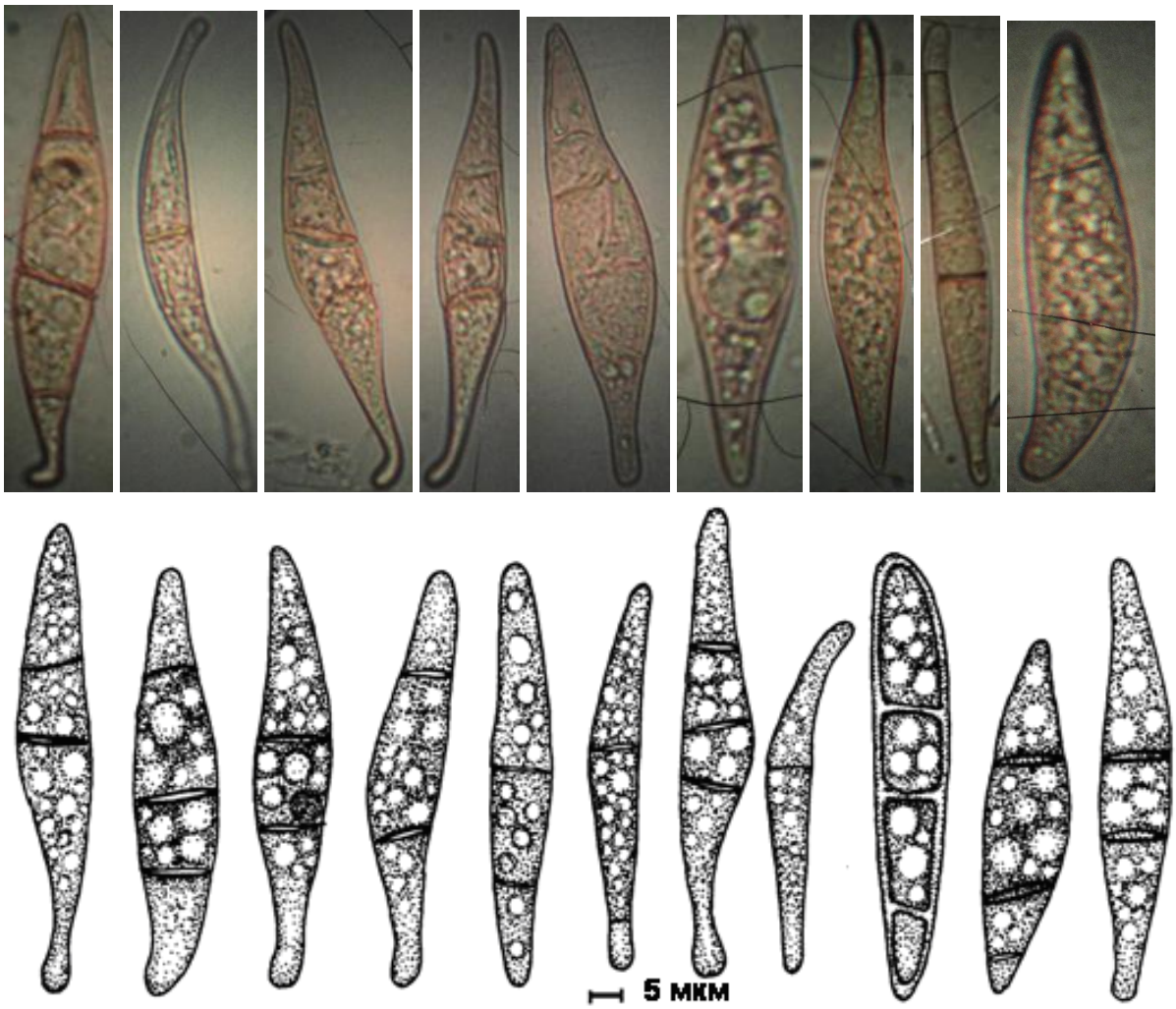


Рисунок 10 - Споры микромицета *Gibellina cerealis*, сформировавшиеся из стерильных аск на КГА (ориг.)

Таким образом, *in vitro* микромицет *G. cerealis* имеет не полный биологический цикл развития, как и в природных условиях, формирует только телиоморфу в виде перитециев с асками и аскоспорами. Созревание аскоспор, в отличие от природных условий, происходит одновременно. Освобождение аскоспор из перитеция, за счёт саморастворения оболочек аск, происходит массово, по типу выхода «пикноспор из пикниды».

Прослежено, что из стерильных сумок формирмируются крупные, размером 50-70×7-13 мкм, споры с нетипичной для аскоспор формой.

Литература

1. Билай В.И. (ред.) Методы экспериментальной микологии. Справочник // Киев. "Наукова думка". 1982. 550 с.
2. Бондарцев А.С. Шкала цветов: Пособие для биологов при научных и научно-прикладных исследованиях // М.; Л.: Изд-во АН СССР. 1954. 28 с.
3. Горьковенко В.С., Богословская Н.Б. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – №05(089). – IDA [article ID]: 0891305079. – Режим доступа: http://ej.kubagro.ru/2013/05/pdf/79.pdf, импакт-фактор РИНЦ=0,577.
4. Джеффри Чарлз. Биологическая номенклатура: Пер. с англ. // М.: Мир. 1980. 112 с.
5. Кутафьева Н.П. Морфология грибов // Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. 2003. 215 с.
6. Смицкая М.Ф., Смык Л.В., Мережко Т.А. Определитель пиреномицетов УССР // "Наукова думка". 1986. 364 с.
7. Таракановский А.Н. Гибеллиноз озимой пшеницы на Юге России: симптоматика, патогенез и меры снижения вредоносности // Пособие. ООО «Сингента». 2011. 31 с.
8. Cannon P.F. The newly recognized family Magnaporthaceae and its interrelationships // Systema Ascomycetum. 1994. 13. С. 25–42.
9. Список таксонов грибов // http://ru.wikipedia.org/wiki

References

1. Bilaj V.I. (red.) Metody jeksperimental'noj mikologii. Spravochnik // Kiev. "Naukova dumka". 1982. 550 s.
2. Bondarcev A.S. Shkala cvetov: Posobie dlja biologov pri nauchnyh i nauchno-prikladnyh issledovanijah // M.; L.: Izd-vo AN SSSR. 1954. 28 s.
3. Gor'kovenko V.S., Bogoslovskaja N.B. Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [Jelektronnyj resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2013. – №05(089). – IDA [article ID]: 0891305079. – Rezhim dostupa: http://ej.kubagro.ru/2013/05/pdf/79.pdf, impakt-faktor RINC=0,577.
4. Dzheffri Charlz. Biologicheskaja nomenklatura: Per. s angl. // M.: Mir. 1980. 112 s.
5. Kutaf'eva N.P. Morfologija gribov // Novosibirsk: Sib. univ. izd-vo. 2003. 215 s.
6. Smickaja M.F., Smyk L.V., Merezhko T.A. Opredelitel' pirenomicetov USSR // "Naukova dumka". 1986. 364 s.
7. Tarakanovskij A.N. Gibellinoz ozimoj pshenicy na Juge Rossii: simptomatika, patogenez i mery snizhenija vredonosnosti // Posobie. OOO «Singenta». 2011. 31 s.
8. Cannon P.F. The newly recognized family Magnaporthaceae and its interrelationships // Systema Ascomycetum. 1994. 13. S. 25–42.
9. Spisok taksonov gribov // http://ru.wikipedia.org/wiki