

ГРИБЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 582.28 : 581.557

© Е. Ю. Благовещенская, Н. Ю. Костенко, Н. В. Разгуляева

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛИВА НА ЗАРАЖЕННОСТЬ ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ (*FESTUCA PRATENSIS*) ЭНДОФИТНЫМ ГРИБОМ *NEOTYPHODIUM UNCINATUM*

BLAGOVESHCHENSKAYA E. Yu., KOSTENKO N. Yu., RAZGULIAEVA N. V.
THE INFLUENCE OF WATERING CONDITIONS ON ENDOPHYTE INFECTION LEVEL
OF MEADOW FESCUE (*FESTUCA PRATENSIS*) BY *NEOTYPHODIUM UNCINATUM*

Эндофитные грибы злаков — очень интересная группа, имеющая большое теоретическое и практическое значение. Преимущественно это анаморфные грибы рода *Neotyphodium*, не образующие полового спороношения. Тем не менее показано их близкое родство с трибой *Balansiae* семейства *Clavicipitaceae* (отдел *Ascomycota*, порядок *Hypocreales*). Некоторые из них имеют телеоморфные стадии, относящиеся к роду *Epichloë* (Schardl, Moon, 2003). Мицелий эндофитных грибов локализован в надземной части растений, где он распространяется по межклетникам различных органов.

Растение обеспечивает гриб питанием и стабильной средой обитания. В свою очередь алкалоиды, выделяемые грибом, защищают растение как от насекомых-вредителей, так, частично, и от травоядных млекопитающих (Richmond, Shetlar, 1999; Maejima et al., 2000; Vazquez de Aldana et al., 2001). Показано, что эндофитный гриб может увеличивать устойчивость растения к болезням и неблагоприятным условиям (Malinowski et al., 1997), хотя существует ряд работ, в которых его влияние на развитие растения-хозяина не отмечено или оно отрицательное (Hesse et al., 1999; Faeth, 2002). Распространение эндофита происходит только вертикально, вместе с семенами растения-хозяина (Philipson, Christey, 1986).

Зараженность полей и пастбищ эндофитными грибами может меняться: повышаться в условиях сухой и жаркой погоды (Saiga et al., 2001), а также при усиленной пастбищной нагрузке (Gwinn et al., 1998). Изменение уровня зараженности в ряде случаев может происходить очень быстро (Funk et al., 1983; по: Clay, 1998). Так как распространение эндофитных грибов происходит вместе с растением-хозяином, то изменение зараженности объясняется конкурентным взаимодействием зараженных и незараженных растений (Clay, 1998; Gwinn et al., 1998). Если условия среды благоприятны для развития зараженных растений, то происходит вегетативное размножение, тогда как незараженные растения не выдерживают конкуренции и элиминируются. В результате доля зараженных растений в природных условиях увеличивается.

Несмотря на то что эндофитные грибы в настоящее время привлекают внимание исследователей, остается много невыясненных вопросов. Отсутствуют точные данные о распространении эндофитного мицелия в растении-хозяине, в то время как это очень важно для изучения динамики зараженности полей и пастбищ. Данные о влиянии условий увлажнения на зараженные и незараженные растения противоречивы (Arachevaleta et al., 1989; Malinowski et al., 1997, 1999; Hesse et al., 1999).

Целью настоящей работы было исследование влияния условий полива на зараженность отдельных растений овсяницы луговой эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C. W. Bacon et Hanlin.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на базе Лаборатории иммунитета Института кормов (ГНУ ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса). Для опыта использовали семена овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) сорта ВИК 5 с искусственно зараженных эндофитным грибом *N. uncinatum* растений, растущих в открытом грунте (Благовещенская и др., 2005). В качестве контроля были взяты незараженные семена того же сорта.

Анализировали зараженность 40 семян, которые обрабатывали по методике, предложенной в работе Г. К. М. Лача с соавторами (Latch et al., 1987), с небольшими изменениями. Семена выдерживали в 5%-м водном растворе гидроксида натрия (NaOH) в течение 14 ч. Затем их тщательно промывали водопроводной водой для удаления щелочи и помещали в фарфоровую кастрюлю с красителем следующего состава: 0.325 г анилинового синего, 100 мл воды, 50 мл 85%-й молочной кислоты. Семена кипятили в красителе 3—5 мин, после этого их помещали на предметное стекло, расплющивали покровным и микроскопировали. О зараженности семян эндофитом судили по наличию окрашенных гиф среди алейроновых клеток. Для эксперимента использовали образец со 100%-й зараженностью семян.

Все семена поверхность стерилизовали и поместили в стерильные чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу. Поверхностную стерилизацию проводили концентрированной серной кислотой и препаратом доместос (Благовещенская и др., 2005). Чашки оставили при естественном освещении и комнатной температуре (23 °C). Через неделю полученные стерильные проростки пересадили в сосуды с субстратом, по одному растению на стакан (в семи случаях — по два растения в стаканчик). В эксперименте использовали субстрат из смеси торфа и песка в соотношении 1 : 1, пропаренной в течение 1 ч. Субстрат набивали в стандартные пластиковые стаканчики объемом 200 мл, по краям дна которых были сделаны по два надреза.

Растения выращивали при комнатной температуре и нерегулярном световом дне (от 7 до 14 ч). По условиям полива опыт был проведен в двух вариантах. Примерно половину растений выращивали в засушливых условиях и поливали только при достижении почвой влажности завядания (когда листья растений теряли тургор). Другую половину растений выращивали во влажных условиях и поливали с такой частотой, чтобы в поддоне постоянно присутствовала вода, т. е. поддерживалась влажность наименьшей влагоемкости. При постановке эксперимента исходили из рекомендаций А. В. Соколова (1967) по проведению вегетационных опытов.

Первый анализ растений проводили в мае 2006 г. в фазу кушения. Растения срезали на высоте 1.5—2.0 см от почвы, взвешивали и изучали зараженность каждого побега каждого растения. Для этого использовали срывы адаксиального эпидермиса влагалища листа. Для получения срыва эпидермиса (Наумов, 1937) лезвием бритвы делали небольшой надрез, затем пинцетом отделяли фрагмент эпидермиса, который помещали в каплю красителя (100 мл 0.1%-го водного раствора анилинового синего и 50 мл 80%-й молочной кислоты) на предметное стекло. Для ускорения окрашивания препарат аккуратно прогревали в пламени горелки или спиртовки в течение 10 с. При исследовании большого количества образцов готовили партии по 100—200 препаратов, которые оставляли для окрашивания на ночь. Это позволяло существенно уменьшить временные затраты по обработке материала.

После окрашивания препараты микроскопировали при увеличении 100×. В случае присутствия эндофитного мицелия были заметны темно-синие гифы среди бледно-голубых клеток эпидермиса.

Повторный анализ проводили в июне (на пятый месяц) после отрастания новых побегов (массу растений не определяли).

Результаты и обсуждение

Все контрольные растения были свободны от мицелия, их заражения не происходило. При анализе растений, выращенных в одном стаканчике, были обнаружены все три возможных сочетания: два зараженных растения, зараженное и незараженное, два незараженных. Следовательно, можно предположить, что заражения через почву не происходило.

Среди анализируемых растений были и зараженные растения, и растения, в которых эндофитный мицелий обнаружен не был. В разных вариантах опыта доля растений без мицелия оказалась значимо различной (табл. 1). Для сравнения долей использовали критерий Стьюдента.

Кроме того, оказалось, что у небольшого числа растений (24 штуки) были как зараженные, так и незараженные побеги. Доля таких растений среди общего числа, если учитывать результаты обоих анализов, составляла немногим более 12 %, 17 таких растений (9 % от общего числа проанализированных) обнаружено при первом анализе и 12 (6 %) — при втором (табл. 2).

Особенно интересны случаи, когда в одном из анализов все побеги растения оказываются незараженными. Такие растения могут законным образом попасть в группу незараженных, если руководствоваться только однократным анализом. Так, например, у растений № 19 и 91 в первом анализе было только по одному зараженному побегу, а во втором — ни одного. Растения № 83 и 166 были при первом анализе отнесены к незараженным, а при втором имели 3 зараженных побега из 13 и 4 из 6 соответственно. Растение № 106 при первом анализе имело все зараженные побеги, а при втором — ни одного.

Зараженные растения практически не отличались от незараженных по биомассе и количеству побегов. Влияние на эти показатели оказывали только условия полива (табл. 3). При сильном поливе растения имели биомассу надземной части около 5 г и в среднем по 7 побегов на растение, а при слабом поливе биомасса того же числа побегов составляла около 4 г. При сравнении зараженных и незараженных растений не учитывались те из них, которые имели те и другие побеги.

Ситуация, в которой из зараженных семян иногда вырастают незараженные проростки, достаточно обычна. Традиционно это объясняют тем, что в некоторых семе-

Таблица 1

Влияние условий полива на зараженность растений эндофитом

Состояние растений	Количество растений	
	слабый полив	сильный полив
Первый анализ		
Зараженные	56	43
Незараженные	37	56
Всего	93	99*
Доля незараженных	0.40	0.57
Доверительная вероятность	0.9805	
Второй анализ		
Зараженные	55	44
Незараженные	38	57
Всего	93	101
Доля незараженных	0.41	0.56
Доверительная вероятность	0.9619	

* Побеги от двух растений при первом анализе не учитывали.

Таблица 2

Результаты анализа побегов опытных растений (выборка)

Номер растения	Первый анализ		Второй анализ	
	всего побегов	из них заражено	всего побегов	из них заражено
19	7	1	9	0
34	10	9	11	9
41	4	4	10	9
49	5	1	11	4
58	10	10	11	10
65	6	5	9	8
69	7	6	7	7
72	7	6	9	9
75	6	5	8	8
82	8	7	12	8
83	7	0	13	3
91	4	1	6	0
92	6	5	8	7
93	5	4	5	5
106	5	5	5	0
108	12	12	13	12
117	7	7	7	6
121	5	4	5	5
151	7	6	9	9
155	7	6	8	8
166	5	0	6	4
176	14	6	15	6
196	10	9	10	10
208	12	11	12	12

Примечание. В таблице приведены данные только для растений, имеющих как зараженные, так и незараженные побеги хотя бы в одном из анализов.

нах мицелий был нежизнеспособным, а методика окрашивания не позволяет различать живой и мертвый мицелий (Latch et al., 1987). Однако в нашем эксперименте показано, что в разных вариантах опыта доля растений без мицелия оказалась значимо различной (табл. 1). Таким образом, в более засушливых условиях мы получили боль-

Таблица 3

Биомасса и количество побегов у растений, выращенных в условиях разного полива

Варианты	Состояние растений	Статистические характеристики	Масса надземной части, г	Количество побегов, штук/растение	Всего растений, штук
Слабый полив	Зараженные	Среднее	3.801	6.8	} 45
		Стандартное отклонение	1.373	1.8	
	Незараженные	Среднее	3.805	6.4	} 37
		Стандартное отклонение	1.573	2.2	
Сильный полив	Зараженные	Среднее	4.952	7.0	} 37
		Стандартное отклонение	2.207	2.7	
	Незараженные	Среднее	5.386	6.9	} 57
		Стандартное отклонение	2.439	3.2	

ше зараженных растений, чем в условиях повышенной влажности. Это говорит о том, что на развитие мицелия в проростке влияют внешние условия и теоретически из одного и того же семени может вырасти как зараженное, так и незараженное растение. Вероятно, подобные изменения могут происходить и со злаками, растущими в открытом грунте. В пользу этого предположения говорит и то, что были обнаружены растения, имеющие зараженные и незараженные побеги, что согласуется с наблюдениями за развитием растений в полевых условиях (Благовещенская и др., 2008). Возможно, что при развитии проростка происходит выбор между двумя вариантами — образованием зараженных или незараженных побегов. При дальнейшем развитии, в зависимости от возникающих факторов, может происходить изменение программы. В таких случаях наличие на проростке зараженных и незараженных побегов является отклонением. Доля таких случаев в природной популяции, вероятно, невелика, поэтому на указанное явление никто не обратил внимание.

Полученные результаты подтверждают наше предположение о том, что зараженность растений в природных условиях может меняться не в результате конкурентного взаимодействия, а в результате изменения числа зараженных побегов в отдельном растении (Благовещенская и др., 2008).

При изменении внешних условий среды или в ответ на определенный сигнал растения-хозяина развитие мицелия может активизироваться. В злаке начинают образовываться зараженные побеги. При наступлении других условий происходят обратные процессы, вероятно, мицелий сохраняется в зоне роста. Такая модель предполагает более быстрое реагирование на условия окружающей среды и объясняет появление эндофитов на полях, которые в предшествующих исследованиях были отмечены как незараженные.

Хотя условия увлажнения и оказывали значительное влияние на развитие грибного мицелия в растении, видимых преимуществ у зараженных и незараженных растений замечено не было (табл. 3). В условиях более сильного полива растения имели в среднем большую биомассу при сохранении того же числа побегов (доверительная вероятность — 0.9714). Это вполне логичный результат, который не нуждается в дополнительных пояснениях. В такой ситуации различий между зараженными и незараженными растениями не обнаружено.

Наше исследование показывает, что эндофит выступает в данном случае как компонент безразличный для растения-хозяина. Возможно, под влиянием условий ситуация может измениться. В связи с вышесказанным мы предлагаем следующую гипотезу.

Присутствие эндофитного гриба в растении — это во многом случайное явление. Более внимательного изучения здесь заслуживает именно гриб, который мы рассматриваем как компонент, нашедший новую экологическую нишу. При неблагоприятных условиях он может находиться в латентном, неактивном состоянии. В ряде случаев происходит активизация гриба и развитие мицелия в новообразующихся побегах. Далее в зависимости от ряда факторов взаимоотношения одного и того же эндофита с хозяином могут проходить как мутуализм, антагонизм или комменсализм (Благовещенская, 2008).

Тот факт, что дефицит воды положительно влияет на развитие мицелия в растении, можно объяснить по-разному. Возможно, происходит ослабление растения, поэтому оно не может сопротивляться заселению. В этом случае гриб выступает как антагонист, и можно было бы ожидать, что зараженные растения в условиях дефицита воды будут иметь худшие показатели развития. Однако этого, как видно из табл. 3, не происходит. Мы полагаем, что существуют другие факторы, стимулирующие развитие мицелия, не связанные напрямую с иммунной системой растения, например снижение активности воды в межклеточном пространстве (Bruehl, Kaiser, 1996).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Благовещенская Е. Ю. Эндофит-растение как сложная динамическая система // Современная микология в России. Т. 2 / Матер. II съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 396.

Благовещенская Е. Ю., Костенко Н. Ю., Разгуляева Н. В. Искусственное заражение овсяницы луговой эндофитным грибом // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, вып. 5. С. 64—72.

Благовещенская Е. Ю., Костенко Н. Ю., Разгуляева Н. В. Динамика зараженности эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* отдельных растений овсяницы луговой (*Festuca pratensis*) // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42, вып. 3. С. 278—286.

Науумов Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований. Л.: Сельхозгиз, 1937. 272 с.

Соколов А. В. Вегетационный метод // Методика полевых и вегетационных опытов с удобрениями и гербицидами. М.: Наука, 1967. С. 104—124.

Arachevaleta M., Bacon C. W., Hoveland C. S., Radcliffe D. E. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress // *Agron. J.* 1989. Vol. 81. P. 83—90.

Buehl G. W., Kaiser W. J. Some effects of water potential upon endophytic *Acremonium* spp. in culture // *Mycologia.* 1996. Vol. 88. P. 809—815.

Clay K. Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses / Ed. G. P. Cheplik. Population biology of grasses. Cambridge university press, 1998. P. 255—285.

Faeth S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? // *Oikos.* 2002. Vol. 98. P. 25—36.

Gwinn K. D., Fribourg H. A., Waller J. C., Saxton A. M., Smith M. C. Changes in *Neotyphodium coenophialum* infestation levels in tall fescue pastures due to different grazing pressures // *Crop. Sci.* 1998. Vol. 38. P. 201—204.

Hesse U., Schöberlein W., Diepenbrock W., Wittenmeyer L., Merbach W. Untersuchungen zu Wachstum und Entwicklung von *Lolium perenne*-Genotypen mit und ohne *Neotyphodium*-Endophyten unter Wasserstress // *Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss.* 1999. Bd 12. S. 227—228.

Latch G. C. M., Potter L. R., Tyler B. F. Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species // *Ann. appl. Biol.* 1987. Vol. 111. P. 59—64.

Maejima A., Saiga S., Inoue T., Tsuiki M. Endophyte infection rate and alkaloid concentrations in seeds of commercial cultivars of perennial ryegrass // *Grassland Sci.* 2000. Vol. 46. P. 52—57.

Malinowski D. P., Leutchmann A., Schmidt D., Nosberger J. Growth and water status in meadow fescue is affected by *Neotyphodium* and *Phialophora* species endophytes // *Agron. J.* 1997. Vol. 89. P. 673—678.

Malinowski D. P., Brauer D. K., Belesky D. P. The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency // *J. Agron. Crop. Sci.* 1999. Vol. 183. P. 53—60.

Philipson M. N., Christey M. C. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne* // *New Zealand J. Bot.* 1986. Vol. 24. P. 125—134.

Richmond D. S., Shetlar D. J. Larval survival and movement of bluegrass webworm in mixed stands of endophytic perennial ryegrass and Kentucky bluegrass // *J. Econ. Entomol.* 1999. Vol. 92. P. 1329—1334.

Saiga S., Maejima A., Yoshida S., Tsuiki M. Changes of endophyte infection frequency in turf of northeastern Honshu, Japan // *Grassland Sci.* 2001. Vol. 47. P. 478—483.

Schardl C. L., Moon C. D. Processes of species evolution in *Epichloë/Neotyphodium* endophytes of Grasses / Eds J. F. White, jr. et al. // *Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts.* New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. P. 273—310.

Vazquez de Aldana B. R., Garcia Ciudad A., Zabalgoceazcoa I., Garcia Criado B. Ergovaline levels in cultivars of *Festuca arundinacea* // *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001. Vol. 93. P. 169—176.

Р Е З Ю М Е

Цель данной работы — изучить распределение эндофитного мицелия в отдельных растениях. Для эксперимента использовали семена овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) сорта ВИК 5, зараженные эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C. W. Bacon et Hanlin. Показано, что засушливые условия положительно влияют на зараженность растений. Доля незараженных растений значительно отличалась в условиях слабого и сильного полива (40 и 57 % незараженных растений соответственно). Некоторые растения имели как зараженные, так и незараженные побеги. Данный факт подтверждает возможность несистемного поражения растений. Мы предполагаем, что в зараженном проростке происходит выбор между формированием зараженных или незараженных побегов. Более того, в некоторых условиях возможно «переключение программы», в результате чего исследователь будет наблюдать «появление» или «исчезновение» эндофита, в то время как это может означать просто его «активацию» или «анактивацию». Предложенная модель позволяет объяснить быстрые изменения зараженности растений эндофитными грибами в природных условиях.

Ключевые слова: *Neotyphodium*, эндофиты, мутуализм.

S U M M A R Y

This study is devoted to the problem of fungal distribution in individual plants. We used seeds of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) cultivar VIK 5 infected with *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C. W. Bacon et Hanlin. Draught conditions increased the part of infected plants got from infected seeds. The part of non-infected plants significantly differed in the cases of draught and humid conditions (40 and 57 % non-infected plants respectively). Some plants had both infected and non-infected tillers. This fact verified the possibility of non-systemic infection. It seems that an infected seedling has a choice between forming infected and non-infected tillers. In some conditions the program can change, so researcher will observe «elimination» of endophyte or its «appearance», but perhaps it will mean just activation or inactivation of endophyte. This model allows more rapid change of infection level in fields and pastures. Also this model explains the appearance of endophyte infection plants in fields considered to be endophyte-free.

Key words: *Neotyphodium*, endophyte, mutualism.

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА,
ЭКОЛОГИЯ**

УДК 582.241 (470-20 + 471.311)(470.311)

© В. В. Бодягин, Т. Н. Барсукова

**МИКСОМИЦЕТЫ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В ВОДОЕМАХ ГОРОДА МОСКВЫ
И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**BODYAGIN V. V., BARSUKOVA T. N. MYXOMYCETES ISOLATED FROM AQUATIC
HABITATS OF MOSCOW CITY AND MOSCOW REGION

Миксомицеты встречаются на всех континентах и практически во всех природных зонах — от тундр до пустынь. Находки миксомицетов в водных условиях редки. Живой плазмодий *Didymium nigripes* (Link) Fr. наблюдали внутри аквариума (Kappel, Anken, 1992). В дальнейшем плазмодий во влажной камере сформировал плодовые тела. При инкубации субстрата, взятого из воды окон болот, были обнаружены 13 видов миксомицетов (Shearer, Crane, 1986). В работе Линдли с соавторами (Lindley et al., 2007) указано 9 видов протостелиевых и 4 вида миксогастеромицетов, выявленных при инкубации субстрата, взятого из воды.

В нашей работе сбор образцов производился с апреля 2004 по ноябрь 2007 г. на территории г. Москвы и в Одинцовском районе Московской обл.

Отбор проб осуществлялся в течение всего бесснежного периода. Образцы листового и веточного опада были собраны как из водоемов различных типов, так и из подстилки. Отбор проб был произведен в следующих водоемах: г. Москва — р. Серебрянка и комплекс Терлецких прудов, Измайловский лесопарк; р. Чертановка, Битцевский лесопарк; р. Котловка (около станции метро Нагатинская); р. Лось, Национальный парк Лосинный остров; р. Жабенка, Тимирязевский лесопарк; ручьи Филевского лесопарка; комплекс Алексеевских прудов и ручьи лесопарка Воробьевы горы; Московская обл. — в районе пос. Переделкино: р. Сетунь, комплекс прудов; на территории Звенигородской биологической станции им. С. Н. Скадовского и ее окрестностей: реки Москва, Островня, Сетунька, Стерляжий и Костин пруд, Стерляжий ручей. Образцы подстилки были отобраны в окрестностях указанных водоемов (всего 1304 пробы).

После сбора образцы субстрата были помещены в бумажные пакеты. Были отобраны листья березы, дуба, лещины, клена, ясеня, тополя, ивы, черемухи, рябины, яблони, хвоя сосны и ели, остатки различных однодольных и двудольных травянистых растений, древесные остатки хвойных и лиственных. В лаборатории фрагменты субстрата помещали в стеклянные чашки Петри (90 × 15 мм) и полностью заливали водопроводной водой. Сбор проб и используемая методика были в первую очередь предназначены для выявления биоразнообразия водных и водно-воздушных гифомицетов, этим и объясняется то, что используемые методы не являются типичными методами инкубации субстрата для выявления биоразнообразия миксомицетов. При уменьшении уровня воду доливали. Инкубация производилась 40—60 суток. С интервалом в 2—4 суток чашки просматривали под биноклем и при малом увеличении микроскопа.

Для определения видовой принадлежности использовали ряд определителей (Lister, 1925; Martin, Alexopoulos, 1969; Новожилов, 1993). Названия таксонов приводятся в соответствии с базой данных IndexFungorum (www.indexfungorum.org).

Полученный по указанной методике материал включает 84 образца спорокарпов. Спорокарпы сформировались при инкубации 76 образцов, что составляет около 6 % от общего числа всех образцов. Выявлено 13 видов миксомицетов, относящихся к шести родам из четырех порядков (см. таблицу). При этом в таксономическом отношении наиболее представлен порядок *Physarales* — 9 видов, причем основные представители относятся к семейству *Didymiaceae* — 7 видов. Остальные порядки представлены 1—2 видами.

Как видно из таблицы, наиболее часто встречаемым видом была *Diderma crustaceum* (50 % от всех образцов). На значительном числе образцов были выявлены спорокарпы *Didymium squamulosum* (11), *Lamproderma scintillans* (8), *Licea pusilla* (6), *Didymium difforme* (4). Находки других представителей были единичными.

Значимые различия в видовом составе между образцами субстратов, взятых из подстилки и воды, выявлены не были, а у обнаруженных видов не была выявлена субстратная приуроченность.

В процессе инкубации под поверхностной пленкой воды происходило развитие миксозооспор, миксамеб, плазмодия. При образовании спорокарпов поведение у различных видов миксомицетов было различным. Так, *Licea pusilla*, *Perichaena vermicularis* и *Didymium trachysporum* формировали спорангии под водой, прикрепляясь гипоталлусом к стеклянному дну чашки. Спорангии *Licea pusilla* в дальнейшем отрывались от гипоталлуса и всплывали. Плазмодии остальных видов для формирования

Распределение видов миксомицетов по местообитаниям, субстратам и срокам инкубирования

Вид	Количество находок в водоемах	Количество находок в подстилке	Субстрат	Время появления спорокарпов после начала инкубации, сутки
<i>Licea kleistobolus</i> G. W. Martin	3	0	Листья ясеня, ивы	28—36
<i>L. pusilla</i> Schrad.	3	3	Листья ясеня, осины, березы, травянистые остатки двудольных	28—36
<i>Perichaena vermicularis</i> (Schwein.) Rostaf.	2	0	Листья ольхи, клена платанового	34—50
<i>Lamproderma scintillans</i> (Berk. et Broome) Morgan	7	1	Листья рябины, ольхи, липы, ивы, клена платанового, тополя серебристого	25—35
<i>Physarum sulphureum</i> Alb. et Schwein.	1	0	Листья ясеня	32
<i>Ph. verum</i> Sommerf.	1	0	Листья ивы	36
<i>Diderma crustaceum</i> Peck	22	20	Листья различных древесных пород, хвоя ели и сосны, травянистые остатки однодольных и двудольных, древесные остатки	18—36
<i>D. simplex</i> (J. Schröt.) G. Lister	1	1	Листья ясеня, ветви лиственных	19—32
<i>Didymium crustaceum</i> Fr.	1	1	Листья ивы, травянистые остатки двудольных	26—32
<i>D. difforme</i> (Pers.) Gray	2	2	Листья рябины, осины, ясеня	20—32
<i>D. melanospermum</i> (Pers.) T. Macbr.	1	0	Листья рябины	36
<i>D. squamulosum</i> (Alb. et Schwein.) Fr.	4	7	Листья ивы, рябины, клена платанового, травянистые остатки двудольных	20—36
<i>D. trachysporum</i> G. Lister	1	0	Листья клена платанового	26

спорокарпов выползали на сухие участки — фрагменты субстрата, находящиеся над поверхностью воды, или боковые стенки чашек.

Вероятно, некоторые миксомицеты способны проводить значительную часть своего жизненного цикла полностью в водных условиях и, возможно, являются постоянными обитателями водоемов.

У многих видов наблюдались отличия от их описаний в определителях (Martin, Alexopoulos, 1969; Новожилов, 1993). Так, у представителей порядка *Physarales* в ряде случаев в спорокарпах наблюдался недостаток извести, в результате чего формировались уродливые плодовые тела. У выявленных нами образцов *Lamproderma scintillans* размеры спорангиев и спор были меньше указанных в описании вида. У *Licea pusilla* и *Diderma crustaceum* споры имели четко выраженную сетчатую орнаментацию. Возможно, данные отличия обусловлены нетипичной методикой инкубации.

В процессе исследования на территории г. Москвы впервые были обнаружены *Licea kleistobolus*, *Perichaena vermicularis*, *Lamproderma scintillans*, *Physarum sulphureum*, *Diderma crustaceum* и *Didymium trachysporum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Новожилов Ю. К. Определитель грибов России. Отдел Слизевика. Вып. 1: Класс Миксомицеты. СПб.: Наука, 1993. 288 с.

Kappel T., Anken R. H. An aquarium myxomycete: *Didymium nigripes* // Mycologist. 1992. Vol. 6. P. 106—107.

Lindley L. A., Stephenson S. L., Spiegel F. W. Protostelids and myxomycetes isolated from aquatic habitats // Mycologia. 2007. Vol. 99. P. 504—509.

Lister A. A. A monograph of the Mycetozoa. London: British museum, 1925. 296 p.

Martin G. W., Alexopoulos C. J. The Myxomycetes. Iowa, 1969. 506 p.

Shaerer C. A., Crane J. L. Illinois fungi XII. Fungi and myxomycetes from wood and leaves submerged in southern Illinois swamps // Mycotaxon. 1986. Vol. 25. P. 527—538.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова
bodyagin_vasilii@mail.ru

Поступила 3 VI 2008

РЕЗЮМЕ

Выявлены 13 видов миксомицетов в водных местообитаниях Москвы и Московской обл. Миксозооспоры, амёбы и плазмодий развивались под поверхностью воды. *Licea pusilla*, *Perichaena vermicularis* и *Didymium trachysporum* формировали в воде спорангии. Плазмодий других видов для формирования спорокарпов перемещался на сухие участки. Для многих видов отмечены отличия от исходных диагнозов. *Licea kleistobolus*, *Perichaena vermicularis*, *Lamproderma scintillans*, *Physarum sulphureum*, *Diderma crustaceum* и *Didymium trachysporum* обнаружены в Москве впервые.

Ключевые слова: миксомицеты, водные местообитания, Московская обл.

SUMMARY

Total of 13 species of myxomycetes were detected from aquatic habitats of Moscow city and Moscow Region. Myxozoospores, amoebae, and plasmodium grew under water surface. *Licea pusilla*, *Perichaena vermicularis*, and *Didymium trachysporum* formed sporangia in water. Plasmodium of other species moved to dry places to form sporocarps. Many species have some differences from original diagnoses. *Licea kleistobolus*, *Perichaena vermicularis*, *Lamproderma scintillans*, *Physarum sulphureum*, *Diderma crustaceum*, and *Didymium trachysporum* were revealed in Moscow for the first time.

Key words: myxomycetes, aquatic habitats, Moscow Region.

УДК 582.28 : 574.5(268.42)

© *Е. Н. Бубнова***ГРИБЫ ДОННЫХ ГРУНТОВ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА
БЕЛОГО МОРЯ**BUBNOVA E. N. FUNGI IN SEDIMENTS OF THE KANDALAKSHA BAY
(WHITE SEA, NW RUSSIA)

Донные грунты — одно из наиболее богатых грибами морских местообитаний. Использование культуральных методов позволяет выделять из донных осадков разнообразные виды грибов, в том числе и некоторые новые для науки (Tubaki, 1973; Rivkin, Khudyakova, 2002). Вместе с тем нельзя не отметить, что большинство выделяемых культур относится к обычным почвенным видам. Широко распространено мнение, что эти грибы присутствуют в грунтах в виде покоящихся структур, попавших на дно из других морских экотопов или почв, пресных стоков и воздуха, а если они и развиваются здесь, то это явление случайное (Sparrow, 1937; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Kohlmeyer, Volkmann-Kohlmeyer, 2003). Поэтому грибы донных осадков до сих пор являются относительно слабо изученными морскими организмами. Работы, посвященные данной теме, немногочисленны, кроме того, все они проводились в теплых и умеренно теплых водах (Sparrow, 1937; Tubaki, 1973; Артемчук, 1981; Худякова и др., 2000; Худякова, 2004).

Нами впервые даются сведения о грибах донных осадков Белого моря.

Материалом для исследования послужили образцы грунтов, отобранные на 10 станциях во время рейса экспедиционного судна «Беломор» в проливе Великая Салма (Кандалакшский залив Белого моря) 18—20 июля 2006 г. Станции располагались по склонам подводного ущелья на глубине от 54 до 108 м. Грунты — алевропелиты, в разной степени опесчаненные, с температурой около 0 °С. Соленость морской воды в данном районе 22—24 ‰. Координаты района исследования находятся между 66°31.498' и 32.828' с. ш.; 33°14.139' и 18.632' в. д. Подъем грунта осуществляли дночерпателем Ван Вина в 1—3-кратной повторности на разных станциях. Из грунта, доставленного с каждым поднятым дночерпателем, при помощи срезанного шприца отбирали 2 см³ из верхних 2—4 см, не нарушая его структуру. Весь материал с каждой станции собирали в одну стерильную пробирку. Таким образом, было получено 10 смешанных образцов, которые до посева хранили в холодильнике при 4 °С.

Все образцы высевали одновременно, через двое суток после последнего отбора. Использовали агаризованную среду Чапека с содержанием сахарозы 0.3 %, приготовленную на природной морской воде соленостью 24 ‰ (Литвинов, Дудка, 1975). Перед посевом каждый образец перемешивали в пробирке стерильным шпателем. После этого 1 см³ грунта из каждой пробирки смешивали с 10 мл стерильной морской воды. По 1 мл полученной суспензии переносили в чашки Петри и стерильным шпателем распределяли по поверхности среды. Чашки с посевом инкубировали 3 недели при температуре 10 °С, затем подсчитывали общее число колоний и каждого морфотипа.

Из этих данных вычисляли количество спор в 1 см³ исходного грунта; рассчитывали обилие (Q) и частоту встречаемости (A) каждого морфотипа в образцах (Мирчинк, 1988). Видовую идентификацию проводили в чистой культуре, с использованием определителей и оригинальных статей. Названия и положение таксонов унифицированы с использованием базы данных CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherland; адрес в интернете: www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm) и 9-го издания «Словаря грибов Эйнсворта и Бисби» (Ainsworth and Bisby's., 2001; электронный вариант в интернете: www.indexfungorum.org/Names/fungic.asp). Анаморфные грибы приведены отдельно, в алфавитном порядке, с разделением на гифо- и целомицеты (Domsh et al., 1980).

Всего из исследованных образцов было выделено 599 изолятов мицелиальных грибов (см. таблицу). Из отдельных образцов выделено от 12 до 144 изолятов, что в пересчете на 1 см³ исходного грунта составляет от десятков (n × 10) до сотен

Общее число колоний в образцах, встречаемость (A, %) и обилие (Q, %) выделенных видов грибов

Виды	Общее число колоний	A	Q
<i>Zygomycota</i>			
<i>Absidia</i> sp. 6.1	1	10	0.2
<i>Mortierella</i> sp. 8.1	1	10	0.2
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	2	20	0.3
<i>Mucor</i> sp. 9.1	2	20	0.3
<i>Ascomycota</i>			
<i>Emericellopsis minima</i> Stolk	3	30	0.5
<i>Emericellopsis</i> sp. 3.1	3	10	0.5
<i>Pseudeurotium zonatum</i> J. F. H. Beyma	7	40	1.2
<i>Pseudogymnoascus roseus</i> Raitto	9	40	1.5
Несовершенные грибы			
Гифомицеты			
<i>Acremonium chrysogenum</i> (Thurmon. et Sukapure) W. Gams	10	40	1.7
<i>A. fuci</i> Summerb., Zuccaro et W. Gams	1	10	0.2
<i>A. furcatum</i> (Moreau et V. Moreau) W. Gams	5	20	0.8
<i>A. kiliense</i> Grütz	7	50	1.2
<i>A. rutilum</i> W. Gams	6	30	1
<i>A. strictum</i> W. Gams	11	20	1.8
<i>A. tubakii</i> W. Gams	2	10	0.3
<i>Acremonium</i> cf. <i>incoloratum</i> (Sukapure et Thurmon.) W. Gams	1	10	0.2
<i>Acremonium</i> cf. <i>salmonum</i> W. Gams et Lodha	1	10	0.2
<i>Acremonium</i> sp. 1.1	1	10	0.2
<i>Acremonium</i> sp. 6.1 (sect. <i>Nectrioidea</i>)	1	10	0.2
<i>Acremonium</i> sp. 9.1	1	10	0.2
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	1	10	0.2
<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer	2	10	0.3
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	1	10	0.2
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries	11	50	1.8
<i>C. herbarum</i> (Pers.) Link	4	30	0.7
<i>Dendryphiella arenaria</i> Nicot	9	20	1.5

Виды	Общее число колоний	A	Q
<i>Dendryphiella salina</i> (G. K. Sutherland) Pugh et Nicot	5	20	0.8
<i>Fusarium moniliforme</i> J. Sheldon	2	10	0.3
<i>F. oxysporum</i> Schldtl.	8	30	1.3
<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Sigler et J. W. Carmich. var. <i>pannorum</i>	29	60	4.8
<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes var. <i>murorum</i>	1	10	0.2
<i>Isaria farinosa</i> (Holmsk.) Fr.	2	10	0.3
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	16	30	2.7
<i>P. chermesinum</i> Biourge	1	10	0.2
<i>P. chrysogenum</i> Thom	90	90	15
<i>P. citrinum</i> Thom	2	10	0.3
<i>P. corylophyllum</i> Dierckx	5	10	0.8
<i>P. cyclopium</i> Westling	16	40	2.7
<i>P. expansum</i> Link	59	80	9.8
<i>P. frequentans</i> Westling	7	40	1.2
<i>P. italicum</i> Wehmer	32	30	5.3
<i>P. janczewskii</i> K. M. Zalessky	2	20	0.3
<i>P. janthinellum</i> Biourge	6	10	1
<i>P. lanosum</i> Westling	8	20	1.3
<i>P. nalgiovense</i> Laxa	23	60	3.8
<i>P. palitans</i> Westling	6	10	1
<i>P. paxilli</i> Bainier	4	10	0.7
<i>P. raistrickii</i> G. Smith	3	10	0.5
<i>P. restrictum</i> J. C. Gilman et Abbott	2	10	0.3
<i>P. roseopurpureum</i> Dierckx	2	20	0.3
<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	1	10	0.2
<i>P. spinulosum</i> Thom	4	30	0.7
<i>P. steckii</i> K. M. Zalessky	10	30	1.7
<i>P. thomii</i> Maire	5	10	0.8
<i>P. variable</i> Sopp	38	50	6.3
<i>P. vinaceum</i> J. C. Gillman et Abbott	6	50	1
<i>P. viridicatum</i> Westling	4	10	0.7
<i>Phialophora cinerescens</i> (Wollenw.) J. F. H. Beyma	1	10	0.2
<i>P. fastigiata</i> (Lagerb. et Melin) Conant	1	10	0.2
<i>Pochonia suchlasporium</i> (W. Gams et Dackman) Zare et W. Gams	1	10	0.2
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> W. Gams	9	50	1.5
<i>T. inflatum</i> W. Gams	41	90	6.8
<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst.	2	10	0.3
<i>T. hamatum</i> (Bonord.) Bainier	1	10	0.2
<i>T. harzianum</i> Rifai	1	10	0.2
<i>T. koningii</i> Oudem.	3	10	0.5
<i>T. viride</i> Pers.	14	60	2.3
<i>Ulocladium</i> sp. 9.1	2	10	0.3
<i>Wardomyces anomalus</i> F. T. Brooks et Hausford	1	10	0.2
Целомицеты			
<i>Phoma exigua</i> Desm.	4	30	0.7
<i>Ph. herbarum</i> Westend.	6	30	1
<i>Phoma</i> sp. 5.1	1	10	0.2
<i>Phoma</i> sp. 5.2	1	10	0.2
Стерильный мицелий	8	40	1.3
Общее число колоний	599	—	—

($n \times 10^2$) грибных пропагул. Полученные величины совпадают или на порядок ниже аналогичных для грунтов литоральной зоны и на 2—4 порядка ниже, чем для почв наземных ценозов в этом районе (Бубнова, Великанов, 2004; Бубнова, 2005). Кроме того, они совпадают с известными данными о численности грибных пропагул в донных грунтах некоторых акваторий Дальнего Востока (Слинкина, Пивкин, 2004; Худякова, 2004). Подобные сведения из других районов Мирового океана из литературы неизвестны. Обычно основным фактором, влияющими на численность грибов в донных осадках, считается характер грунта. Например, для сублиторали Японского моря наибольшая численность грибов отмечена в илистых грунтах по сравнению с песчаными, ракушечными и некоторыми другими (Худякова и др., 2000; Слинкина, Пивкин, 2004; Худякова, 2004). Отметим, что сходная тенденция наблюдается на литорали Белого моря: в илистых грунтах численность грибных пропагул может быть на 2 порядка выше, чем в песчаных (Бубнова, 2005). В данной работе попытки связать общую численность грибных пропагул с какими-то известными характеристиками точек (глубина, характер грунта, положение на рельефе и т. п.) ни к чему не привели — нам не удалось выявить факторы, связанные с этой величиной.

Все выделенные спороносящие культуры мы отнесли к 73 морфотипам, 65 из которых идентифицировали до уровня вида, а остальные — до уровня рода; всего были выделены представители 24 родов. Кроме того, было выделено 8 различных изолятов стерильного мицелия (см. таблицу). Из родов наиболее разнообразен *Penicillium* Link — 25 видов, менее богат *Acremonium* Link — 12 морфотипов (7 видов и 5 идентифицировано до уровня рода), а также *Trichoderma* Pers. (5 видов), *Cladosporium* Link (5 морфотипов, 2 вида) и *Phoma* Sacc. (4 вида). Остальные роды представлены 3 и менее морфотипами. Отметим, что полученные нами результаты существенно дополняют известные данные о видовом богатстве грибов европейских морей (Landy, Jones, 2006).

Если обратиться к таксономическому богатству грибов в исследованных грунтах, то можно отметить следующее: было выделено всего 5 морфотипов, отнесенных к трем родам мукоровых грибов (*Absidia*, *Mortierella* и *Mucor*), из которых один был идентифицирован до уровня вида (*Mucor hiemalis*), а остальные — только до уровня рода. Из аскомицетов были отмечены представители трех родов: *Emericellopsis*, *Pseudeurotium* и *Pseudogymnoascus*, причем первого — три различных морфотипа, а остальных — по одному виду. Все остальные выделенные грибы относятся к несовершенным, из них четыре — представители рода *Phoma* (пикнидиальные грибы, целомицеты), остальные — гифомицеты. Количество изолятов, отнесенных к различным таксономическим группам грибов, распределено следующим образом: мукоровые — 6; аскомицеты — 22; несовершенные — 571, из них 8 — стерильные, 12 — целомицеты и 551 — изоляты гифомицетов. Таким образом, основная доля принадлежит к несовершенным грибам-гифомицетам, что обычно при использовании культуральных методов (Kohlmeier, Kohlmeier, 1979; Худякова, 2004).

Видовой состав грибов в отдельных точках значительно различается: ни один вид не был обнаружен во всех исследованных образцах, большая часть видов определена только в одном образце. В большинстве работ основным фактором, влияющим на видовое богатство грибов в донных грунтах, считается механический состав: чем больше ила, тем выше видовое богатство грибов (Худякова и др., 2000; Худякова, 2004). В нашем случае связи между структурой видовых комплексов грибов и известными характеристиками точек отбора проб не обнаружено.

В число доминантов в грибных комплексах исследованных грунтов (встречаемость не менее 60 %; Мирчинк, 1988) входят следующие виды: *Geomyces pannorum* (вместе с изолятами, образовавшими в культуре половое спороношение, — *Pseudogymnoascus roseus* — 80 %), *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. nalgiovense*, *Tolyposcladium inflatum* и *Trichoderma viride*. Из перечисленных видов наиболее обильны *Penicillium chrysogenum* (15 %); остальные менее обильны: *P. expansum* — 9.8 %, *Tolyposcladium inflatum* — 6.8, *Geomyces pannorum* + *Pseudogymnoascus roseus* — 6.3, *Penicillium nalgiovense* — 3.8, *Trichoderma viride* — 2.3 %.

Представители рода *Penicillium*, входящие в этот комплекс, — обычные, широко и повсеместно распространенные виды. Они встречаются в почвах, пресной и морской воде, на растительных и животных остатках, в воздухе, пыли, льдах и т. д. (Raper, Thom, 1949; Domsh et al., 1980; Pitt, 1991). Часто эти виды рассматриваются как сорные, имеющие столь широкое распространение благодаря обильному спороношению, что, скорее всего, справедливо и для рассматриваемого нами случая. Вид *P. roseus* вместе с изолятами, дающими только бесполое спороношение — *Geomyces pannorum*, — доминант грибных комплексов подзолистых почв, распространенных и на берегах Белого моря (Domsh et al., 1980; Согонов, Марфенина, 1999; Бубнова, Великанов, 2004). Этот вид рассматривают как маркер процесса подзолообразования в почве; известно о его психротолерантности (Кирцидели, 1999а, 1999б). Интересно, что этот вид был самым обильным среди грибов, выделенных из криопэггов; в экспериментах при низкой температуре, повышенной солености среды и достаточном количестве питательных веществ он образовывал заметные колонии (Gilichinsky et al., 2005). В то же время наши собственные эксперименты показали, что изоляты этого вида имеют очень слабый рост в условиях повышенной солености, а также под слоем морской воды (Бубнова, 2005). Нам представляется, что доминирование *G. pannorum* в комплексе видов донных грунтов связано, скорее всего, с постоянным поступлением его пропагул с береговыми стоками, а не со значительным развитием его на дне. *Tolyposcladium inflatum* — вид, обычный для холодных местообитаний, известный своей психротолерантностью (Bisset, 1983; Кирцидели, 1999а). В районе исследования он регулярно встречается в почвах приморских лугов и может развиваться в условиях повышенной солености и в слое морской воды (Бубнова, 2005). В связи с этим мы не исключаем возможность его развития в донных грунтах. *Trichoderma viride* — очень широко распространенный, космополитный вид, встречается на самых разнообразных субстратах (Domsh et al., 1980; Александрова, 2003). В районе исследования он обычен в почвах приморских лугов высокого уровня и подзолистых почвах, но плохо переносит повышенную соленость (Бубнова, 2005). Его доминирование в донных грунтах, скорее всего, также связано с постоянным поступлением пропагул с береговыми стоками.

Таким образом, комплекс доминирующих видов состоит из широко распространенных видов и видов, обычных в почвах исследуемого района. Примерно такая же ситуация наблюдается и в других районах, где проводились аналогичные исследования (Sparrow, 1937; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Артемчук, 1981; Худякова и др., 2000; Худякова, 2004; Пивкин и др., 2006).

Рассматривая весь спектр выделенных видов, можно отметить некоторые дополнительные особенности, характерные для микобиоты исследованных грунтов. Во-первых, три из выделенных видов известны как морские: *Acremonium fuci*, *Dendryphiella arenaria* и *D. salina*. Первый описан как эндофит бурой водоросли *Fucus serratus* (Zuccago et al., 2004), но легко выделяется и поддерживается в культуре. Представители рода *Dendryphiella* — сапротрофы, широко распространенные в умеренных и холодных морях (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979). Ранее эти виды выделялись с различных субстратов литоральной зоны в районе исследования, причем виды рода *Dendryphiella* — как доминанты на водорослях-макрофитах и в почвах литорали (Бубнова, 2005: ранее ошибочно определялся нами как *Bipolaris australiensis* (M. V. Ellis) Tsuda et Ueyama). Кроме собственно морских видов, другой характерной группой являются *Cephalosporium*-подобные (Gams, 1971) анаморфы, в первую очередь виды рода *Acremonium*, а также *Emericellopsis*, имеющий такие анаморфы. Грибы этой группы единичны в подзолистых почвах, но широко распространены в различных местообитаниях литоральной зоны в данном районе (Бубнова, 2005). Для исследованных грунтов показано высокое разнообразие грибов этой группы, хотя большинство выделенных морфотипов встречалось единично; кроме того, значительная часть изолятов не была идентифицирована, так как не может быть достоверно отнесена к какому-либо из известных видов. В исследованиях донных грунтов в других районах обычно не отмечается высокого разнообразия *Cepha-*

losporium-подобных грибов (Sparrow, 1937; Kohlmeier, Kohlmeier, 1979; Артемчук, 1981; Худякова и др., 2000; Худякова, 2004; Пивкин и др., 2006). Однако некоторые исследователи полагают, что в морских местообитаниях в целом, и в частности в донных грунтах, характерно присутствие именно этих грибов (Tubaki, 1973; Zuccaro et al., 2004).

В заключение еще раз отметим, что численность грибных пропагул в исследованных донных грунтах составляет от десятков ($n \times 10$) до сотен ($n \times 10^2$) на 1 см³ исходного грунта и не связана с какими-то известными характеристиками точек (глубина, положение на рельефе, характер грунта и др.). Разнообразие микобиоты высоко и очень неоднородно: 65 видов из 24 родов; 8 морфотипов идентифицированы только до уровня рода, большинство видов встречалось единично и только в отдельных образцах. Подавляющее большинство выделенных грибов — это несовершенные гифомицеты, относящиеся к 61 виду из 15 родов. Другие группы — это мукоровые зигомицеты, аскомицеты, несовершенные пикнидиальные грибы и стерильный мицелий. Микобиота исследованных грунтов представлена в основном космополитными видами (*Penicillium* spp.); велика доля видов, доминирующих или обычных в почвах фитопленозов суши в этом районе (*Tolypocladium* spp., *Pseudogymnoascus roseus* + *Geomyces pannorum*, *Trichoderma* spp.). Облигатно морских видов обнаружено три, все остальные — наземного происхождения. Отличительной особенностью микобиоты исследованных грунтов является относительно высокая численность и разнообразие видов родов *Acremonium*. Какой-либо связи структуры видовых комплексов с известными характеристиками точек отбора не показано.

Автор выражает признательность В. О. Мокиевскому (Институт океанологии РАН) за содействие в сборе материала для исследования.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 07-04-00698).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова А. В. Род *Trichoderma* Pers.: Fr. Новое в систематике и номенклатуре грибов. М.: Национальная академия микологии, 2003. С. 219—275.

Артемчук Н. Я. Микофлора морей СССР. М.: Наука, 1981. 192 с.

Бубнова Е. Н. Изменения комплексов почвообитающих грибов при переходе от зональных почв к морским экотопам (на примере побережья Кандалакшского залива Белого моря): Автореф. дис. ... к. б. н. М.: МГУ, 2005. 24 с.

Бубнова Е. Н., Великанов Л. Л. Грибы разных типов почв Беломорской биологической станции МГУ // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38, вып. 2. С. 26—33.

Кирцидели И. Ю. Почвенные микромицеты арктических тундр Таймырского побережья Карского моря // Микология и фитопатология. 1999а. Т. 33, вып. 1. С. 19—23.

Кирцидели И. Ю. Почвенные микромицеты горных тундр Хибин (Кольский полуостров) // Микология и фитопатология. 1999б. Т. 33, вып. 6. С. 386—391.

Литвинов М. А., Дудка И. А. Методы исследования микроскопических грибов пресных и соленых (морских) водоемов. Л.: Наука, 1975. 226 с.

Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: МГУ, 1988. 220 с.

Пивкин М. В., Кузнецова Т. А., Сова В. В. Морские грибы и их метаболиты. Владивосток: Дальнаука, 2006. 247 с.

Слинкина Н. Н., Пивкин М. В. Видовой состав грибов в морских грунтах некоторых акваторий залива Анива (о. Сахалин) // Матер. Междунар. конф. «Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитопленозах». Минск, 2004. С. 224—226.

Согонов М. В., Марфенина О. Е. Особенности микобиоты приморских маршей Кандалакшского залива Белого моря // Вест. МГУ. 1999. Сер. 16 (Биология), № 3. С. 42—47.

Худякова Ю. В. Грибы грунтов Японского моря (Российское побережье) и их биологически активные метаболиты: Автореф. дис. ... к. б. н. Владивосток, 2004. 19 с.

Худякова Ю. В., Пивкин М. В., Кузнецова Т. А., Светашев В. И. Грибы грунтов Японского моря (Российское побережье) и их биологически активные метаболиты // Микробиология. 2000. Т. 69, № 5. С. 722—726.

Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th ed. // Eds P. M. Kirk et al. Wallingford: CAB, 2001. 624 p.

Bisset J. Notes of Tolypocladium and related genera // Can. J. Bot. 1983. Vol. 61. P. 1311—1329.

Domsh K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of the soil fungi. Acad. Press, 1980. 1070 p.

Gams W. Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Stuttgart, 1971. 262 p.

Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., Shcherbakova V., Petrovskaya L., Ozerskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Laurinavichuis K., Pecheritsina S., Fattakhova R., Tiedje J. M. Biodiversity of cryopegs in permafrost // FEMS Microb. Ecol. 2005. Vol. 53. P. 117—128.

Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine mycology — the higher fungi. Acad. Press, 1979. 690 p.

Kohlmeyer J., Volkman-Kohlmeyer B. Fungi from coral reefs: a commentary // Mycol. Res. 2003. Vol. 107, N 4. P. 386—387.

Landy E. T., Jones G. M. What is the Fungal Diversity of Marine Ecosystems in Europe? // Mycologist. 2006. Vol. 20. P. 15—21.

Pitt J. A laboratory guide to common Penicillium species. Commonwealth scientific and industrial research organisation. N. S. W. Australia, 1991. 187 p.

Pivkin M. V., Khudyakova Y. V. A new species of Aphanoascus (Ascomycota) with a Malbranchea anamorph from marine bottom deposits // Mycotaxon. 2002. Vol. 80. P. 7—10.

Raper K. B., Thom C. A. A manual of the Penicillia. Baltimor: The Wet W Co, 1949. 875 p.

Sparrow F. K., jr. The occurrence of saprophytic fungi in marine muds // Biol. Bull. 1937. Vol. 73. P. 242—248.

Tubaki K. Aquatic sediments as a habitat of Emericellopsis, with a description of an undescribed species of Cephalosporium // Mycologia. 1973. Vol. 65. P. 938—941.

Zuccaro A., Sammerbell R. C., Gams W., Shroers J. I., Mitchell J. I. A new Acremonium species associated with Fucus spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine Emericellopsis clade // Stud. Mycol. 2004. Vol. 50, pt 2. P. 283—297.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
katya.bubnova@gmail.com

Поступила 12 II 2009

РЕЗЮМЕ

В данном сообщении впервые представлены сведения о грибах, обитающих в донных осадках Белого моря. Были изучены сообщества микроскопических грибов в 10 образцах грунта, отобранных на глубине 54—108 м. Для выделения грибов использовали среду Чапека на основе морской воды (24 ‰). В результате были выделены грибы 73 морфотипов (65 видов), относящихся к 24 родам, а также стерильные изоляты. Только три из выделенных видов — *Acremonium fuci*, *Dendryphiella arenaria* and *D. salina* — являются морскими грибами, все остальные обычны в почвах и других наземных местообитаниях. Наиболее частыми в исследованных грунтах были *Geomyces pannorum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. nalgiovense*, *Tolypocladium inflatum* и *Trichoderma viride*. Кроме того, в исследованных грунтах отмечена высокая частота *Cephalosporium*-подобных анаморфных грибов.

Ключевые слова: биоразнообразие, морские грибы, донные осадки, Белое море.

SUMMARY

This paper is a first report about fungi of White Sea bottom sediments. We studied the microfun-
gal community in sediments, 10 samples from 54—108 m depth were investigated. Using cultivation
on Czapek agar with seawater (24 ‰), 73 morphotypes (65 species) belonging to 24 genera were iso-
lated. Also hyaline and dark non-sporing mycelia were isolated. Only three of isolated species: *Acre-
monium fuci*, *Dendryphiella arenaria* and *D. salina* can be regarded as obligate marine fungi. All the
other are the fungi originally described from soil or other terrestrial habitats. *Geomyces pannorum*,
Pseudogymnoascus roseus, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. nalgiovense*, *Tolypocladium*
inflatum and *Trichoderma viride* are most often in these sediments. In the examined samples the high
frequency of occurrence was typical for *Cephalosporium*-like anamorphic fungi.

Key words: biodiversity, marine fungi, bottom sediments, White Sea.

УДК 582.281.21 : 581.526.426.2(571.6)

© Л. Н. Егорова

**ПОЧВООБИТАЮЩИЕ ЗИГОМИЦЕТЫ (*ZYGOMYCETES*:
MUCORALES, *MORTIERELLALES*) ХВОЙНЫХ ЛЕСОВ
РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА**

EGOROVA L. N. SOIL *ZYGOMYCETES* (*MUCORALES*, *MORTIERELLALES*) OF CONIFEROUS
FORESTS OF THE RUSSIAN FAR EAST

Хвойные леса, занимающие почти 3/4 территории российского Дальнего Востока, представлены светлохвойными лиственничными, темнохвойными елово-пихтовыми хвойно-широколиственными формациями. Главнейшими эдификаторами в темнохвойных лесах являются ель аянская (*Picea ajanensis* (Lindl. et Gord.) Fisch. ex Carr.) и пихта белокорая (*Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim.), в хвойно-широколиственных — сосна кедровая корейская (*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.) и дуб монгольский (*Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.), в светлохвойных — лиственница Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.). Своеобразные стелющиеся леса-заросли кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) характерны для берингийской лесотундровой области и заносимых снегами склонов гор. В почвенном покрове лиственничных лесов материковой части региона преобладают мерзлотно-таежные светлосемы и перегнойно-карбонатные почвы, в елово-пихтовых лесах — буротаежные, в хвойно-широколиственных — бурые лесные почвы. На п-ове Камчатка и Большой Курильской гряде (о-ва Шумшу и Парамушир) распространены дерновые почвы, на о. Сахалин и Малой Курильской гряде (о-ва Итуруп, Кунашир, Шикотан) — почвы подзолистого типа.

Более 200 видов микромицетов выделено из почв хвойных лесов Дальнего Востока (Егорова, 1986, 1990, 1999, 2003, 2004, 2006, 2008; Флора., 1986, 1998, 2002, 2006; Грибы., 1989; Гришкан, 1997; Egorova, 1998; Кадастр., 2002; Егорова и др., 2006). Среди представителей различных систематических групп, входящих в состав почвообитающих микромицетов, грибы класса *Zygomycetes* составляют относительно невысокий процент (обычно 10—15 %) от общего числа выявленных видов, но они постоянно присутствуют в почве, где участвуют в процессах минерализации органического вещества и являются, таким образом, непременным компонентом микобиоты почв любого ценоза (Милюко, 1974; Мирчинк, 1976; Domsch et al., 1980; Микромицеты почв, 1984; Watanabe, 1994). В настоящее время на Дальнем Востоке отмечено 49 видов зигомицетов из 15 родов, в том числе 36 видов из 13 родов порядка *Mucorales* и 13 видов из 2 родов порядка *Mortierellales*, выделенных из почв хвойных лесов региона (табл. 1).

Наиболее многовидовой род *Mucor* представлен 15 видами, 4 из которых — *M. circineloides*, *M. hiemalis*, *M. plumbeus*, *M. racemosus* — относятся к числу широко распространенных и часто встречающихся видов в почвах Дальнего Востока (табл. 2). В почвах хвойных лесов региона они отмечены повсеместно, и в частности на охраняе-

Таблица 1

**Таксономическая структура почвообитающих зигомицетов хвойных лесов
российского Дальнего Востока (по системе: Kirk et al., 2001)**

Порядок	Семейство	Род	Число видов	
<i>Mortierellales</i>	<i>Mortierellaceae</i>	<i>Mortierella</i>	10	
		<i>Umbelopsis</i>	3	
<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Absidia</i>	7	
		<i>Actinomucor</i>	1	
		<i>Circinella</i>	2	
		<i>Gongronella</i>	1	
		<i>Mucor</i>	15	
		<i>Rhizopus</i>	2	
		<i>Zygorhynchus</i>	2	
		<i>Cunninghamellaceae</i>	<i>Cunninghamella</i>	1
		<i>Choanephoraceae</i>	<i>Blakeslea</i>	1
		<i>Syncephalastraceae</i>	<i>Syncephalastrum</i>	1
		<i>Thamnidaceae</i>	<i>Helicostylum</i>	1
			<i>Thamnidium</i>	1
			<i>Thamnostylum</i>	1
Всего видов			49	

Таблица 2

Распределение видов зигомицетов в почвах хвойных лесов российского Дальнего Востока

Вид гриба	Мерзлотно-таежные	Буро-таежные	Дерновые	Подзолистые	Бурые лесные
<i>Absidia blakesleeana</i> Lendn.	—	—	—	—	+
<i>A. californica</i> J. J. Ellis et Hesselt.	—	—	—	—	+
<i>A. coerulea</i> Bainier	+	+	+	+	+
<i>A. corymbifera</i> (Cohn) Sacc. et Trotter	+	—	—	+	+
<i>A. cylindrospora</i> Hagem	—	—	+	—	—
<i>A. glauca</i> Hagem	—	—	—	—	+
<i>A. spinosa</i> var. <i>spinosa</i> Lendn.	—	—	—	—	+
<i>A. spinosa</i> var. <i>azygospora</i> Boedijn	+	—	—	—	—
<i>Actinomucor elegans</i> (Eidam.) C. R. Benj.	—	+	—	—	+
<i>Blakeslea trispora</i> Thaxt.	—	—	—	—	+
<i>Circinella muscae</i> (Sorokin) Berl. et De Toni	—	—	—	+	—
<i>C. rigida</i> G. Sm.	+	—	—	—	—
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt.	—	—	—	+	—
<i>Gongronella butleri</i> (Lendn.) Peyronel et Dal Vesco	—	+	+	—	+
<i>Helicostylum elegans</i> Corda	—	—	—	—	+
<i>Mortierella alpina</i> Peyronel	+	+	+	+	+
<i>M. gamsii</i> Milko	—	—	—	—	+
<i>M. humilis</i> Linnem. ex W. Gams	+	—	+	—	—
<i>M. lignicola</i> (G. W. Martin) W. Gams et Moreau	—	+	+	—	+
<i>M. longicollis</i> Dixon-Stew.	+	—	—	—	—
<i>M. minutissima</i> Tiegh.	+	—	—	—	—
<i>M. polycephala</i> Coem.	—	+	—	—	—
<i>M. strangulata</i> Tiegh.	+	—	—	—	—
<i>M. stylospora</i> Dixon-Stew.	—	+	—	—	+
<i>M. verticillata</i> Linnem.	+	—	—	—	—

Таблица 2 (продолжение)

Вид гриба	Мерзлотно-таежные	Буро-таежные	Дерновые	Подзолистые	Бурьелесные
<i>Mucor adventitius</i> Oudem.	—	+	—	—	—
<i>M. circinelloides</i> Tiegh.	+	+	+	+	+
<i>M. corticola</i> Hagem	—	+	+	—	+
<i>M. genevensis</i> Lendn.	—	—	—	—	+
<i>M. globosus</i> A. Fisch.	—	—	—	—	+
<i>M. griseo-ochraceus</i> Naumov	—	+	—	—	—
<i>M. guilliermondii</i> Nadson et Philippow	—	+	—	—	—
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	+	+	+	+	+
<i>M. janssenii</i> Lendn.	—	—	—	—	+
<i>M. lausannensis</i> Lendn.	—	+	—	—	—
<i>M. piriformis</i> A. Fisch.	—	—	—	—	+
<i>M. plumbeus</i> Bonord.	+	+	+	+	+
<i>M. racemosus</i> Fresen.	+	+	+	+	+
<i>M. silvaticus</i> Hagem	—	+	—	+	—
<i>M. zonatus</i> Milko	—	—	—	—	+
<i>Rhizopus oryzae</i> Went. et Prins. Geerl.	—	—	—	—	+
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	—	+	+	+	+
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (Cohn.) J. Schröt.	—	—	—	—	+
<i>Thamnidium elegans</i> Link	—	—	—	—	+
<i>Thamnostylum piriforme</i> (Bainier) Arx et H. P. Upadhyay	—	—	—	—	+
<i>Umbellopsis isabellina</i> (Oudem.) W. Gams	+	+	+	+	+
<i>U. ramanniana</i> (A. Möller) W. Gams	+	+	—	+	+
<i>U. vinacea</i> (Dixon-Stew.) Arx	+	+	+	+	+
<i>Zygorhynchus japonicus</i> Komin.	—	+	—	—	+
<i>Z. moelleri</i> Vuill.	—	+	—	+	+

мых природных территориях. Это заповедники Уссурийский, Лазовский, Сихотэ-Алинский, «Кедровая падь», Горно-таежная станция ДВО РАН, Верхнеуссурийский стационар Биолого-почвенного института ДВО РАН, Ботанический сад-институт ДВО РАН (Приморский край), заповедники Комсомольский, Большехехцирский (Хабаровский край), Хинганский, Зейский, урочище «Мухинка» (Амурская обл.), Кроноцкий заповедник (Камчатский край), Курильский (Сахалинская обл.), стационар «Абориген» Ин-та биологических проблем Севера ДВО РАН (Магаданская обл.).

Характерный для луговых и сельскохозяйственных почв региона вид *M. corticola* найден в почвах хвойно-широколиственных лесов (заповедники Уссурийский, Хинганский, «Кедровая падь»), а также в почвах ельников Камчатки (окр. пос. Козыревск), Верхнеуссурийского стационара (южный Сихотэ-Алинь) и верховий р. Большая Уссурка (средний Сихотэ-Алинь).

В почвах аянских и сибирских ельников, произрастающих в бассейне нижнего Амура, а также в бассейнах рек Челасин, Мая, Коппи (Алдано-Охотский водораздел, материковое побережье Татарского пролива) обнаружены такие виды, как *M. griseo-ochraceus* и *M. adventitius*.

В почвах хвойно-широколиственных лесов найдены *M. piriformis* (заповедник «Кедровая падь»), *M. globosus* (Малая Курильская гряда), *M. zonatus* (Уссурийский заповедник), *M. genevensis* (долина р. Уссури), *M. janssenii* (Большехехцирский заповедник). Последний отмечен там же и в почве лиственничника.

Такие виды, как *M. lausannensis*, *M. guilliermondii*, *M. silvaticus*, изолированы из почв пихтово-еловых, лиственничных и хвойно-широколиственных лесов среднего и южного Сихотэ-Алиня (Сихотэ-Алинский заповедник, Верхнеуссурийский стационар, долины рек Черемуховая и Большая Уссурка). Вид *M. silvaticus* отмечен также на Сахалине в почве редкостойного лишайникового лиственничника (п-ов Шмидта) и смешанного леса с преобладанием пихты (окр. г. Углегорск, пос. Тымовск).

Большинство представителей рода *Absidia* характерно преимущественно для почвенной микобиоты хвойно-широколиственных лесов — это *A. coerulea*, *A. spinosa* var. *spinosa*, *A. corymbifera*, *A. glauca* (заповедники Уссурийский, Лазовский, Большехехцирский, «Кедровая падь», урочище «Мухинка»), *A. blakesleeana* (окр. г. Комсомольск-на-Амуре), *A. californica* (Большехехцирский заповедник; по: Ito, Yokoyama, 1985). Вид *A. coerulea* обнаружен, кроме того, в почвах хвойно-широколиственных лесов, произрастающих на Малой Курильской гряде, в почве пихтово-елового леса в Хинганском заповеднике, а также в почвах лиственничников и группировок кедрового стланика в Кроноцком заповеднике, где в виде единичных изолятов найден также вид *A. cylindrospora*. Только в почве лиственничного редколесья Магаданской обл. (долина р. Таскан, окр. пос. Сусуман) отмечен вид *A. spinosa* var. *azygospora*.

Представитель таксономически близкого к *Asidia* рода *Gongronella* — *G. butleri* (= *A. butleri*) обнаружен в почвах елово-пихтовых и хвойно-широколиственных лесов, в основном на территории упомянутых выше заповедников.

К числу широко распространенных и часто встречающихся на юге Дальнего Востока почвенных микромицетов принадлежат виды родов *Rhizopus* и *Zygorhynchus* — *R. stolonifer* и *Z. moelleri*. Они отмечены в основном на охраняемых природных территориях материковой части региона — в почвах кедрово-широколиственных (заповедники Уссурийский, Лазовский, Сихотэ-Алинский, «Кедровая падь», Большехехцирский) и лиственнично-березовых лесов (Зейский заповедник), а *R. stolonifer*, помимо того, — в почвах ельников, лиственничников и группировок кедрового стланика на Камчатке (Кроноцкий заповедник, окр. пос. Мильково, Козыревск), Сахалине (пик Чехова, долины рек Воловская, Орловка) и Курильских островах (окр. пос. Малокурильск, Буревестник, Северо-Курильск). В Уссурийском заповеднике обнаружено еще 2 вида из родов *Rhizopus* и *Zygorhynchus* — *R. oryzae* и *Z. japonicus*. Последний найден также в Большехехцирском и Зейском заповедниках.

Только на Сахалине (Анивский, Невельский, Поронайский, Охинский районы), в почвах елово-пихтовых и лиственничных лесов с примесью кедрового стланика отмечены такие зигомицеты, как *Cunninghamella echinulata* и *Circinella muscae*. Еще один вид рода *Circinella* — *C. rigida* выделен из почвы сфагнового лиственничного редколесья в долине реки Колымы (Гришкан, 1994).

Представитель рода *Actinomucor* — *A. elegans* изолирован из почвы кедрово-широколиственного леса в заповедниках Большехехцирский, Уссурийский, «Кедровая падь», а также из почвы лиственнично-березового леса в Зейском заповеднике.

Только в почвах хвойно-широколиственных лесов лесопарковой зоны г. Владивостока (Ботанический сад-институт, Сад-город, окр. бухты Лазурная, о-ва Русский и Попова) обнаружены *Blakeslea trispora* (= *Choanephora trispora* (Thaxt.) S. Sinha), *Thamnidium elegans*, *Thamnostylum piriforme*, *Syncephalastrum racemosum*, *Helicostylum elegans*.

Из 10 видов рода *Mortierella*, выделенных из почв хвойных лесов региона, 6 видов — *M. alpina*, *M. humilis*, *M. longicollis*, *M. minutissima*, *M. strangulata*, *M. verticillata* — найдены в почвах пойменных лиственничных лесов и редколесий севера Дальнего Востока — в Магаданской обл. (долины рек Армань, Нера, Ола) и Корьякском автономном округе (долины рек Ачайваям, Кубавеем, Укэляят). Указанный выше вид *M. alpina* обнаружен также под кедровым стлаником на о-вах Сахалин и Шумшу и под пихтово-еловым лесом в Комсомольском заповеднике. На территории заповедника, в почве багульникового лиственничника и хвойно-широколиственного леса отмечены еще 2 вида из рода *Mortierella* — *M. polycephala* и *M. lignicola*. Последний встречается, помимо того, в почвах ельников Камчатки (окр. пос. Козыревск), лиственничников и елово-пихтовых лесов в бассейнах рек Амур, Уда, Амгунь. В почвах хвойно-широколиственных лесов юга Дальнего Востока отмечены *M. gamsii* (Горно-тежная станция) и *M. stylospora* (Уссурийский и Сихотэ-Алинский заповедники, Верхнеуссурийский стационар). Вид *M. stylospora* обнаружен также в почвах ельников и лиственничников в долинах рек Черемуховая и Большая Уссурка (средний Сихотэ-Алинь).

Род *Umbelopsis* представлен 3 видами: *U. ramanniana*, *U. isabellina*, *U. vinacea*. Типичный «лесной» вид *U. ramanniana* (= *Mucor ramannianus* A. Möller, *Mortierella ramanniana* (A. Möller) W. Gams, *Micromucor ramannianus* (A. Möller) Arx) отмечен на юге Дальнего Востока в почвах лиственничных, елово-пихтовых и хвойно-широколиственных лесов (заповедники Большехехцирский, Комсомольский, Зейский, Хинганский, Лазовский, Сихотэ-Алинский, «Кедровая падь», Уссурийский), найден также под кедровым стлаником на Сахалине (окр. пос. Ноглики). Вид *U. isabellina* (= *Mortierella isabellina* Oudem.) обнаружен, помимо того, в почвах лиственничных редколесий и кедровостланиковых группировок севера Дальнего Востока (Кроноцкий заповедник, Пенжинский хребет, Корякское нагорье, бассейны рек Таскан, Нера, Ола). Третий вид рода *Umbelopsis* — *U. vinacea* (= *Mortierella vinacea* Dixon-Stew., *Mucor angulisporus* Naumov, *Micromucor ramannianus* var. *angulisporus* Naumov ex Váňová) характеризуется повсеместным распространением во всех исследованных лесных формациях, включая группировки кедрового стланика, лиственничные, лиственнично-березовые, елово-пихтовые и хвойно-широколиственные леса. Помимо перечисленных местообитаний, этот вид отмечен в бассейнах рек Уда, Амгунь, Буряя, Селемджа, Тумнин, Лукачек, Северта, Мая.

Анализ репрезентативности зигомицетов в почвах хвойных лесов Дальнего Востока показал, что самый бедный видовой состав выявлен в почвах кедровостланиковых группировок севера Дальнего Востока и их высотных аналогов, где обнаружено всего 11 видов из 5 родов: *Mucor* — 4 вида, *Umbelopsis* — 3, *Absidia* — 2, *Mortierella* — 1, *Rhizopus* — 1. Из почв елово-пихтовых лесов выделен 21 вид зигомицетов из 8 родов: *Mucor* — 10 видов, *Mortierella* и *Umbelopsis* — по 3 вида, *Absidia*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Rhizopus* — по 1 виду каждый. В почвах лиственничников отмечено 30 видов зигомицетов из 9 родов: *Mortierella* — 9 видов, *Mucor* — 8, *Absidia* и *Umbelopsis* — по 3, *Circinella* и *Zygorhynchus* — по 2, *Actinomucor*, *Cunninghamella*, *Rhizopus* — по 1 виду каждый.

Самый богатый видовой и родовой состав почвообитающих зигомицетов выявлен в зоне произрастания хвойно-широколиственных лесов юга Дальнего Востока, где отмечено 37 видов из 13 родов: *Mucor* — 13 видов, *Absidia* — 6, *Mortierella* — 4, *Umbelopsis* — 3, *Rhizopus* и *Zygorhynchus* — по 2 вида, *Actinomucor*, *Blakeslea*, *Gongronella*, *Helicostylum*, *Syncephalastrum*, *Thamnidium*, *Thamnostylum* — по 1 виду каждый.

Таким образом, наиболее распространенными в почвах хвойных лесов Дальнего Востока зигомицетами являются представители 5 родов: *Mucor*, *Mortierella*, *Umbelopsis*, *Absidia*, *Rhizopus*. К часто встречающимся видам относятся *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *Umbelopsis isabellina*, *U. ramanniana*, *U. vinacea*, *Mortierella alpina*, *M. lignicola*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus stolonifer*.

Наибольшее видовое разнообразие представителей рода *Mucor* выявлено в почвах хвойно-широколиственных и елово-пихтовых лесов — 13 и 10 видов соответственно, что составляет 35 и 45 % от выявленного видowego состава зигомицетов соответствующих лесных формаций. Наибольшее видовое разнообразие микромицетов рода *Mortierella* — 9 видов — характерно для почв лиственничников, где они вместе с видами рода *Mucor* — 8 видов — составляют около 57 % от видowego состава зигомицетов лиственничных лесов. Род *Absidia* наиболее полно представлен (6 из 7 обнаруженных видов) в почвах хвойно-широколиственных лесов. Преимущественно из почв хвойно-широколиственных лесов изолированы также представители родов *Actinomucor*, *Gongronella*, *Zygorhynchus*. Только в почвах кедрово-широколиственных лесов юга Приморского края обнаружены виды родов *Blakeslea*, *Helicostylum*, *Syncephalastrum*, *Thamnidium*, *Thamnostylum*. Представители родов *Circinella* и *Cunninghamella* отмечены в основном в почвах елово-пихтовых и лиственничных лесов Сахалина.

Работа выполнена при поддержке грантов № 06-1-ОБН-089 и 06-1-П11-026 программ президиума РАН «Биологические ресурсы России» и «Научные основы сохранения биоразнообразия России», а также программы ДВО РАН «Комплексные исследования природной среды бассейна реки Амур».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егорова Л. Н. Почвенные грибы Дальнего Востока: Гифомицеты. Л.: Наука, 1986. 192 с.
- Егорова Л. Н. Гифомицеты Кроноцкого государственного заповедника // Криптогамические исследования на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. С. 109—112.
- Егорова Л. Н. Комплексы типичных видов почвенных микромицетов в заповедниках Дальнего Востока // IV Дальневосточная конф. по заповедному делу: Тез. докл. Владивосток, 1999. С. 64—65.
- Егорова Л. Н. Почвообитающие аскомицеты российского Дальнего Востока // Микология и фитопатология. 2003. Т. 37, вып. 2. С. 13—21.
- Егорова Л. Н. Сезонная динамика видового состава почвенных грибов Верхнеуссурийского стационара // Экосистемные исследования горных лесов Сихотэ-Алиня. Владивосток; Хабаровск: ДальНИИЛХ, 2004. С. 171—174.
- Егорова Л. Н. Сапротрофные грибы-микромицеты // Растительный и животный мир Сихотэ-Алинского заповедника. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2006. С. 73—76.
- Егорова Л. Н. Микромицеты (Hyphomycetes, Coelomycetes) хвойных лесов Дальнего Востока // Современная микология в России. М.: НАМ, 2008. Т. 2. С. 225—227.
- Егорова Л. Н., Азбукина З. М., Богачева А. В., Булах Е. М., Васильева Л. Н., Говорова О. К. Исследование микобиоты хвойных древесных пород Дальнего Востока // Научные основы сохранения биоразнообразия Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2006. С. 157—164.
- Грибы, лишайники, водоросли и мохообразные Комсомольского заповедника (Хабаровский край) / Кол. авторов. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. 144 с.
- Гришкан И. Б. Почвенные микромицеты сфагновых листовенничных редколесий в верховьях реки Колымы // Микология и фитопатология. 1994. Т. 28, вып. 1. С. 28—33.
- Гришкан И. Б. Микобиота и биологическая активность почв верховий Колымы. Владивосток: Дальнаука, 1997. 136 с.
- Кадастр растений и грибов заповедника «Кедровая падь»: Списки видов / Кол. авторов. Владивосток: Дальнаука, 2002. 157 с.
- Микромицеты почв / Под ред. В. И. Билай. Киев: Наук. думка, 1984. 264 с.
- Милько А. А. Определитель мукооральных грибов. Киев: Наук. думка, 1974. 303 с.
- Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: МГУ, 1976. 206 с.
- Флора и растительность Большехецирского заповедника (Хабаровский край) / Кол. авторов. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1986. 228 с.
- Флора и растительность Хинганского заповедника (Амурская область) / Кол. авторов. Владивосток: Дальнаука, 1998. 224 с.
- Флора, микобиота и растительность Лазовского заповедника / Кол. авторов. Владивосток: Русский остров, 2002. 216 с.
- Флора, растительность и микобиота заповедника «Уссурийский» / Кол. авторов. Владивосток: Дальнаука, 2006. 300 с.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. London: Acad. Press, 1980. Vol. 1. 859 p.; Vol. 2. 405 p.
- Егорова Л. Н. Biodiversity of soil Zygomycetes from the Russian Far East // Abstr. VI Intern. Mycol. Congr. Jerusalem, 1998. P. 25.
- Ito T., Yokoyama T. Filamentous fungi collected in the Far-eastern USSR // Res. Comm. Inst. Ferment. Osaka. 1985. N 12. P. 34—62.
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A. Ainsworth et Bisby's Dictionary of the fungi. Wallingford: CABI, 2001. 655 p.
- Watanabe T. Pictorial Atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Tokyo: CRC Press, 1994. 411 p.

РЕЗЮМЕ

Из почв хвойных лесов российского Дальнего Востока выделено 49 видов грибов из 15 родов, относящихся к классу *Zygomycetes* (*Mucorales*, *Mortierellales*). Наиболее постоянно выделяли представителей родов *Mucor*, *Umbelopsis*, *Mortierella*, *Absidia*, *Rhizopus*. К часто встречающимся видам относятся *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *Umbelopsis isabellina*, *U. ramanniana*, *U. vinacea*, *Mortierella alpina*, *M. lignicola*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus stolonifer*. Из почв кедрово-стланиковых стелющихся лесов изолировано 11 видов грибов из 5 родов, а также 21 вид из 8 родов из почв елово-пихтовых лесов, 29 видов из 9 родов из почв лиственных лесов, 37 видов из 13 родов из почв хвойно-широколиственных лесов. Представители таких родов, как *Blakeslea*, *Helicostylum*, *Syncephalastrum*, *Thamnidium*, *Thamnostylum*, были выделены только из почв кедрово-широколиственных лесов юга Приморского края.

Ключевые слова: *Zygomycetes*, почвенные грибы, хвойные леса.

SUMMARY

All data on the soil zygomycetous fungi found in coniferous forests from the Russian Far East are surveyed. Total of 49 fungal species belonging to 15 genera from the class *Zygomycetes* (*Mucorales*, *Mortierellales*) have been isolated. The most frequently isolated genera were *Mucor*, *Umbelopsis*, *Mortierella*, *Absidia*, *Rhizopus*. The most common species are *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *Umbelopsis isabellina*, *U. ramanniana*, *U. vinacea*, *Mortierella alpina*, *M. lignicola*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus stolonifer*. Total of 11 fungal species of 5 genera have been isolated from the soil of low dwarf-pine forests, 21 species of 8 genera — from the soil of spruce-fir forests, 29 species of 9 genera — from the soil of larch forests, 37 species of 13 genera — from the soil of mixed coniferous-broad-leaved forests. Such genera as *Blakeslea*, *Helicostylum*, *Syncephalastrum*, *Thamnidium*, *Thamnostylum* have been extracted only from the soil of Korean pine-broad-leaved forests in the south of Primorsky region.

Key words: *Zygomycetes*, soil fungi, coniferous forests.

УДК 582.288 : 57.06(471)

©Т. Ю. Гагкаява

**ФИТОПАТОГЕННЫЙ ГРИБ *FUSARIUM CEREALIS*
НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ**GAGKAEVA T. Yu. PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *FUSARIUM CEREALIS*
ON THE TERRITORY OF RUSSIA

Гриб *Fusarium cerealis* (Cooke) Sacc. (1886) [син. *F. crookwellense* L. W. Burgess, P. E. Nelson et Toussoun (1982)], патоген многих видов растений, до настоящего времени на территории России не был описан. По всей видимости, изоляты *F. cerealis* часто идентифицируют как *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. (1895) или как *F. graminearum* Schwabe (1839), поскольку по своей морфологии они сходны с указанными видами. Усложняет ситуацию отсутствие описания диагностических признаков гриба *F. cerealis* на русском языке. Однако его широкое распространение в различных странах мира и патогенность к различным видам растений должны привлечь внимание исследователей к этому виду.

Впервые *F. crookwellense* описан микологами в результате изучения штаммов *Fusarium*, выделенных из клубней картофеля в 1971 г. в Австралии в районе Круквел (Burgess et al., 1982). В таксономической системе Марасаса и соавторов (Marasas et al., 1984) *F. crookwellense* отнесен к секции *Discolor*. Описание этого вида отсутствует в книге «Атлас грибов рода *Fusarium*», опубликованной немецкими микологами Герлах и Ниренберг (Gerlach, Nirenberg, 1982). Позже Ниренберг (Nirenberg, 1990) описала *F. crookwellense* как вид, идентичный *F. cerealis*, и рекомендовала использовать первоначальное название гриба *F. cerealis*. Ранее, в таксономической системе Волленвебера и Рейнкина (Wollenweber, Reinking, 1935) название *cerealis* было предложено для разновидности гриба *F. culmorum*, по описанию соответствующее современной концепции вида *F. cerealis*. Многие микологи настаивают на приоритетном использовании первоначального названия гриба — *F. cerealis* (Seifert et al., 2008), поэтому при цитировании публикаций мы будем использовать современное наименование, даже если в оригинальной статье использовано название *F. crookwellense*.

F. cerealis выявлен как патоген различных видов растений. Так, например, он вызывает стеблевые гнили хлопчатника (Wang et al., 2004), гниль шишек хмеля (Pethybridge et al., 2001) и плодов авокадо (Hartill, 1991). Это опасный патоген зерновых культур, который вызывает корневую гниль и фузариоз колоса. В комплексе патогенов, вызывающих фузариоз зерна, *F. cerealis* встречается в Северной Америке, Канаде, во многих странах Европы, а также в Южной Африке, Австралии, Новой Зеландии и Китае (Kwaona, Chelkowski, 1988; Adler et al., 1995; De Nijs et al., 1996; Tan et al., 2004; Kriel, Pretorius, 2005; Llorens et al., 2006; Šrobárová et al., 2008). В Японии этот гриб впервые был идентифицирован в комплексе возбудителей фузариоза пшеницы в 1991 г. (Sugiura et al., 1993, 1994).

В Европе *F. cerealis* часто встречается в регионах с умеренным климатом и в комплексе возбудителей фузариоза зерновых культур уступает лишь видам *F. graminea-*

rum, *F. culmorum* и *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (1886) (Logrieco et al., 2003). Кроме того, этот патоген входит в группу доминирующих видов, вместе с *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. subglutinans* (Wollenw. et Reinking) P. E. Nelson, Toussoun et Marasas (1983), которые вызывают красную гниль кукурузы, составляют 90—95 % от всех выделенных изолятов рода *Fusarium* (Logrieco et al., 2003). В Новой Зеландии вид *F. cerealis* является вторым по встречаемости после *F. graminearum* патогеном початков и листьев кукурузы (Lauren, Di Minna, 1999).

Воздействие культуральным фильтратом *F. cerealis* на проростки пшеницы снижало их длину на 57 % (Wakuliński, 1989). Анализ колосьев пшеницы на сканирующем электронном микроскопе не выявил различий в инфекционном процессе, вызываемом *F. graminearum* и *F. cerealis*. Однако штаммы *F. graminearum* были более агрессивными при 22 и 24,6 °С, тогда как агрессивность *F. cerealis* проявлялась при 13,8 °С (Boshoff et al., 1999). Японские исследователи показали, что первые симптомы поражения колосьев пшеницы и ячменя после опрыскивания суспензией конидий *F. cerealis* в теплице при 25 °С появлялись только на 11—15-е сутки, в то время как симптомы поражения *F. graminearum* отмечены на 7-е сутки (Sigiura et al., 1994). В опытах австралийских и южноафриканских исследователей патогенность гриба *F. cerealis* к колосьям пшеницы также была несколько ниже, чем *F. graminearum* (Akisanmi et al., 2004; Kriel, Pretorius, 2005). Кроме того, штаммы *F. cerealis* вызывали симптомы корневой гнили при искусственном заражении пшеницы (Liddell, 1985; Akisanmi et al., 2004). Штаммы *F. cerealis*, выделенные из стеблей кукурузы, были менее агрессивными к проросткам кукурузы, чем *F. graminearum* и *F. culmorum* (Prończuk et al., 1991). Штаммы *F. cerealis* высокопатогенны к проросткам овса в лабораторных условиях (Kiesana, Kosylak, 1999). При инокуляции суспензией конидий гриба в полевых условиях 10 сортов и 4 линий овса урожай снижался в среднем на 32 %, количество зерна на 24 % (Mielniczuk et al., 2004).

Известно, что штаммы *F. graminearum*, *F. culmorum* и *F. cerealis* продуцируют трихотеценовые микотоксины группы В и подразделяются на два хемотипа по способности продуцировать дезоксиниваленол (ДОН) или ниваленол (НИВ) (Ichinoe et al., 1983). Штаммы *F. cerealis* продуцируют НИВ и не продуцируют ДОН (Golinski et al., 1988; Vesonder et al., 1991; Bottalico, Perrone, 2002; Logrieco et al., 2003; Llorens et al., 2006). В Японии *F. cerealis* совместно с *F. poae* рассматриваются как основные источники загрязнения зерна НИВ (Sugiura et al., 1993, 1994). Штаммы *F. cerealis* также могут продуцировать фузариевую кислоту (Vacon et al., 1996), зеараленон (Bottalico, Perrone, 2002), фузарин С (Thrane, 1988), диацетоксисцирпенол (Vesonder et al., 1991). Показана различная способность штаммов *F. cerealis* из Северной Америки, Европы и Австралии продуцировать токсины (Vesonder et al., 1991).

Отмечено значительное генетическое сходство видов *F. graminearum*, *F. culmorum* и *F. cerealis* при использовании RAPD-PCR (Schilling et al., 1996). Виды *F. cerealis*, *F. graminearum* и *F. culmorum* имеют сходный кластер генов, ответственных за биосинтез трихотеценовых микотоксинов (Logrieco et al., 1999; Chandler et al., 2003). Анализ полиморфизма изозимных профилей (Láday, Szécsi, 2001), нуклеотидных последовательностей ITS-регионов рибосомальной ДНК (Tan, Niessen, 2003), генов β-тубулина (Aoki, O'Donnell, 1999) и фактора элонгации 1a (Kristensen et al., 2007) показал близкое родство изучаемых видов, при этом штаммы *F. cerealis* всегда составляют собственную группу.

Телеоморфа гриба *F. cerealis* в природе не выявлена, однако по половой стадии гриб относится к роду *Gibberella*. Установлено, что *F. cerealis*-гетероталличный вид, поскольку штаммы гриба имеют разные типы спаривания MAT-1 или MAT-2 (Kerényi et al., 2004).

В результате наших исследований гриб *F. cerealis* был обнаружен на территории Северо-Кавказского, Центрального и Дальневосточного регионов. Штаммы гриба, идентифицированные как *F. cerealis*, были выделены нами в 2003 г. из зерна пшеницы на территории Северной Осетии. Среди культур *F. culmorum*, изолированных из зерна пшеницы и ячменя урожая 2002—2003 гг. в Приморском крае (Уссурийск, Ка-

мень-Рыболов) России и Хейлунцзянской провинции Китая, были обнаружены штаммы, отличающиеся от этого вида, которые впоследствии были переопределены нами как *F. cerealis*. В 2004 г. *F. cerealis* был идентифицирован на зерне пшеницы в Краснодарском крае и в 2004—2005 гг. в Северной Осетии с частотой встречаемости 1—4 %. Этот вид был также выделен из зерна пшеницы, выращенной в Орловской и Московской областях в 2004 г. Кроме того, среди изолятов грибов, выделенных из корней пшеницы, выращенной на полях Дальневосточного института защиты растений (ДВНИИЗР, Камень-Рыболов, Приморский край) в 2006 г., также был идентифицирован *F. cerealis*. Этот вид был выделен из листьев бодяка, имеющих признаки некротической пятнистости (Каталог культур грибов., 2007). Для подтверждения морфологической идентификации видов *F. graminearum* и *F. culmorum* использовали видоспецифичные молекулярные ДНК-праймеры Fg11f/r и 175f/430r соответственно (Yli-Mattila et al., 2004). Идентификация штаммов *F. cerealis* в коллекции грибов также была проведена методом генотипирования однонуклеотидных замен (Yli-Mattila et al., 2007).

Таким образом, по нашему мнению, *F. cerealis* имеет довольно широкое распространение на территории России. Целью настоящих исследований являлось характеристика штаммов *F. cerealis* по морфологическим признакам и патогенности к проросткам пшеницы сорта Московская 39 по сравнению со штаммами *F. graminearum* и *F. culmorum*.

Материал и методы

Использованы моноспоровые изоляты грибов рода *Fusarium*, хранящиеся в коллекции Лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (табл. 1). Для описания культуральных признаков штаммы выращивали на картофельно-сахарозном агаре (КСА) в течение 1 недели в темноте при температуре 23—25 °С. Проводили описание морфологических признаков культур, выращенных на гвоздично-листовом агаре (ГЛА) в течение 10—14 суток в темноте при температуре 23—25 °С (Fisher et al., 1982). Измерение длины и ширины конидий осуществляли с помощью микроскопа «Carl Zeiss» с использованием программы «AxioVision». У трех штаммов каждого вида измеряли не менее 25—50 конидий с определенным количеством перегородок. Для идентификации грибов рода *Fusarium* использовали определители (Gerlach, Nirenberg, 1982; Marasas et al., 1984).

Патогенность штаммов определяли по модифицированной методике Челковского и Манки (Chelkowski, Manka, 1983). Поверхностно стерилизованные 70%-м спиртом зерна пшеницы сорта Московская 39 замачивали на сутки в стерильной воде. Затем зерна с набухшим зародышем раскладывали на поверхности культуры гриба, выращенной в течение одной недели на КСА, по 10 штук на чашку Петри в трехкратной повторности. В контроле зерна раскладывали на поверхности агаризованной среды. Через одну неделю инкубации в темноте при температуре 23—25 °С учитывали длину появившихся ростков и их поражение с использованием четырехбалльной шкалы: 0 — здоровый проросток, 1 — точечные некрозы ткани, 2 — некроз около 50 % площади, 3 — полная гибель. Во всех вариантах измеряли длину каждого появившегося из зерна проростка и подсчитывали среднюю длину проростков. Снижение длины ростков под воздействием гриба оценивали в процентах к средней длине ростков в контроле. Повторность опытов двукратная.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ морфологии колоний *F. cerealis*, *F. culmorum* и *F. graminearum* на КСА выявил большое сходство *F. cerealis* и *F. culmorum*. Оба вида имеют хлопьевидный, рыхло- или плотнопушистый, войлочный воздушный мицелий, интен-

Происхождение и патогенность штаммов грибов *Fusarium cerealis*, *F. culmorum* и *F. graminearum*, использованных в исследовании

Вид	Номер штамма	Год выделения	Происхождение	Растение-хозяин	Патогенность	
					длина проростка, %	некроз, баллы
<i>F. cerealis</i>	37031	2003	Китай, Харбин Северная Осетия » ДВ, Хабаровский край ДВ, Приморский край	Пшеница, зерно Бодяк, лист Пшеница, зерно Пшеница, колос Ячмень, зерно	38.4	2.7
	41727	2004			19.3	3.0
	56050	2005			17.7	2.8
	64722	2006			25.7	3.0
	64902	2006			28.2	3.0
Среднее					25.9 ± 3.0	2.9 ± 0.04
<i>F. culmorum</i>	20021	2002	Архангельская обл. Белоруссия Ростовская обл. Московская обл. Башкирия Ленинградская обл.	Картофель, клубень Пшеница, колос Бодяк, лист Пшеница, зерно Пшеница, корень Конопля, стебель	26.2	2.9
	70505	2003			16.0	2.8
	20300	2004			20.2	3.0
	58802	2005			25.1	2.6
	61916	2005			5.8	3.0
	70552	2007			21.3	2.9
	Среднее					
<i>F. graminearum</i>	15001	2003	ДВ, Приморский край Калининградская обл. ДВ, Приморский край Тульская обл. Брянская обл. Ленинградская обл. Северная Осетия ДВ, Приморский край ДВ, Хабаровский край Орловская обл.	Пшеница, зерно То же » » » Ячмень, зерно Пшеница, зерно То же Пшеница, колос Пшеница, зерно	9.0	3.0
	54148	2003			5.8	3.0
	52002	2004			3.0	2.9
	48900	2004			3.8	3.0
	48706	2004			16.7	2.7
	49601	2004			17.3	3.0
	56050	2005			14.7	2.8
	65206	2006			19.0	2.7
	64720	2006			8.3	3.0
	70725	2006			15.0	2.9
Среднее					12.9 ± 1.7	2.9 ± 0.04

Размер макроконидий штаммов *Fusarium cerealis*, *F. culmorum* и *F. graminearum*, использованных в исследовании

Вид	Количество перегородок в макроконидии, штук	Средний размер, мкм	Варьирование размера, мкм	Соотношение длины и ширины конидий
<i>F. cerealis</i>	5	41.3 × 5.9	31.6—58.1 × 4.8—7.2	7.0
	4	38.2 × 5.9	25.4—48.1 × 4.9—7.0	6.3
	3	30.0 × 5.5	23.5—33.6 × 4.3—7.0	5.2
<i>F. culmorum</i>	5	36.7 × 6.5	30.2—44.9 × 5.1—7.5	5.5
	4	34.7 × 6.2	28.4—39.4 × 5.0—7.6	5.6
	3	28.7 × 6.0	21.5—34.8 × 4.2—7.6	5.6
<i>F. graminearum</i>	5	47.2 × 5.7	39.4—57.5 × 4.6—6.7	8.3
	4	44.2 × 5.4	37.4—50.0 × 4.7—6.5	8.2
	3	41.9 × 5.5	40.5—42.6 × 4.7—6.5	7.5

Примечание. Штаммы выращивали в течение 2 недель на ГЛА при температуре 23 °С.

сивной темно-красной, красно-бурой, желтоватой окраски. Окраска реверса штаммов *F. culmorum* и *F. cerealis* также сходна, от темно-красной до коричнево-бурой. Вместе с тем воздушный мицелий и реверс гриба *F. cerealis* был светлее по сравнению с *F. culmorum* и имел больше желто-охряных оттенков. У *F. graminearum* воздушный мицелий пушистый, хлопьевидный, бело-розовый, розовый, с возрастом появляются желтые оттенки. Реверс розовый, малиново-красный, винно-красный, значительно светлее, чем у *F. culmorum* и *F. cerealis*.

На богатых питательных средах (КСА и других) довольно сложно выявить различия морфологических характеристик грибов *F. graminearum*, *F. culmorum* и *F. cerealis* (Sigiura et al., 1994; Leslie, Summerell, 2006). Наиболее подходящими для этих целей являются питательные агаризованные среды с низким содержанием углеводов. Длина макроконидий с пятью перегородками из спородохий на ГЛА у *F. cerealis* в среднем составила 41.3, у *F. graminearum* — 47.2 и у *F. culmorum* — 36.7 мкм (табл. 2). Различия средней длины конидий достаточно существенные, однако значительное варьирование размеров на практике не позволяет четко разграничивать *F. cerealis* и морфологически близкие виды. Более информативным является форма макроконидий. Большинство макроконидий *F. culmorum* имеют по три-четыре перегородки, в то время как у *F. cerealis* и *F. graminearum* преобладают макроконидии с пятью перегородками, однако у *F. graminearum* макроконидии имеют более или менее одинаковый диаметр на протяжении всей длины (рис. 1). Макроконидии *F. cerealis* длиннее, чем у *F. culmorum*, с большей дорсовентральной, чем вентральной, изогнутостью, с максимальным диаметром в центре конидии. Макроконидии *F. culmorum* однотипной формы, относительно более широкие, чем конидии других анализируемых видов грибов. Апикальные клетки конидий *F. cerealis* постепенно суживающиеся в отличие от резко суживающихся и коротких клеток *F. culmorum*. Базальные клетки конидий *F. cerealis* имеют четко выраженную ножку, в то время как у *F. culmorum* они не всегда четко выражены и могут иметь форму сосочка. Макроконидии *F. graminearum* более узкие и в массе более светлые, чем конидии *F. cerealis* и *F. culmorum*. Все три вида образуют сходные конидиеносцы с монофалидными конидиогенными клетками (рис. 2, а, б). Однако спороношение у штаммов *F. cerealis* и *F. culmorum* при росте в одинаковых условиях, как правило, начинается раньше, чем у штаммов *F. graminearum*. Окрашенные, хорошо заметные хламидоспоры в гифах и макроконидиях также образуются обычно быстрее у первых двух видов, чем у *F. graminearum*.

Оценка патогенности штаммов различного происхождения показала, что штаммы *F. cerealis* способны вызывать заболевание растений, однако агрессивность *F. cerealis*

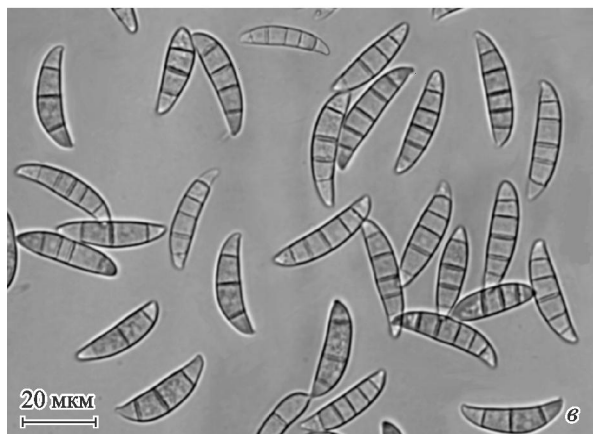
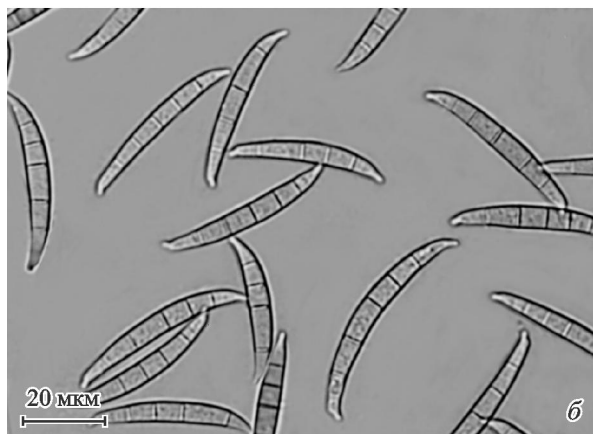
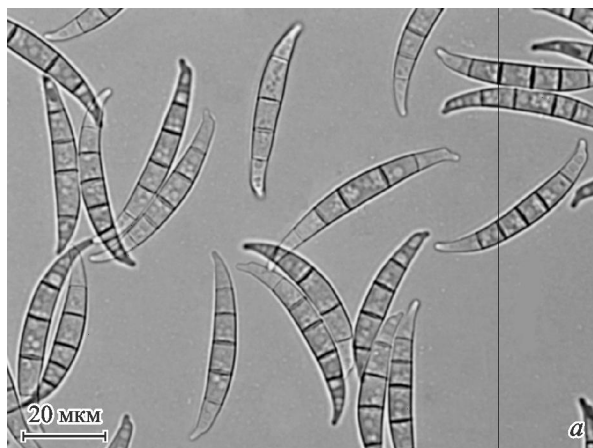


Рис. 1. Макроконидии *F. cerealis* (а), *F. graminearum* (б) и *F. culmorum* (в).

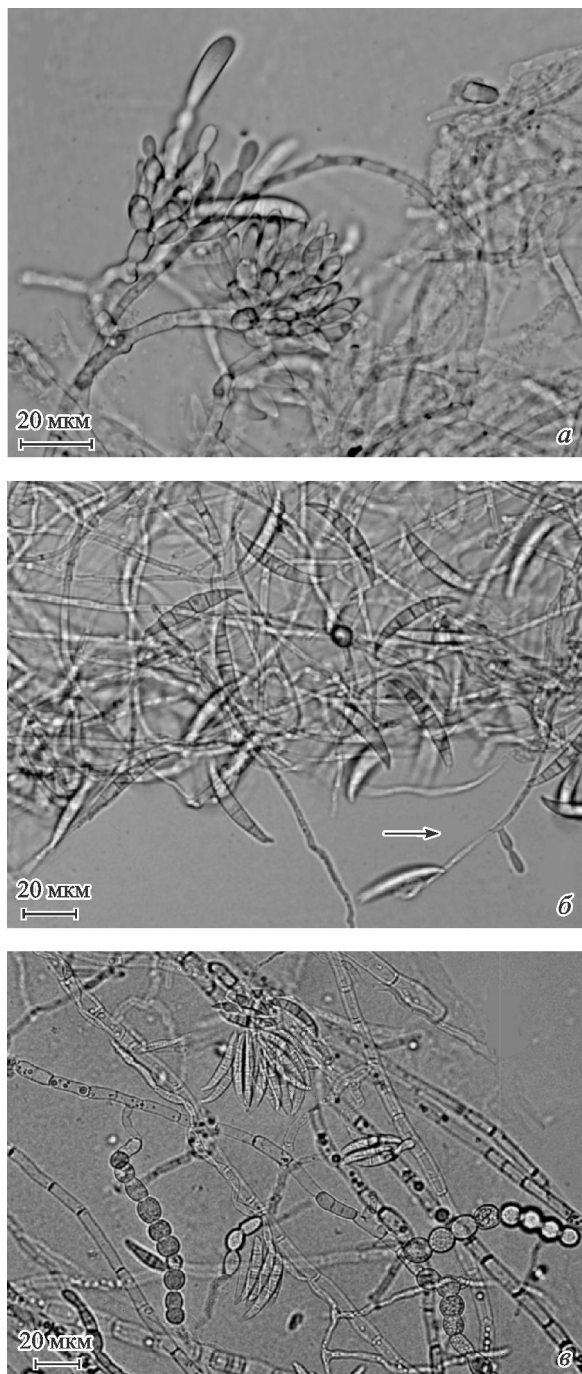


Рис. 2. Разветвленные (а) и неразветвленные (б) конидиеносцы, несущие монофалидные конидиогенные клетки, и хламидоспоры (в) *F. cerealis*.

к проросткам пшеницы была ниже, чем у *F. graminearum* и *F. culmorum* (табл. 1). Штаммы *F. graminearum* и *F. culmorum* вызывали более существенное снижение длины ростков, которая составляла 12.9 и 19.1 % от контроля по сравнению со штаммами *F. cerealis* (25.9 %).

Ранее было показано, что все штаммы *F. graminearum* из различных регионов России относятся к ДОН-хемотипу (Гагкаева, Ули-Маттила, 2007). Проведенное совместно с зарубежными коллегами генотипирование однонуклеотидных замен (SNP) аллельспецифическими праймерами более чем 250 штаммов российского происхождения, продуцирующих трихотеценовые микотоксины группы В, позволило охарактеризовать их хемотипический состав (Yli-Mattila et al., 2007, 2008). Результаты анализа показали, что на территории России гриб *F. graminearum* представлен ДОН-хемотипом с продуцированием 3- и 15-ацетатов ДОН, *F. culmorum* относится к ДОН-хемотипу с продуцированием 3-ацетата ДОН, а *F. cerealis* — к НИВ-хемотипу.

По данным сотрудников ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (Колоненко и др., 2004), в составе популяции *F. graminearum*, вызвавшей фузариоз пшеницы в Краснодарском крае в 1985—1986 г., на долю продуцентов ДОН-хемотипа приходилось 91.2 % изолятов гриба, на долю НИВ-хемотипа — 8.8 %. В настоящее время можно предположить, что изоляты НИВ-хемотипа могли относиться к виду *F. cerealis*, однако это предположение требует экспериментального подтверждения.

В дальнейшем следует провести уточнение ареала гриба *F. cerealis* на территории России и выявление круга растений-хозяев. Точная диагностика заболевания любого растения не может быть проведена без корректной идентификации возбудителя с учетом его биологических особенностей.

Приводим описание грибов *F. cerealis*, *F. culmorum* и *F. graminearum*, характеристику культур на КСА и микроморфологические параметры на ГЛА.

***F. cerealis* (Cooke) Sacc. (1886).** Колонии быстрорастущие; воздушный мицелий хлопьевидный, рыхло- или плотнопушистый, бархатистый, интенсивной темно-красной, красно-бурой, желтовато-охряной окраски. Реверс интенсивно окрашен, красно-коричневый, красно-бурый, с возрастом появляются охряные оттенки.

Конидиеносцы вначале образуются латерально на гифах воздушного мицелия, в дальнейшем обильно ветвятся. Конидиогенные клетки — монофалиды. Спородохии образуются быстро, формируя в центре культуры кирпично-красную или красно-коричневую массу конидий. Макроконидии веретеновидно-серповидные, эллиптически изогнутые, толстостенные, с более изогнутой дорсивентральной, чем вентральной, стороной, с наибольшим диаметром посередине, большей частью с пятью перегородками (3—6). Апикальная клетка постепенно сужающаяся, конусообразная, слегка искривленная, базальная клетка с отчетливо выраженной ножкой. Размер макроконидий с пятью перегородками в среднем 41.3×5.9 мкм ($31.6—58.1 \times 4.8—7.2$ мкм). Микроконидии отсутствуют. Хламидоспоры интеркалярные, формируются обычно в гифах, цепочках или кластерах довольно быстро, окрашенные (рис. 2, в). Также хламидоспоры могут образовываться в макроконидиях.

***F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. (1895).** Колонии быстрорастущие; воздушный мицелий хлопьевидный, рыхло- или плотнопушистый, бархатистый, интенсивной темно-красной, красно-бурой с желтовато-охряной окраской. Реверс интенсивно окрашен, красно-коричневый, красно-бурый, с возрастом появляются охряные оттенки.

Конидиеносцы вначале образуются латерально на гифах воздушного мицелия, в дальнейшем обильно ветвятся. Конидиогенные клетки — монофалиды. Спородохии образуются быстро, формируя в центре культуры кирпично-красную или красно-коричневую массу конидий. Макроконидии веретеновидно-серповидные, толстостенные, с более изогнутой дорсивентральной, чем вентральной, стороной, наибольшего диаметра посередине, в основном с 3—5 перегородками. Апикальная клетка резко суживающаяся, короткая, незаостренная. Базальная клетка имеет ножку или сосочек. Размер макроконидий с пятью перегородками в среднем 36.7×6.5 мкм ($30.2—44.9 \times 5.1—7.5$ мкм). Микроконидии отсутствуют. Хламидоспоры интерка-

лярные, формируются быстро в гифах, в макроконидиях, одиночные, в цепочках или кластерах, окрашенные.

***F. graminearum* Schwabe (1839).** Колонии быстрорастущие. Воздушный мицелий хорошо развит, пушистый, хлопьевидный, бело-розовый, розовый, с возрастом в центре появляются желтые оттенки. Реверс розовый, малиново-красный, винно-красный, часто с радиальными лучами.

Конидиеносцы вначале образуются латерально на гифах воздушного мицелия, в дальнейшем обильно ветвятся. Конидиогенные клетки — монофиалиды. Спородохии образуются с возрастом, кирпично-красные, оранжевые. Макроконидии веретеновидно-серповидные, эллиптически изогнутые, большей частью одинакового диаметра на протяжении всей длины, в основном с пятью перегородками (3—6). Апикальная клетка постепенно сужающаяся, конусообразная, слегка искривленная, базальная клетка с отчетливо выраженной ножкой. Размер макроконидий с пятью перегородками в среднем 47.2×5.7 мкм ($39.4—57.5 \times 4.6—6.7$). Микроконидии отсутствуют. Хламидоспоры интеркалярные, формируются в гифах, макроконидиях, одиночные, в цепочках или кластерах, окрашенные, часто отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гагкаева Т. Ю., Ули-Маттила Т. Молекулярная идентификация хемотипов *Fusarium graminearum* // Вест. защиты растений. 2007. С. 60—67.

Каталог культур грибов, изолированных из сорных растений / Под ред. М. М. Левитина. СПб.: ВИЗР, 2007. 74 с.

Кононенко Г. П., Буркин А. А., Соболева Н. А. Потенциал токсинообразования основных возбудителей фузариоза колоса // Успехи медицинской микологии. М.: Национальная академия микологии, 2004. Т. 3. С. 266—269.

Adler A., Lew H., Brodacz W., Edinger W., Oberforster M. Occurrence of moniliformin, deoxynivalenol, and zearalenone in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // *Mycotoxin Res.* 1995. Vol. 11. P. 9—15.

Akinsanmi O. A., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhouse D., Chakraborty S. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales // *Austral. J. Agr. Res.* 2004. Vol. 55. P. 97—107.

Aoki T., O'Donnell K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum* // *Mycology.* 1999. Vol. 91. P. 597—609.

Bacon C. W., Porter J. K., Norred W. P., Leslie J. E. Production of fusaric acid by *Fusarium* species // *Appl. Environm. Microbiol.* 1996. Vol. 62. P. 4039—4043.

Boshoff W. H. P., Pretorius Z. A., Swart W. J. A comparison of infection and blight development caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* in wheat // *S. Afr. J. Plant and Soil.* 1999. Vol. 16(2). P. 79—84.

Bottalico A., Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe // *Europ. J. Plant Pathol.* 2002. Vol. 108. P. 611—624.

Burgess L. W., Nelson P. E., Toussoun T. A. Characterization, geographic distribution and ecology of *Fusarium crookwellense* sp. nov. // *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 1982. Vol. 79(3). P. 497—505.

Chandler E. A., Simpson D. R., Thomsett M. A., Nicholson P. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis* // *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 2003. Vol. 62. P. 355—367.

Chelkowski J., Manka M. The ability of *Fusaria* pathogenic to wheat, barley and corn to produce zearalenone // *Phytopathol. Z.* 1983. Vol. 106. P. 354—359.

De Nijs M., Stentor P., Delfgou-Van Asch E., Kamphuis H., Rombouts F. M., Notermans S. H. W. Fungal infection and presence of DON and zearalenone in cereals grown in the Netherlands // *J. Food Protection*. 1996. Vol. 59. P. 772—777.

Fisher N. L., Burgess L. W., Nelson P. E., Toussoun T. A. Carnation leaves as a substrate for preserving cultures of *Fusarium* species // *Phytopathology*. 1982. Vol. 72. P. 151—153.

Gerlach W., Nirenberg H. I. The genus *Fusarium* — a pictorial atlas // *Mitt. Biol. Bundesanst Land-Forstw. Berlin; Dahlem*, 1982. Vol. 209. 406 p.

Golinski P., Vesonder R. F., Latus-Zietkiewicz D., Perkowski J. Formation of fusarenon X, nivalenol, zearalenone, α -trans-zearalenol, β -trans-zearalenol, and fusarin C by *Fusarium crookwellense* // *Appl. Environm. Microbiol.* 1988. Vol. 54. P. 2147—2148.

Hartill W. F. T. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand // *New Zealand J. Crop and Horticultural Sci.* 1991. Vol. 19. P. 297—304.

Ichinoe M., Kurata H., Sgiura Y., Ueno Y. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone // *Appl. Environm. Microbiol.* 1983. Vol. 46. P. 1364—1369.

Kerényi Z., Moretti A., Waalwijk C., Oláh B., Hornok L. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species // *Appl. Environm. Microbiol.* 2004. Vol. 70(8). P. 4419—4423.

Kiecana I., Kocylak E. Pathogenicity of *Fusarium* spp. on oats seedlings (*Avena sativa* L.) // *Plant Breed. and Seed Sci.* 1999. Vol. 43(1). P. 91—99.

Kriel W. M., Pretorius Z. A. *Fusarium* head blight: a summary of the South African situation // *Proc. of National Fusarium Head Blight (NFHB) Forum* 11—13 December 2005. USA. 2005. P. 243—245.

Kristensen R., Gauthier G., Berdal K. G., Hamels S., Remacle J., Holst-Jensen A. DNA microarray to detect and identify trichothecene- and moniliformin-producing *Fusarium* species // *J. Appl. Microbiol.* 2007. Vol. 102. P. 1060—1070.

Kwaona H., Chelkowski J. Occurrence of *Fusarium crookwellense* in Poland // *Acta Mycologica*. 1988. Vol. 24. P. 173—177.

Láday M., Szécsi Á. Distinct electrophoretic isozyme profiles of *Fusarium graminearum* and closely related species // *Systematic Appl. Microbiol.* 2001. Vol. 24(1). P. 67—75.

Lauren D. R., Di Minna M. E. *Fusaria* and *Fusarium* mycotoxins in leaves and ears of maize plants. 2. A time course study made in the Waikato region, New Zealand, in 1997 // *New Zealand J. Crop and Horticultural Sci.* 1999. Vol. 27. P. 215—223.

Leslie J. F., Summerell B. A. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

Liddell C. M. The comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* Group 1, *Fusarium culmorum* and *Fusarium crookwellense* as crown, foot and root rot pathogens of wheat // *Austral. Plant Pathol.* 1985. Vol. 14. P. 29—31.

Llorens A., Hinojo M. J., Mateo R., González-Jaén M. T., Valle-Algarra F. M., Logrieco A., Jiménez M. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA) // *Intern. J. Food Microbiol.* 2006. Vol. 106(3). P. 297—306.

Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops // *Europ. J. Plant Pathol.* 2003. Vol. 109. P. 645—667.

Marasas W. F. O., Nelson P. E., Toussoun T. A. *Toxigenic Fusarium species: Identity and Mycotoxicology*. 1984. 328 p.

Mielniczuk E., Kiecana I., Perkowski J. Susceptibility of oat genotypes to *Fusarium crookwellense* Burgess, Nelson and Toussoun infection and mycotoxin accumulation in kernels // *Biologia*. 2004. Vol. 59(6). P. 809—816.

Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O. *Fusarium species, an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983. 193 p.

Nirenberg H. I. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium* // *Studies in Mycology*. 1990. Vol. 32. P. 91—101.

- Pethybridge S. J., Hay F. S., Wilson C. R., Sheriff L. J., Leggett G. W. First report of *Fusarium crookwellense* causing tip blight on cones of hop // *Plant Dis.* 2001. Vol. 85. P. 1208.
- Pronczuk M., Pronczuk S., Messyas M. Pathogenicity of *Fusarium* spp. Contributing to the stalk rot of maize in Poland // *Mycotoxin Res.* 1991. Vol. 7. P. 97—101.
- Schilling A., Moller E. M., Geiger H. H. Polymerase chain reaction based assays for species-specific detection of *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum* // *Phytopathology.* 1996. Vol. 86. P. 515—522.
- Seifert K. A., Gräfenhan T., Redhead S. A. Typification of *Fusarium cerealis* and *Fusarium crookwellense* // *J. Plant Pathol.* 2008. Vol. 90. P. 22.
- Šrobárová A., Šliková S., Šudyová V. Diversity of the *Fusarium* species associated with head and seedling blight on wheat in Slovakia // *Biologia.* 2008. Vol. 63 (3). P. 332—337.
- Sugiura Y., Fukasaku K., Tanaka T., Matsui Y., Ueno Y. *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido // *Appl. Environm. Microbiol.* 1993. Vol. 59(10). P. 3334—3338.
- Sugiura Y., Saito H., Tanaka T., Tanaka T., Ichinoe M., Ueno Y. *Fusarium crookwellense*, a newly isolated fungus from wheat in Japan: Its mycotoxin production and pathogenicity to wheat and barley // *Mycoscience.* 1994. Vol. 35(1). P. 77—82.
- Tan M. K., Simpfendorfer S., Backhouse D., Murray G. M. Occurrence of *Fusarium* head blight (FHB) in southern NSW in 2000: identification of causal fungi and determination of putative chemotype of *Fusarium graminearum* isolates by PCR // *Austral. Plant Pathol.* 2004. Vol. 33(3). P. 385—392.
- Tan M.-K., Niessen L. M. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals // *Mycol. Res.* 2003. Vol. 107. P. 811—821.
- Thrane U. Screening for fusarin C production by European isolates of *Fusarium* species // *Mycotoxin Res.* 1988. Vol. 4. P. 2—10.
- Vesonder R. F., Goliński P., Plattner R., Zietkiewicz D. L. Mycotoxin formation by different geographic isolates of *Fusarium crookwellense* // *Mycopathology.* 1991. Vol. 113(1). P. 11—14.
- Wakuliński W. Phytotoxicity of *Fusarium* metabolites in relation to pathogenicity // *Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* / Ed. J. Chelkowski. 1989. P. 257—269.
- Wang B., Brubaker C. L., Burdon J. J. *Fusarium* species and *Fusarium* wilt pathogens associated with native *Gossypium* populations in Australia // *Mycol. Res.* 2004. Vol. 108. P. 35—44.
- Wollenweber H. W., Reinking O. A. *Die Fusarium, ihre Beschreiburg, Schadwirkung und Bekämpfung.* Berlin: Paul Parey, 1935. 355 p.
- Yli-Mattila T., O'Donnell K., Ward T., Gagkaeva T. Trichothecene chemotype composition of *Fusarium graminearum* and related species in Finland and Russia // *J. Plant Pathol.* 2008. Vol. 90. P. 60.

ВНИИ защиты растений
Санкт-Петербург
gagkaeva02@yahoo.com

Поступила 27 X 2008

РЕЗЮМЕ

В статье дано описание гриба *F. cerealis*, ранее не идентифицированного на территории России. Гриб *F. cerealis* был выделен ранее из зерна и корней пшеницы и ячменя, а также листьев бодяка, собранных на территории Дальневосточного, Северо-Кавказского и Центрального регионов. Штаммы *F. cerealis* могут быть ошибочно идентифицированы как *F. culmorum* или *F. graminearum*, поскольку морфологические характеристики этих грибов имеют значительное сходство.

Целью исследований являлась характеристика штамма *F. cerealis* в сравнении со штаммами *F. graminearum* и *F. culmorum* по морфологическим данным и патогенности к проросткам

пшеницы сорта Московская 39. Показаны различия формы и средней длины макроконидий *F. cerealis*, *F. graminearum* и *F. culmorum* при культивировании на гвоздично-листовом агаре. Штаммы всех исследованных грибов патогенны к проросткам пшеницы, однако агрессивность *F. cerealis* была ниже по сравнению с *F. graminearum* и *F. culmorum*. В дальнейшем следует провести уточнение ареала гриба *F. cerealis* на территории России и круга растений-хозяев.

Ключевые слова: грибы, патоген, *F. cerealis*, морфология, распространение.

SUMMARY

The first report of *F. cerealis* on the territory of Russia is given. *F. cerealis* was isolated from grain of small cereals and tissue of *Cirsium* sp. collected in the Far East, the Central and North Caucasian areas. The morphological characters of *F. cerealis* are similar to *F. graminearum* and *F. culmorum*, therefore, it is possible that this fungus may be misidentified as *F. graminearum* and *F. culmorum*.

The objective of this study was to characterize *F. cerealis* isolates based on morphological characteristics and pathogenicity toward wheat seedlings (cv. Moscovskaya 39). For this purpose we examined *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* strains isolated from different plant-hosts grown in various geographical origins.

On CLA medium *F. cerealis* can be distinguished from *F. graminearum* and *F. culmorum* by shape and size of macroconidia. All strains have produced the symptoms of infection on wheat seedlings but *F. cerealis* was significantly less pathogenic than *F. graminearum* and *F. culmorum*. A large-scale monitoring of this fungus in Russia is in progress.

Key words: fungi, pathogen, *F. cerealis*, morphology, distribution.

УДК 631.466.1

© М. А. Каниськин, Т. А. Семенова, В. А. Терехова

ИЗМЕНЕНИЯ МИКОБИОТЫ ПОЧВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФОСФОГИПСА

KANIS'KIN M. A., SEMENOVA T. A., TEREKHOVA V. A. CHANGES OF SOIL MYCOBIOTA UNDER THE EFFECT OF PHOSPHOGYPSUM

В качестве химических мелиорантов почв, в частности солонцов, предлагается использовать отход производства фосфорных удобрений — фосфогипс (Рекомендации..., 2006). Однако его широкое применение сдерживается тем, что, наряду с основным действующим веществом — гипсом, он содержит большое количество примесей — соединений стабильного стронция, фтора, кадмия и других элементов, действие которых в условиях достаточного питания на биологические характеристики почв не исследовано (Любимова, Борисочкина, 2007). Стандартная система показателей для оценки влияния фосфогипса и других мелиоративных средств на качество почв не разработана. В ходе экологического контроля целесообразно отслеживать не только изменения химического состава растений, но и трансформацию комплексов почвенных микроорганизмов.

Ключевая биоценотическая роль грибов в функционировании природных экосистем и их реакция на воздействие природных и техногенных факторов характеризуют их как биоиндикатор экологического состояния среды обитания, и в первую очередь почвенной (Бабьева, Зенова, 1983; Мирчинк, 1988; Марфенина, 1994; Терехова, 2007; Environmental..., 2007, и др.). Какое воздействие фосфогипс может оказывать на микобиоту почв? Какие показатели микромицетов наиболее чувствительны к данному виду химического воздействия? Ответы на эти вопросы мы попытались найти в ходе выполнения данного экспериментального исследования.

Цель работы заключалась в оценке влияния фосфогипса на почвенную микобиоту.

Микологический анализ был проведен в районе размещения отвалов фосфогипса — крупнотоннажных отходов химического предприятия. Фоновые почвы — дерново-подзолистые. Фосфогипс, полученный в производственных условиях разложением хибинского апатита Кировского месторождения серной кислотой, включал следующие элементы (%): CaO — 29.36, SO₂ — 43.55, P₂O₅общ. — 0.36, P₂O₅водораств. — 0.01, SrOобщ. — 2.34, SrOводораств. — 0.064, Al₂O₃ — 0.12, Fe₂O₃ — 0.16, Na₂Oводораств. — 0.007, Na₂Oобщ. — 0.02, K₂Oобщ. — 0.02, K₂Oводораств. — 0.003, SiO₂ — 0.37, Fобщ. — 0.11, Fводораств. — 0.005 (Фосфогипс..., 1990).

Эмпирические данные о состоянии микобиоты были получены с пробных площадок по градиенту удаленности от отвалов фосфогипса. Исследуемые участки почв расположены: а) в условно чистой зоне — фоновая; б) на удалении примерно 500 м от обводного канала, опоясывающего сравнительно новый отвал отходов, — буферная (наиболее вероятный путь поступления фосфогипса на эту территорию — распыление отхода с отвала); в) непосредственно вблизи отвала фосфогипса — загрязненная отходами импактная зона (массовая доля фосфогипса в почвах этой зоны — 30 %). На

площадках этих зон был заложен многомесячный натурный эксперимент с целью сравнения динамики микобиотических параметров и скорости минерализации растительного опада — листьев липы. Осенью в каждой зоне на площади квадрата 2×2 м было заложено по 24 пластиковых сетчатых мешочка с опадом, которые вынимали через 1, 6 и 11 месяцев экспозиции. Анализ микобиоты проводили одновременно в пробах почв и на экспонирующемся в почве модельном растительном опаде.

При оценке биоразнообразия и структурно-функциональных особенностей микобиоты учитывали общую численность колониеобразующих единиц (КОЕ), число и обилие видов, долю устойчивых к неблагоприятным факторам темнопигментированных видов грибов, долю быстрорастущих видов, потребляющих легкодоступный органический субстрат, общую биомассу микромицетов, морфобиологическую структуру грибной биомассы (соотношение спор и мицелия).

Для подавления роста бактерий и дрожжей посев почвенной суспензии из серийного разведения или смыва с листового опада проводили на подкисленный агар Чапека (Методы..., 1982). Подсчет числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и измерение радиальной скорости роста грибных колоний (Kr , мм/ч) осуществляли на 5-е и 7-е сутки роста. Определение видов микромицетов проводили с использованием наиболее распространенных определителей, при этом по возможности были учтены таксономические изменения, отраженные в имеющихся руководствах (Raper, Thom, 1984; Domsch, Gams, 1993; Ainsworth and Bisby..., 2001, и др.). В некоторых случаях были использованы электронные интерактивные «ключи» и информационные сайты интернет-ресурсов (<http://www.indexfungorum.org>; <http://biodiversity.bio.uno.edu/~fungi/>; www.cbs.knaw.nl и др.).

Прямой учет биомассы грибов, численности спор и фрагментов мицелия проводили методом люминесцентной микроскопии при окрашивании препаратов суспензии почв и субстратов на предметных стеклах флуорохромом Fluorescent Brightener 28 (фирмы SIGMA, аналог Calcofluor White ST). Использовали следующие методические параметры: разведение — 1 : 100, аликвота — 0.02 мл, площадь квадрата — 4 см^2 , площадь поля зрения — $5.024 \times 10^{-3} \text{ см}^2$. Биомассу рассчитывали, допуская, что 1 м мицелия весит $3.9 \times 10^{-6} \text{ г}$ и содержит 80 % воды, а масса одной споры — 10^{-11} г (Методы..., 1991) при цене деления окуляра микроскопа 4 мкм.

До закладки субстратов было проведено изучение исходной эпифитной микобиоты листьев. Повторность при отборе проб почв — 5-кратная, при микологических исследованиях каждой пробы — 3-кратная.

Результаты анализа грибных сообществ в почвах разных зон показали значительную вариабельность как интегральных, так и частных показателей видового разнообразия, при этом различия между зонами были сопоставимы с сезонной изменчивостью. Рассчитанная средняя численность колониеобразующих единиц (КОЕ/г почвы) свидетельствует об умеренной заселенности исследуемых почв грибами.

В начале наблюдений численность КОЕ микромицетов в пробах почв на площадках фоновой и импактной зон была существенно (на 1—2 порядка) ниже, чем в пробах буферной зоны (табл. 1).

Высокая численность КОЕ в буферной зоне была обеспечена обилием колоний *Penicillium janczewskii* K. M. Zalesky (их доля составляла 44 % от всех выросших грибов на чашках Петри). В посевах почв импактной зоны доминировали колонии *P. aurantiogriseum* Dierckx (35 %). В почвах фоновой зоны численность всех микромицетов была невысокой, явные доминанты не выявлены.

В последующие периоды наблюдений (через 6 и 11 месяцев) максимальная численность КОЕ в буферной зоне сохранилась также благодаря доминированию *P. janczewskii*. Хотя этот вид встречался во всех пробах с пространственной частотой встречаемости 100 %, в фоновой и импактной почвах его колоний было меньше.

Очевидно, следствием выраженного доминирования отдельных видов в буферной зоне видовое разнообразие микромицетов оказалось наименьшим (29 видов) по сравнению с другими. В почвах буферной зоны обильно развивались *P. janczewskii* и *Trichoderma harzianum* Rifai, затрудняющие развитие других микромицетов. Видовое раз-

Общая численность микромицетов в почвах разных зон, тыс. КОЕ/г

Срок экспозиции, месяцы	Показатель	Зона		
		фоновая	буферная	импактная
1	Среднее	9.28	118	37.31
	Коэффициент вариации	0.92	0.71	1.67
6	Среднее	36.7	170.7	40.7
	Коэффициент вариации	0.60	0.44	0.65
11	Среднее	51.3	478.6	30.6
	Коэффициент вариации	0.46	0.22	0.61

нообразии в фоновой и импактной почвах было примерно одинаковым — 38 и 37 видов соответственно. При этом по набору видов грибные комплексы этих почв значительно отличались (коэффициенты сходства Сёрнсена—Чекановского были в разные сроки в пределах 0.16—0.38). Возможно, это объясняется влиянием фосфогипса на почвенную микробиоту в импактной зоне.

Индексы разнообразия микромицетов (по Шеннону) и выровненности видов (по Пиелу) в почве фоновой и импактной зон отличались незначительно (табл. 2).

Одновременно с описанием структурно-функциональной организации грибных сообществ в почвах разных зон исследовали микробиоту на модельном растительном субстрате, заложенном в эти почвы. Следует отметить, что численность КОЕ микромицетов при посеве смывов с модельных субстратов в процессе экспозиции возрастала, но очень неравномерно на разных площадках. Не обнаружено выраженных закономерностей динамики общей численности КОЕ в связи с загрязнением проб фосфогипсом. Оценка вариабельности значений численности микромицетов, ассоциированных с исследуемым субстратом, показала максимальное значение данного показателя в буферной зоне (табл. 3). Здесь также отмечались наибольшие значения дисперсии и стандартного отклонения. Очевидно, что такой интегральный показатель, как общая численность КОЕ грибов, мало информативен при данном уровне техногенной нагрузки.

По ходу экспозиции отмечены значительные перестройки в комплексах микромицетов на исследуемых субстратах. Во всех вариантах наблюдалось их заселение аборигенными почвенными микромицетами и элиминация ряда эпифитных грибов (например, *Aureobasidium pullulans* (de Vary) G. Arnaud), отмеченных на исходном субстрате до закладки в почву. В целом видовое разнообразие во всех случаях возросло в 2—3 раза (с 5 видов на исходном субстрате до 9—18 в разных вариантах). Видовое разнообразие микромицетов, ассоциированных с погруженным в почву растительным субстратом, было несколько ниже, чем в окружающих почвах (индекс Шеннона колебался от 0.98 до 2.16). Общее количество видов, отмеченных в почве, — 65, на листьях — 44. При этом сходство микробиоты на пробах опада разных зон было несколько выше, чем в окружающих почвах (коэффициент Сёрнсена—Чекановского составлял 0.33—0.64).

Таблица 2

Показатели видового разнообразия микробиоты в почвах разных зон

Срок экспозиции, месяцы	Индекс Шеннона			Индекс Пиелу		
	фоновая	буферная	импактная	фоновая	буферная	импактная
1	3.30	2.70	3.39	0.95	0.68	0.81
6	3.27	1.99	3.69	0.78	0.58	0.9
11	3.44	1.08	3.91	0.81	0.28	0.94

Общая численность микромицетов, ассоциированных с листовым опадом, тыс. КОЕ/г

Срок экспозиции, месяцы	Показатель	Зона		
		фоновая	буферная	импактная
1	Среднее	95.6	167.8	248.7
	Коэффициент вариации	0.33	0.45	0.03
6	Среднее	539.9	1045.5	366.6
	Коэффициент вариации	0.77	0.93	0.18
11	Среднее	515.6	773.3	807.8
	Коэффициент вариации	0.72	1.02	0.41

Характеризуя динамику видового состава по ходу экспозиции растительного опада, следует отметить, что общее количество видов, отмеченных на субстратах за весь срок наблюдения, несколько уменьшалось в ряду фоновые—буферные—импактные почвы (на 27, 26 и 21 вид соответственно). Во всех пробах отмечено снижение доли быстрорастущих грибов по ходу экспозиции растительного опада в почвах. Наименьшее снижение (с 6 до 2.85 %) отмечено в фоновой зоне; в буферной и импактной зонах доля быстрорастущих грибов составила 0.2 и 0.8 % соответственно. Для темнопигментированных микромицетов, ассоциированных с субстратами, значимых изменений в зависимости от уровня загрязнений и срока экспозиции не выявлено: содержание этих видов грибов было невелико и сильно варьировало.

Прямой метод исследования содержания грибов в анализируемых пробах, по сравнению с методом посева, позволил получить более определенную и интересную для оценки степени воздействия фосфогипса информацию. Результаты анализа грибной биомассы в почвах исследуемых зон методом люминесцентной микроскопии приведены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Количество и биомасса грибных спор в почвах разных зон (метод люминесцентной микроскопии)

Зона	Площадка	Количество спор в поле зрения		Количество спор в 1 г почвы, 10^6 ед.	Биомасса спор, мг/г почвы
		среднее для площадки	среднее для зоны		
Импактная	И-1	1.97	} 2.07 ± 0.23	0.823	8.230
	И-2	1.80			
	И-3	2.12			
	И-4	2.16			
	И-5	2.29			
Буферная	Б-1	2.55	} 2.74 ± 0.52	1.090	10.900
	Б-2	2.48			
	Б-3	2.52			
	Б-4	2.79			
	Б-5	3.35			
Фоновая	Ф-1	3.47	} 3.65 ± 1.37	1.454	14.540
	Ф-2	3.03			
	Ф-3	2.91			
	Ф-4	5.59			
	Ф-5	3.26			

**Морфобиологическая характеристика грибной биомассы в почвах разных зон
(метод люминесцентной микроскопии)**

Зона	Площадки	Длина мицелия в поле зрения, мкм		Длина мицелия, 10^6 мкм/г почвы	Биомасса мицелия (сухой вес), мг/г почвы	Обогащенность (по: Методы..., 1987)	Отношение биомассы мицелия к биомассе спор
		среднее для площадки	среднее для зоны				
Импактная	И-1	13.8	} 14.89 ± 6.35	59.27	46.23	Бедная	5.62
	И-2	9.12					
	И-3	22.72					
	И-4	12.32					
	И-5	16.4					
Буферная	Б-1	18.96	} 22.38 ± 6.93	89.11	69.5	»	6.38
	Б-2	26.8					
	Б-3	14.24					
	Б-4	26.56					
	Б-5	25.36					
Фоновая	Ф-1	39.76	} 44.00 ± 10.52	17.52	136.62	Средняя	9.40
	Ф-2	46.56					
	Ф-3	57.44					
	Ф-4	40.64					
	Ф-5	35.6					

Расчеты показывают, что исследованные образцы не слишком обогащены грибами (табл. 5). Согласно оценочной шкале Д. Г. Звягинцева (Методы..., 1987), лишь почва фоновой зоны характеризуется средней степенью обогащенности, в то время как в буферной и импактной зонах почвы бедны микроорганизмами.

Особый интерес представляют данные о соотношении споровой и мицелиальной биомассы. Достоверно показано, что в неблагоприятных условиях (импактная зона) доля споровой биомассы значительно выше (см. рисунок). Поэтому повышался и индекс отношения мицелиальной биомассы грибов к споровой.

В условиях обогащенности среды биогенными элементами отходы фосфогипса, поступающие на полигон, в первое время характеризуются токсичностью, соответствующей 4-му классу опасности. Однако довольно скоро (примерно в течение месяца) токсичность фосфогипса в отвалах, измеренная в стандартных биотест-системах, нейтрализуется (Каниськин и др., 2007). Несмотря на это, влияние фосфогипса сказывается на развитии грибов в форме подавления вегетативного мицелия и увеличения спорообразования микромицетов. Подобное явление отмечалось нами ранее в модельном опыте в условиях лабораторного эксперимента (Terexkova et al., 2004). Натурные исследования подтвердили, что этот показатель свидетельствует об изменении усло-



Динамика соотношения биомассы мицелия (БМ) и спор (БС) грибов на площадках трех зон по мере удаления от отвалов фосфогипса.

вий обитания грибов и может быть рекомендован как информативный параметр для оценки воздействия фосфогипса на почвы.

Таким образом, результаты проведенных исследований почвенной микробиоты на участках, расположенных по градиенту удаления от отвалов фосфогипса, показали, что под влиянием этого вида химических отходов происходят изменения в грибных сообществах. Судя по полученным данным, большое количество биогенных элементов, присутствующих в фосфогипсе, не нейтрализует его токсических свойств и неблагоприятное воздействие на микромицеты.

Сравнивая эффективность разных методов, можно констатировать, что биоиндикационная ценность результатов прямого метода (люминесцентная микроскопия) в данном случае выше по сравнению с результатами, полученными методом посева. Влияние фосфогипса на общую численность и структуру микромицетных комплексов, представленных главным образом пенициллами, проявляется нечетко: в основном оно выражается в стимулировании развития одних видов рода *Penicillium*, в подавлении других и в отсутствии выраженного влияния на третьи. Напротив, различия в морфобиологической структуре микробиоты на разном удалении от отвалов фосфогипса выражены вполне определенно. По мере приближения к отвалам фосфогипса доля споровой биомассы под влиянием фосфогипса значительно увеличивалась. В связи с этим следует заключить, что из набора микробиотических показателей, проанализированных в данной работе, наиболее информативным индикационным показателем, отражающим влияние фосфогипса на грибные сообщества микромицетов, является соотношение споровой и мицелиальной биомассы.

Мы полагаем, что выявленные в условиях влияния фосфогипса изменения микробиоты целесообразно принимать во внимание при создании системы экологического контроля за мелиорируемыми с помощью этого химиката почвами.

Авторы выражают признательность д. б. н. А. С. Яковлеву и к. б. н. А. С. Горленко за помощь в организации исследования.

Исследования выполнены при поддержке программы президиума РАН «Биоразнообразии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. М.: МГУ, 1983. 248 с.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ, 1987. 256 с.
- Каниськин М. А., Терехова В. А., Яковлев А. С. Контроль гуматной детоксикации отходов фосфогипса методами биотестирования // Экология и промышленность России. 2007. № 8. С. 48—51.
- Любимова И. Н., Борисочкина Т. И. Влияние потенциально опасных химических элементов, содержащихся в фосфогипсе, на окружающую среду. М.: Почвенный ин-т им. В. В. Докучаева, 2007. 48 с.
- Марфенина О. Е. Микологический почвенный мониторинг: возможности и перспективы // Почвоведение. 1994. № 1. С. 75—80.
- Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под ред. И. А. Дудка и др. Киев: Наук. думка, 1982. 550 с.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 304 с.
- Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: МГУ, 1988. 220 с.
- Рекомендации по использованию фосфогипса для мелиорации солонцов. М.: Почвенный ин-т им. В. В. Докучаева, 2006. 46 с.
- Терехова В. А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 215 с.
- Фосфогипс и его использование / Под ред. С. Д. Эвенчика, А. А. Новикова. М.: Химия, 1990. 222 с.

Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi / Eds P. M. Kirk et al. 9th ed. CABI Bios., 2001. 655 p.

Domsch K. H., Gams W. Compendium of soil fungi. Vol. 1. IHW-Verlag, 1993. P. 859—860.

Environmental and Microbial Relationships. IV. The Mycota. 2nd ed. / Eds C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina. Springer, 2007. 374 p.

Raper K. B., Thom C. A. Manual of the Penicillia. New Delhi: Today and Tomorrow's Printers and Publishers, 1984. 875 p.

Terekhova V., Yatsynenko T., Dolbneyva E. Ecotoxicological and mycobiotic investigations on the phosphogypsum forming soils / Int. Congress: Eurosoil-2004. September 4—9. München, 2004.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
ka-nis-kin@rambler.ru

Поступила 5 XII 2008

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние фосфогипса на структурные (таксономические), функциональные (доля темноокрашенных и быстрорастущих микромицетов) и интегральные (общая биомасса, число видов) характеристики почвенных микромицетов. Показано значительное возрастание коэффициента отношения биомассы спор к биомассе мицелия под влиянием фосфогипса. Прямой метод исследования (люминесцентная микроскопия) позволил получить более информативные микобиотические параметры в сравнении с чашечным методом.

Ключевые слова: фосфогипс, сообщества почвенных микромицетов, люминесцентная микроскопия, микобиотические параметры.

SUMMARY

Influence of phosphogypsum on structural (taxonomical), functional (shares of dark-colored and fast growing micromycetes) and integral (total biomass, number of species) features of soil micromycetes was investigated. The remarkable increase of the ratio of spore biomass to mycelium biomass under the influence of phosphogypsum was demonstrated. Direct method of investigation (luminescence microscopy) allowed to receive more informative mycobiotic parameters in comparison with Petri dishes method.

Key words: phosphogypsum, soil micromycetes communities, luminescence microscopy, mycobiotic parameters.

УДК 582.281.23(540)

© Sh. W. Khade

RECORD OF *GLOMUS LIQUIDAMBARIS* FROM INDIAХ А Д Е Ш. В. НАХОДКА *GLOMUS LIQUIDAMBARIS* В ИНДИИ

Glomus liquidambaris (Wu et Chen) Almeida et Schenck was earlier placed under the genus *Sclerocystis* where spores are arranged in a hemispherical layer forming a head and a short stalk with absence of spores at the sporocarp base. Presently the genus *Sclerocystis* is maintained with one species *S. coremioides* while rest all other species are transferred to *Glomus*. Almeida and Schenck (1990) considered *S. coremioides* unique and therefore separate from the *Glomus* clade based on following four morphological traits: 1) spore formation on separate subtending hyphae rather than from branching sporophores; 2) a well defined septum at the same position near the spore base; 3) arrangement of spores in hemispherical layer; 4) new sporocarps formed from older sporocarps to often fuse into columns.

Wu (1993) resisted this change on the basis of comparative studies of spore ontogeny and sporocarps morphology and grouped them as six species. Wu (1993) hypothesized a model of a smooth evolutionary transition between relatively unorganized, *Glomus*-like sporocarps of *S. ribiformis* and intermediate forms like *S. clavispора*, *S. liquidambaris* and *S. sinuoda* to *S. coremioides*. He concluded that *S. coremioides* was not unique. This series of transformations led Wu (1993) to reject the changes of Almeida and Schenck (1990) and revert to Gerdemann and Trappe's (1974) classification scheme. With advancement in molecular taxonomy, all the sporocarpic species of *Sclerocystis* were transferred to *Glomus* (Redecker et al., 2000).

The species *G. liquidambaris* is synonymous with *G. cunninghamia* (Hu) Almeida et Schenck based on the following characteristics: 1) sporocarp size, 2) spore shape, 3) presence of central plexus and 4) presence of paraphysis. Both these species were reported from Taiwan and named after the host viz., *Liquidambar formosana* and *Cunninghamia lanceolata* respectively since they were isolated from the rhizosphere of these plants. *Glomus liquidambaris* is also reported from Korea. The present paper reports the occurrence of *G. liquidambaris* from India.

Material and methods

Spores of arbuscular mycorrhizal fungi associated with plants from Mollem, Western Ghat region of Goa, India were isolated directly from rhizosphere soil samples by wet sieving and decanting method (Gerdemann, Nicolson, 1963).

Diagnostic slides containing intact and crushed sporocarps and spores of arbuscular mycorrhizal fungi were prepared in polyvinyl alcohol lactoglycerol (Koske, Tessier, 1983). Spore morphology and wall characteristics were considered for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi and these characteristics were ascertained using compound mic-

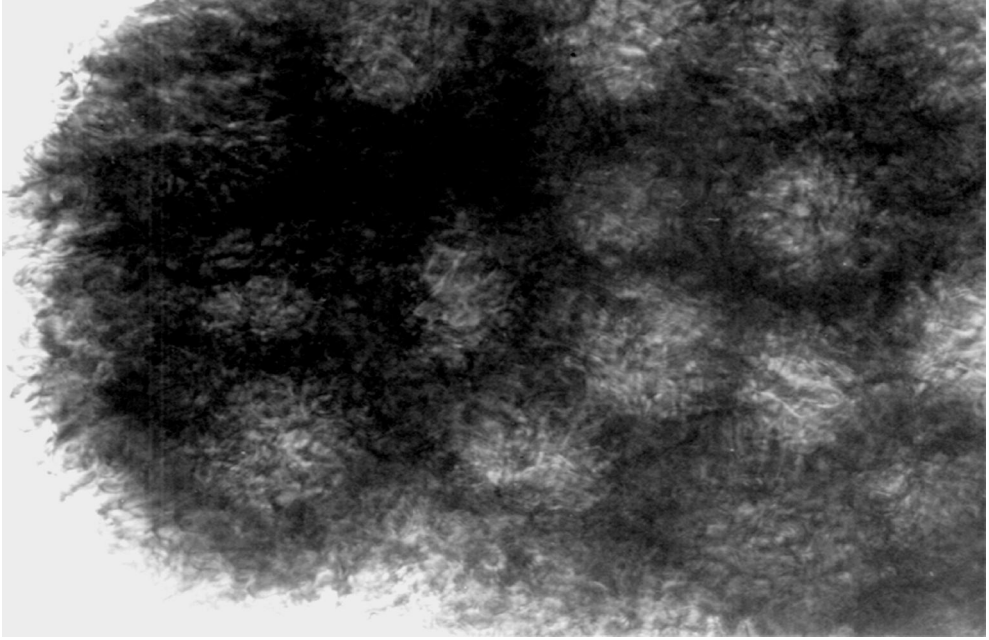


Fig. 1. A portion of sporocarp of *Glomus liquidambaris* with radially formed spores enclosed within the protruding paraphysal hyphae (400 \times).

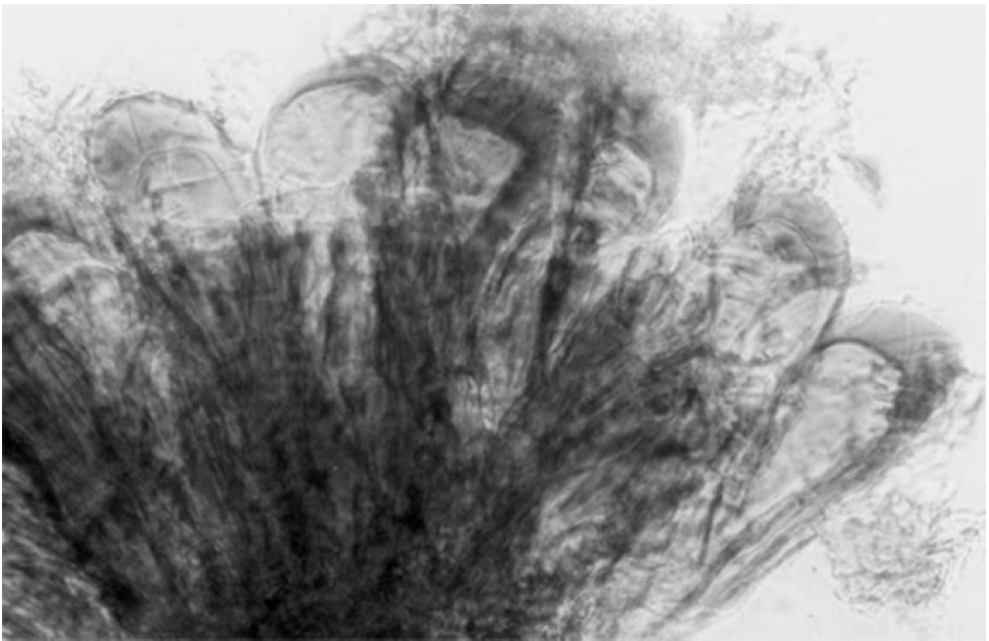


Fig. 2. Radiating spores of *Glomus liquidambaris* with thickened apex interspersed with paraphysis forming a sheath over them (400 \times).

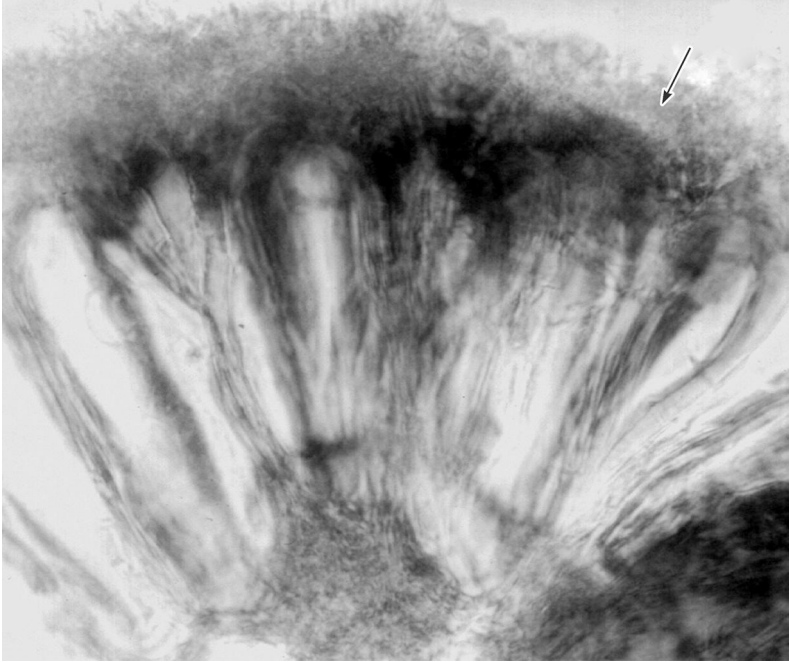


Fig. 3. A portion of *Glomus liquidambaris* sporocarp showing spores above which paraphysal hypha fuses forming tufts (pseudoperidium) (400 \times).
 Note: the arrow showing pseudoperidium.

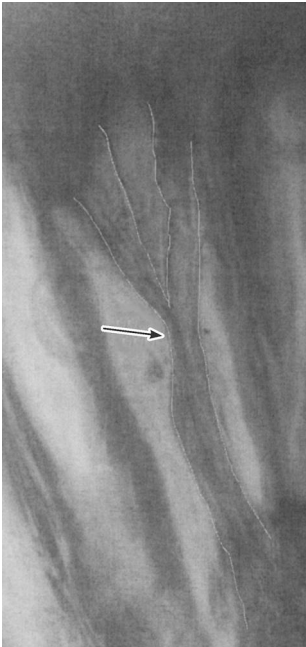


Fig. 4. A mature single paraphysal hypha (see arrow) of *Glomus liquidambaris* with terminal chlamydo-spore like structure (1000 \times).

Note: in figs 4 and 5, the paraphysal hypha is attached to the central plexus at the base.



Fig. 5. A immature single paraphysal hypha (see arrow) of *Glomus liquidambaris* forming a terminal chlamydo-spore like structure (1000 \times).

roscope, Leica WILD MP 3 and Nikon E 800. Arbuscular mycorrhizal fungi were identified to species level using bibliographies provided by Schenck and Perez (1990), Almeida and Schenck (1990) and Wu (1993).

Results and discussion

Glomus liquidambaris (Wu et Chen) Almeida et Schenck [= *G. cunninghamia* (Hu) Almeida et Schenck].

Sporocarpis: globose to subglobose, $300\text{--}600 \times 370\text{--}680$ mkm, brown to dark brown (Fig.1), consisting of chlamydospores formed radially within the paraphysis like structures (Fig. 1, 2).

Chlamydospore: ellipsoid to obovoid $70\text{--}150 \times 40\text{--}65$ mkm diam., yellowish brown to reddish brown (Fig. 2, 3), sometimes with septum at the base and mostly with a small pore opening into the subtending hyphae. Chlamydospore walls brown to reddish brown, $7\text{--}25$ mkm thick at the apices, $6\text{--}10$ mkm thick at the base and $2\text{--}5$ mkm thick at the sides (Fig. 2). Subtending hyphae $4\text{--}12$ mkm diam.

Peridium: The peridium composed of chlamydospore like structure (Fig. 4, 5) which were formed terminally on hyphae arising from the central plexus at the base of the sporocarpic chlamydospores. These hyphae repeatedly branched dichotomously resulting in tufts of hyphae (Fig. 3) referred to as paraphysis like structure (Wu, Chen, 1986).

G. liquidambaris mostly exhibited subglobose sporocarps of larger size i. e. in the category of $6000\text{--}7000$ mkm² (Wu, 1993). *G. liquidambaris* is similar to *G. clavispora* and *G. taiwanensis* due to thickened apex of the spore and the hyphal branches arising from the base of the spore and being attached to the central plexus. *G. liquidambaris* however differs from the two species due to presence of paraphysis. The species resembles *G. coremioides* and *G. sinuosum* in appearance due to presence of peridium enclosing the spores but differs from these species due to presence of paraphysis like structure which protrude out of the spore layer and forms pseudoperidium. The peridium of *G. liquidambaris* is primitive as compared to *G. coremioides* and *G. sinuosum* since it formed out of tightly packed thick walled club shaped cells. While in the *G. coremioides* and *G. sinuosum*, the peridium consists of interwoven hyphae (Wu, 1993). *G. liquidambaris* besides being distributed in China and Korea (Eom et al., 1992), is also reported from tropical India.

Conclusion

Glomus liquidambaris is characterized by the presence of paraphysis which is like peridium enclosing the chlamydospores and is reported for the first time in India. The species was isolated in March 2001 from the rhizosphere of plants growing in Western Ghat region of Goa, India. The species is rare in occurrence.

REFERENCES

- Almeida R. T., Schenck N. C. A revision of the genus *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales) // *Mycologia*. 1990. Vol. 82. P. 703—714.
- Eom A. H., Lee S. K., Lee S. S. Five sporocarpic species of *Glomus* found in Korea // *Korean Mycol.* 1992. Vol. 20. P. 85—94.
- Gerdemann J. W., Nicolson T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil wet sieving and decanting // *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 1963. Vol. 46. P. 235—244.
- Gerdemann J. W., Trappe J. M. The *Endogonaceae* in the Pacific Northwest // *Mycologia Memor.* 1974. Vol. 5. P. 1—76.
- Koske R. E., Tessier B. A. A convenient permanent slide mounting medium // *Mycol. Soc. Amer. Newsletter*. 1983. Vol. 34. P. 59.

Redecker D., Morton J. B., Bruns T. D. Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides* // *Mycologia*. 2000. Vol. 92. P. 282—285.

Schenck N. C., Perez Y. Manual for identification of VA Mycorrhizal fungi / Eds N. C. Schenck, Y. Perez. Gainesville: INVAM University of Florida, USA. 1990. 241 p.

Wu C. C., Chen Z. C. The Endogonaceae of Taiwan: I. A preliminary investigation on Endogonaceae of bamboo vegetation at Chi-Tou areas, central Taiwan // *Taiwania*. 1986. Vol. 31. P. 65—88.

Wu C. Glomales of Taiwan: III. A comparative study of spore ontogeny in *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales) // *Mycotaxon*. 1993. Vol. 47. P. 25—39.

Goa University, Taleigao Plateau
sharda_khade@yahoo.com

Received 5 XII 2008

Р Е З Ю М Е

Glomus liquidambaris (Wu et Chen) Almeida et Schenck, известный из Тайваня, Китая и Кореи, впервые обнаружен в районе Восточный Гхат (Гоа, Индия). Этот гриб спорулирует летом и лучше всего может быть изолирован во время муссона. Вид характеризуется наличием парафиз и спор с утолщенным апексом, что документировано на фотографиях. Термин «парафизальная гифа» предлагается впервые в литературе по таксономии.

Ключевые слова: *Glomus liquidambaris*, Индия, парафизы, парафизальные гифы.

S U M M A R Y

Glomus liquidambaris (Wu et Chen) Almeida et Schenck known in Taiwan, China and Korea is recorded for the first time from Western Ghat region, Goa, India. This species sporulates in summer and can be mostly isolated at the onset of monsoon. This species is characterized by the presence of paraphysis and spores with thickened apex which is documented photographically. The term *paraphysal hypha* is introduced for the first time in taxonomic literature.

Key words: *Glomus liquidambaris*, India, paraphysis, paraphysal hypha.

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

УДК 019.941 : 582.28 (038)

П. М. КИРК, П. Ф. КЕННОН, Д. У. МИНТЕР, Й. А. СТАЛПЕРС.
СЛОВАРЬ ГРИБОВ АЙНСВОРТА И БИСБИ. 10-е изд. ВЕЛЛИНГФОРД:
КАБ ИНТЕНЕШЕНЛ, 2008. 771 с. 27 рис.

P. M. KIRK, P. F. CANNON, D. W. MINTER, J. A. STALPERS. AINSWORTH AND BISBY'S DICTIONARY OF THE FUNGI. 10th ed. WALLINGFORD: CAB INTERNATIONAL, 2008. 771 p. 27 figs.

Первое издание «Словаря грибов Айнсворта и Бисби» (далее — Словарь) появилось в 1943 г. Спустя 65 лет вышло в свет 10-е издание этого Словаря. Микология, как и всякая наука в области естествознания, стремительно развивается. Появляются новые направления, происходит интеграция смежных дисциплин. Классические методы изучения грибов дополняются новыми, уже доказавшими высокую эффективность в изучении других царств природы, например молекулярно-генетическими. Продолжается изучение биологического разнообразия грибов, появляются новые подходы к решению вопросов филогении грибов, макросистематики. Все это и многое другое нашло отражение в содержании справочного издания 2008 г.

Издание включает свыше 21 тыс. словарных статей. Как и раньше, большую часть из них составляют названия родов и таксонов более высокого ранга. В это издание включены новые материалы, появившиеся как результат дальнейшего развития классических методов морфологических, физиологических и биохимических исследований грибов. Традиционные для этого справочного издания термины, фактические материалы излагаются с позиций современных достижений науки.

Словарь пополнился несколькими принципиальными новшествами. Отметим наиболее существенные из них. Дана совершенно новая классификация царства грибов (*Fungi*), основанная на современных мультигенных филогенетических исследованиях. Включены результаты ревизии классификации отдела *Basidiomycota*, что отразилось в существенной модификации классификационных схем ключевых (основных) групп этого отдела. Изложены материалы по дальнейшей интеграции анаморфных и телеоморфных родов грибов, показана ее роль в решении вопросов их классификации. В этом издании четко дифференцированы материалы по собственно грибам царства *Fungi* — *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia* и *Zygomycota* (дейтеромицеты рассматриваются как анаморфы соответствующих таксонов аскомицетов, в меньшей степени — базидиомицетов) и по не связанным с ними грибоподобным организмам царств *Chromista* (*Hyphochytridiomycota*, *Labyrinthulomycota* и *Ooomycota*) и *Protozoa* (*Dictyostelia*, *Myxogastria* и *Protostelia*), традиционно изучаемым микологами. Статьи по *Chromista* и *Protozoa* размещены в Словаре отдельно от аналогичных материалов по грибам. Практически можно говорить о трех словарях в одной книге: по царствам *Fungi*, *Chromista* и *Protozoa*.

Невозможно перечислить все нововведения, поэтому укажем лишь некоторые из них. Появилась новая статья по радиации и грибам, ее основное содержание во многом является результатом исследований, проведенных учеными ряда стран после аварии Чернобыльской АЭС в 1986 г. Значительно расширены статьи по номенклатуре,

Интернету, медицинскому использованию грибов, медицинской и ветеринарной микологии, молекулярной биологии, метаболическим продуктам, средам для культивирования грибов и многие другие. Особенно заметно расширение информации по молекулярно-генетическим исследованиям. Это касается статей по ДНК фингерпринтингу (сюда вошли сведения по таким методам, как RAPD, SSR-PCR / VNTR-PCR, ISSR-PCR, AFLP, SCARs, SSCP, DGGE) и секвенированию ДНК (включены материалы по «DNA sequence libraries» и «DNA barcoding»).

Расширен список биографий известных микологов ряда стран мира, в том числе России и бывшего СССР, помещенных в Словаре. В предыдущем издании (2001 г.) были включены биографии трех наших соотечественников: А. С. Бондарцева (1877—1968), М. С. Воронина (1838—1908) и А. А. Ячевского (1863—1932). В рецензируемое издание включены также биографии П. Н. Головина (1897—1968), М. В. Горленко (1908—1994), С. Ф. Морочковского (1897—1962), Н. А. Наумова (1888—1959), Г. С. Неводовского (1874—1952), А. А. Потебни (1870—1919), Д. Н. Тетеревниковой-Бабаян (1904—1988), Б. А. Томилина (1928—2008), В. А. Траншеля (1868—1942), В. И. Ульянищева (1898—1996) и С. Р. Шварцман (1912—1975).

В 9-м издании Словаря (2001 г.) в конце книги был раздел «Systematic Arrangement», где для царств *Fungi*, *Chromista* и *Protozoa* приводились названия входящих в них таксонов более низкого ранга (отделов, подотделов, классов, порядков, семейств и родов). В рецензируемом издании такой сводной информации нет. Для того чтобы узнать, к каким таксонам более высокого ранга относится интересующий род, надо идти «вверх по лестнице» — от рода к семейству, порядку, классу и т. д. На первый взгляд, такая подача материала менее удобна, чем в предыдущем издании.

Еще в 9-м издании анаморфные грибы рассматривались как голоморфные, т. е. для них можно использовать видовые названия и телеоморфы. В 9-м издании уже не было указаний, к какому из классов анаморфных грибов (гифомицетам или целомицетам) относится род, но указывалось, что он относится к анаморфным аскомицетам или базидиомицетам. Например, было написано: «*Phragmotrichum* Kunze (1823), anamorphic *Ascomycetes*». Поскольку теперь совокупность сумчатых грибов рассматривается как отдел *Ascomycota* с подотделами *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* и *Taphrinomycotina*, в 10-м издании данные о названном выше роде имеют следующий вид: «*Phragmotrichum* Kunze (1823), anamorphic *Pezizomycotina*». Если имеются данные о принадлежности рода к таксону более низкого ранга, род цитируется, например, как «*Bartalinea* Tassi (1900), anamorphic *Amphisphaeriaceae*» или как «*Kellermania* Ellis et Everh. (1885), anamorphic *Planistromella*», т. е. виды *Kellermania* являются анаморфами сумчатых грибов рода *Planistromella*. Сведения о систематическом положении анаморфных грибов (ранг их телеоморф) постепенно уточняются, но для подавляющего большинства анаморфных грибов данных об уточненном таксономическом положении телеоморф (хотя бы на уровне класса) пока нет.

В Словаре принята кодировка основных морфологических структур анаморфных грибов. Она позволяет определить характер конидиом (stroma, пикнида, ложе, синнема, одиночный конидиеносец); по этому признаку можно установить, относится ли этот род к гифомицетам или целомицетам. Кроме того, кодировка позволяет получить также сведения об окраске, форме и перегородках конидий, конидиогенезе. Отметим, однако, что такие полные сведения даны далеко не для всех родов, во многих случаях некоторые характеристики отсутствуют (чаще всего это данные о конидиогенезе). Тем не менее принятая система кодировки очень полезна, поскольку позволяет сразу сориентироваться, каков характер морфологических особенностей конкретного рода.

Вызывает интерес статья «Число грибов». Показано, как возрастали сведения о числе грибов, приведенные в предыдущих изданиях Словаря, начиная с первого, изданного в 1943 г. В рецензируемом издании приведены данные, что в царстве *Fungi* (сюда вошли данные по *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* и *Zygomycota*; отдельных данных об анаморфных грибах нет, поскольку их относят к соответствующим таксонам аскомицетов, в меньшей степени базидиомицетов) насчитывается

75 337 родов, включающих 97 330 видов. Для царства *Chromista* указывается 126 родов и 1036 видов, для царства *Protozoa* — 125 родов и 1165 видов. Имеется в виду, что это данные только о «хороших» родах и видах. По мнению некоторых исследователей, в настоящее время грибы насчитывают не менее 100 тыс. (возможно, 150 тыс.) «хороших» видов. По-прежнему спорной остается провизорная оценка (Hawksworth, 1993) числа видов грибов на земле — 1.5 млн видов. Очевидно, даже в отдаленном будущем это число ни подтвердить, ни опровергнуть не удастся.

В книге опубликовано множество других важных и полезных сведений о грибах. Понятно, что назвать даже самые интересные из них здесь невозможно (напомним, что в книге свыше 21 тыс. словарных статей). Выход в свет Словаря — крупнейшее событие в современной истории микологии. Надо отдать должное как авторам Словаря, так и тем 43 сотрудничавшим с ними микологам (contributors; имена этих специалистов перечислены во вступительной части книги), которые так много сделали для создания этого уникального справочного издания. Остается пожелать, чтобы Словарь стал реально доступен всем, кто интересуется изучением грибов.

© В. А. Мельник

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН
Санкт-Петербург
vadim.melnik@mail.ru

Поступила 6 IV 2009

УДК 632.4 : 633.11

© Л. Я. Плотникова, Л. В. Мешкова

**ЭВОЛЮЦИЯ ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ
ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ И ПШЕНИЦЫ ПРИ ПРЕОДОЛЕНИИ
УСТОЙЧИВОСТИ, ДЕТЕРМИНИРОВАННОЙ ГЕНОМ Lr19**PLOTNIKOVA L. Ya., MESHKOVA L. V. EVOLUTION OF CYTOPHYSIOLOGICAL
RELATIONSHIPS BETWEEN LEAF RUST CAUSAL AGENT AND COMMON WHEAT IN THE
PROCESS OF OVERCOMING OF RESISTANCE DETERMINED BY THE GENE Lr19

Микроэволюционные процессы в популяциях ржавчинных грибов приводят к появлению патотипов, преодолевающих устойчивость растений (Person, 1967; Watson, Luig, 1968; Watson, 1970; Берлянд-Кожевников, 1974). Для защиты от болезней генофонд культурных растений постоянно пополняется генами устойчивых дикорастущих видов растений. Примером успешной интрогрессии в геном мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. генетического материала другого рода является ген устойчивости к бурой ржавчине пырея удлиненного *Agropyron elongatum* (Host) Beauv., получивший обозначение Lr19 (Sharma, Knott, 1966). Этот ген длительное время сохранял эффективность в различных аграрных зонах мира и России (Mesterhazy et al., 2000; Gulyeva et al., 2001). Однако активное его использование в селекционных программах НИИСХ юго-востока в начале 70-х годов XX в., а впоследствии широкое распространение сортов, защищенных этим геном, привело к возникновению и закреплению в популяции вирулентных клонов возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. (Крупнов, Сибикеев, 2005). В настоящее время в популяциях гриба Поволжья и смежных регионов существует спектр клонов, различающихся по вирулентности и агрессивности в отношении к образцам пшеницы с геном Lr19.

Изучение особенностей цитофизиологических взаимоотношений клонов, проявляющих разный тип реакции при взаимодействии с мягкой пшеницей, несущей ген Lr19, представляет интерес для понимания микроэволюции свойств гриба при приобретении признака вирулентности; и для выявления особенностей действия гена, введенного в геном пшеницы в результате межродовой гибридизации и длительное время сохранявшего эффективность.

Материал и методы

Отсеченные листья 10-суточных проростков почти изогенной линии мягкой пшеницы сорта Тэтчер с геном Lr19 (линия TcLr19) заражали раздельно пятью моноспоровыми изолятами возбудителя бурой ржавчины *P. triticina* Erikss., проявлявшими разные типы реакции при взаимодействии с этой линией. Контролем служили инфицированные листья восприимчивого сорта Тэтчер. Изоляты были выделены из западно-сибирской и южно-уральской популяций гриба в 2006 г. Инфицированные отрезки

листьев помещали в чашках Петри на светоустановке с лампами дневного света, их жизнеспособность поддерживали 0.004%-м раствором бензимидазола (Михайлова, Квитко, 1970).

Тип реакции растений на заражение клонами гриба определяли по 5-балльной шкале (Mains, Jackson, 1926). При этом типе реакции 0 соответствовал отсутствию признаков поражения; 1 — некрозы или мелкие колонии, окруженные зоной некроза; 2 — пустулы немного большего размера, окруженные зоной некроза; 3 — пустулы, окруженные зоной хлороза; 4 — крупные пустулы, отсутствие визуальных признаков несовместимости. К несовместимым комбинациям патогена и растения относили те, в которых тип реакции растений был от 0 до 2 баллов, соответствующие клоны патогена считали авирулентными; к совместимым комбинациям относили те, в которых у растений тип реакции соответствовал 3 и 4 баллам.

Развитие инфекционных структур гриба было изучено с помощью методики выявления мицелия в целых листьях. Листья фиксировали в лактофенольной смеси через 1, 2, 3, 5 и 9 суток после инокуляции урединиоспорами и окрашивали 1%-м анилиновым синим красителем в лактофеноле; окраску дифференцировали с помощью насыщенного водного раствора хлоралгидрата (Плотникова, Кнаус, 2007). В результате клетки гриба окрашивались в синий цвет, неповрежденные клетки растений — в светло-голубой. Цитоплазма клеток растений, погибших в результате реакции сверхчувствительности, становилась темно-синей. Гистохимические исследования накопления каллозы и фенольных веществ, а также автофлуоресценции фенолов проводили на том же материале.

Для выявления каллозы материал отмывали в дистиллированной воде в течение 1 ч, затем окрашивали 1%-м раствором кораллина (розовая кислота) в 4%-м водном растворе соды Na_2CO_3 , затем окраску дифференцировали в растворе соды (Барыкина и др., 2004). Отложения каллозы окрашивались в розово-красный цвет, остальные участки клеток были бледно-розовыми.

Гистохимическое выявление фенолов проводили с помощью окраски сернокислым анилином в модификации для постоянных препаратов (Джапаридзе, 1953). Для этого материал в течение 1 ч окрашивали в смеси сульфата анилина (1 г), уксусной кислоты (2 мл) и 50%-го этилового спирта (87 мл). Лигнин в проводящих пучках, а также фенольные вещества в цитоплазме клеток и на клеточных стенках растений в зоне колоний окрашивались в желто-коричневый цвет. Автофлуоресценцию фенолов изучали с помощью люминесцентного микроскопа Люмам-5. Для этого отрезки листьев промывали после окраски анилиновым синим калий-фосфатным буфером (рН 6.24) и наблюдали в капле глицерина (Rubiales, Niks, 1995). При исследованиях использовали возбуждающий светофильтр с диапазоном волн 340—420 нм и запирающий фильтр с диапазоном волн 530—640 нм. Лигнин в проводящих пучках имел яркое зеленое свечение, клеточные стенки здоровых клеток — слабое зеленое. В местах инфекции фенольные производные в клетках и отложения лигнина на клеточных стенках имели оттенки от желто-зеленого до красного, цитоплазма клеток, погибших в результате реакции сверхчувствительности, проявляла желтую автофлуоресценцию. Для микрофотосъемки были использованы режимы работы цифровой фотокамеры Olympus SP-320, усиливающие восприятие красной области спектра. В результате на снимках цитоплазма некротических клеток приобретала желто-оранжевый цвет, а красное свечение в клетках растений в зоне колоний выявлялось отчетливее.

Накопление супероксид-аниона O_2^- изучали путем витального окрашивания инфицированных листьев красителем нитросиним тетразолием (НСТ), дающим в присутствии супероксид-аниона O_2^- , а также при действии дегидрогеназ нерастворимое синее соединение диформаза, по модифицированному методу (Chen, Heath, 1994). Для этого проводили вакуум-инфильтрацию отрезков инфицированных листьев 0.1%-м раствором красителя в дехлорированной водопроводной воде, через 30 мин материал фиксировали в лактофенольной смеси. O_2^- выявляли с часовым интервалом в период 6—24 ч, а также через 28, 32 и 36 ч после инокуляции. В каждом варианте анализировали не менее 50 мест инфицирования.

Развитие инфекционных структур гриба, проявление реакции сверхчувствительности, цитохимические реакции на супероксид-анион, каллозу и фенолы изучали с помощью светового микроскопа МБИ-15. Микрофотосъемку проводили с помощью фотокамеры марки Olympus SP-320 (разрешение 7 Мпк на 1 д.).

В каждой комбинации взаимодействий патогена и растений пшеницы изучали развитие инфекционных структур на поверхности листьев, образованных 80—100 спорами. Особенности развития гриба в тканях листьев и защитных реакций растений наблюдали у пяти растений в 25 местах контакта с грибом. Размеры гаусториев, колоний и пустул гриба, а также участков листьев с отложениями каллозы, накоплениями фенолов, зонами некроза определяли с помощью окуляра-микрометра. Площадь пустул вычисляли по формуле площади эллипса.

Данные о развитии поверхностных инфекционных структур обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа, по остальным данным вычисляли средние значения по вариантам и ошибку средней (Доспехов, 1985).

Результаты и обсуждение

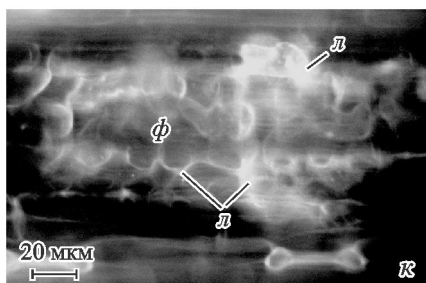
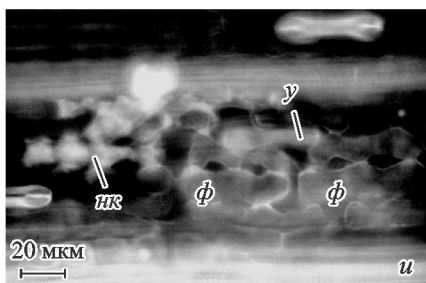
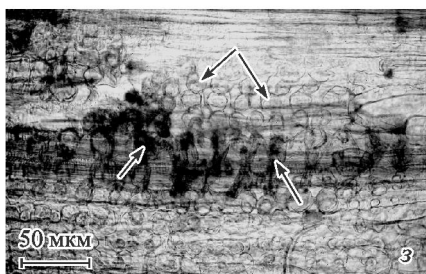
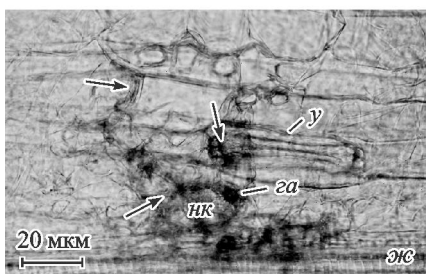
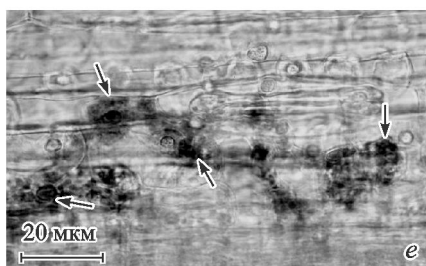
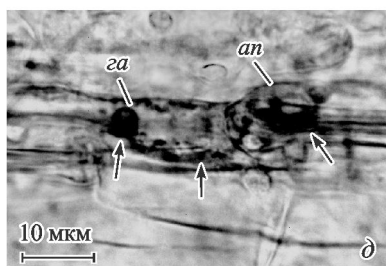
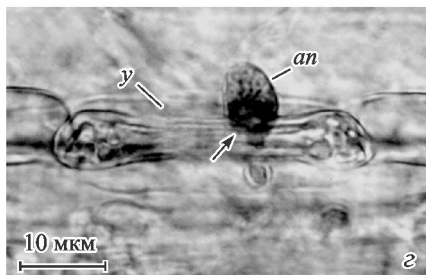
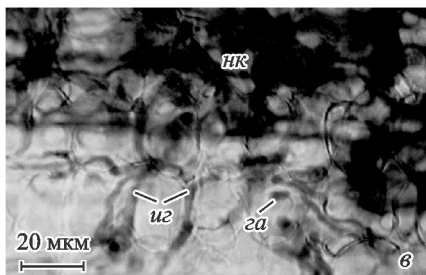
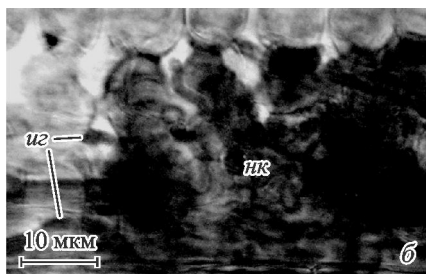
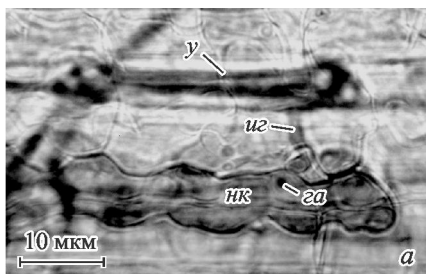
На листьях восприимчивых растений сорта Тэтчер урединиоспоры всех клонов гриба прорастали активно, 97 % ростковых трубок обнаруживали устьяца. Во всех местах инфицирования проникновение в ткани происходило успешно, на устьицах оставались лишь пустые оболочки аппрессориев. В несовместимой комбинации (тип реакции 0) аппрессориев было меньше на 14.2 %, при этом достоверно меньшая их часть была локализована на устьицах, что свидетельствует о нарушении ориентации ростковых трубок гриба (см. таблицу). Часть аппрессориев отмирала на устьицах, они имели плотную темноокрашенную цитоплазму. В комбинациях, в которых наблюдалась реакция, оцениваемая в 1 и 2 балла, ориентация ростковых трубок изолятов гриба улучшалась, усиливалось образование аппрессориев, меньшая их доля погибала на устьицах. У одного из двух клонов гриба, индуцирующих тип реакции 1, усиливалось образование аппрессориев, но проникновение в устьяца было нарушено; у второго клона при меньшей интенсивности формирования аппрессориев достоверного нарушения проникновения в устьяца не наблюдалось (см. таблицу). Эти данные показывают, что у изолятов свойства образования аппрессориев и взаимодействия с устьицами могут комбинироваться независимо. В совместимых комбинациях (баллы 3 и 4) достоверных отклонений в развитии поверхностных инфекционных структур гриба не отмечено.

После проникновения в подустыичную полость листьев гриб формировал подустыичные везикулы, инфекционные гифы, материнские клетки гаусториев и гаустории

Развитие инфекционных структур изолятов *P. tritricina* на листьях сорта Тэтчер и изогенной линии с геном Lr19

Образец пшеницы	Тип реакции, балл	Доля ростковых трубок, образовавших аппрессории, %	Доля аппрессориев на устьицах от их общего количества, %	Доля отмерших аппрессориев на устьицах от общего их количества, %
Тэтчер (контроль)	4	86.95	97.20	0.00
TcLr19	0	68.81	88.61	4.82
	1	83.53	96.45	3.16
	1	76.24	95.96	1.21
	2	83.93	94.63	0.00
	3	80.32	96.19	0.00
	4	89.30	92.32	0.00
НСР _{0,05}		7.61	7.34	2.83

Примечание. Контроль — средние значения из 5 клонов.



в мезофильных клетках. Интенсивность формирования инфекционных структур патогена и активность защитных реакций растений существенно различались в комбинациях. В несовместимой комбинации (тип реакции 0) грибок в 4.86 % в местах инфицирования останавливался на стадии развития аппрессориев, в 5.16 % — на стадии подустичных везикул, в 9.12 % — одной инфекционной гифы, в остальных местах инфицирования грибок образовал одну материнскую клетку гаустория и гаусторий в мезофильной клетке. В данной комбинации процесс формирования гаусториев нарушался, их объем был в 4.7 раза меньше, чем в контроле. Развитие патогена полностью прекращалось через 1 сутки после инокуляции (рис. 1, а; 2, а).

В комбинации с типом реакции 1 колонии в листьях развивались активнее, однако существенные различия по сравнению с совместимыми комбинациями наблюдались уже через 2 суток после инокуляции (рис. 2, б, е). Гаустории гриба развивались успешнее, чем в предыдущей комбинации, однако их объем был в 1.4 раза меньше, чем в контроле. Клетки растения с внедрившимися гаусториями отмирали в результате реакции сверхчувствительности, при этом сначала происходил их коллапс, затем они окрашивались в темно-синий цвет, что свидетельствует об интенсивной дегградации цитоплазмы; часть соседних клеток также отмирала. Лишь небольшая часть гиф выходила за зону некроза (рис. 1, б). Через 3—5 суток после инокуляции большая часть колоний останавливалась в развитии на стадии 2—4 гиф и 1—2 гаусториев (абортивные колонии), клетки растений в зоне мицелия погибали в результате реакции сверхчувствительности. Лишь часть колоний (22.3 %) развивалась успешнее и формировала микроскопические пустулы через 9 суток после инокуляции. В комбинации с типом реакции 2 мицелий гриба в тканях листьев развивался активнее, чем в предыдущих вариантах (рис. 2, в). Гаустории в размерах не отличались от гаусториев на восприимчивом сорте. Взаимодействие сопровождалось реакцией сверхчувствительности, однако в большинстве мест инфекции гифы выходили за зону некроза (рис. 1, в), а через 5 суток после инокуляции происходило активное распространение мицелия. Через 9 суток после инокуляции грибок сформировал небольшие пустулы, окруженные зоной некроза (73.3 % мест инфекции), в остальных случаях развитие колоний прекратилось на ранних стадиях.

В восприимчивых комбинациях (тип реакции 3 и 4) формирование инфекционных структур и освоение ткани листьев происходили активнее, хотя достоверные различия от контроля по количеству инфекционных структур в колониях наблюдались уже

Рис. 1. Развитие инфекционных структур *Puccinia triticina* и проявление защитных реакций в тканях листьев растений линии сорта Тэтчер с геном Lr19 в комбинациях с разным типом реакции. а — карликовый гаусторий в мезофильной клетке; 1 сутки после инокуляции. Тип реакции 0. Об. 70, ок. 15; б — колония с интенсивной реакцией сверхчувствительности; 3 суток после инокуляции. Тип реакции 1. Об. 16, ок. 15; в — инфекционные гифы на периферии колонии; 3 суток после инокуляции. Тип реакции 2. Об. 16, ок. 15; г — накопление супероксид-аниона в цитоплазме аппрессория в месте контакта с замыкающими клетками устьица (указано стрелками); 12 ч после инокуляции. Тип реакции 0. Об. 40, ок. 15; д — генерация O₂ замыкающими клетками устьица при контакте с аппрессорием и мезофильной клеткой при возникновении гаустория (указано стрелками); 1 сутки после инокуляции. Тип реакции 1. Об. 70, ок. 15; е — супероксид-анион в цитоплазме мезофильных клеток, отмирающих в результате реакции сверхчувствительности (указано стрелками); 36 ч после инокуляции. Тип реакции 1. Об. 16, ок. 15; ж — отложения каллозы на стенках замыкающих клеток устьица в месте контакта с аппрессорием, на стенках мезофильной клетки, погибшей в результате реакции сверхчувствительности, и вокруг гаустория (указано стрелками); 2 суток после инокуляции. Тип реакции 0. Об. 40, ок. 15; з — интенсивные отложения каллозы на клеточных стенках некротических клеток в зоне колоний и здоровых соседних клеток (указано стрелками); 5 суток после инокуляции. Тип реакции 1. Об. 16, ок. 15; и — накопление фенолов в клетках растений в зоне колоний. Интенсивно светится цитоплазма некротической клетки, в остальных клетках умеренное свечение растворимых фенолов; 2 суток после инокуляции. Тип реакции 1. Об. 70, ок. 15; к — отложение лигнина на клеточных стенках растения в зоне колонии; 5 суток после инокуляции. Тип реакции 1. Об. 40, ок. 14.

а—в — окраска анилиновым синим; г—е — нитросиним тетразолием; ж, з — кораллином; и, к — автофлуоресценция фенолов.

ап — аппрессорий, га — гаусторий, л — лигнин, нк — некротическая клетка, у — устьице, иг — инфекционная гифа, ф — растворимые фенолы.

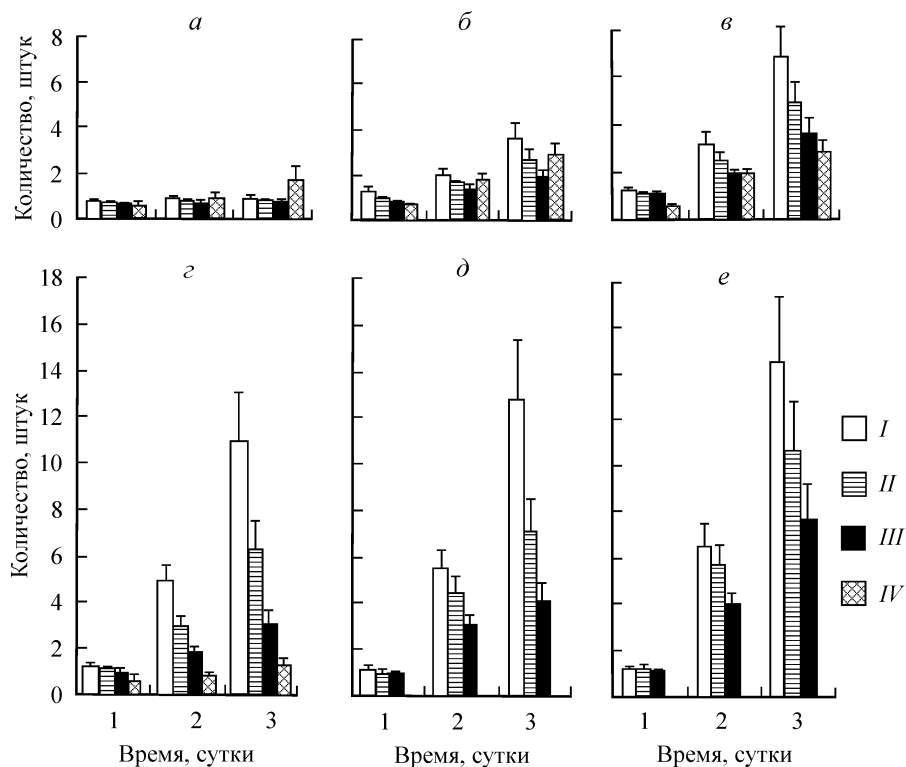


Рис. 2. Развитие инфекционных структур изолятов *Puccinia triticina* и проявление реакции сверхчувствительности в листьях растений изогенной линии сорта Тэрчер с геном Lg19 в комбинациях с разным типом реакции.

a — 0, *б* — 1 балл, *в* — 2, *г* — 3, *д* — 4, *е* — 4 балла (сорт Тэтчер; контроль). *I* — инфекционная гифа; *II* — материнская клетка гаустория; *III* — гаусторий; *IV* — клетки, погибшие в результате реакции сверхчувствительности.

через 2—3 суток после инокуляции. Образование гиф по сравнению с контролем происходило замедленно, а также частично было подавлено образование материнских клеток гаусториев и гаусториев. Так, в листьях восприимчивого сорта Тэтчер через 3 суток после инокуляции 74.3 % инфекционных гиф сформировали материнские клетки гаусториев, а 71.2 % из них образовали гаустории. В то же время в комбинации с типом реакции 3 лишь 57.8 % инфекционных гиф образовали материнские клетки гаусториев и только 49.2 % из них были способны образовать гаустории в мезофилльных клетках (рис. 2, *г*—*е*). В этой комбинации в течение первых 3 суток после инокуляции отмирали единичные клетки растений, их количество несколько возрастало к моменту спороношения. В комбинации с типом реакции 4 признаков несовместимости изолята с растениями не выявлено, однако размеры колоний и пустул были существенно меньше, чем на листьях восприимчивого сорта Тэтчер. В целом по мере повышения совместимости изолятов гриба с растениями усиливалось образование инфекционных структур, снижалась доля abortивных колоний, размеры развивающихся колоний и пустул увеличивались (рис. 3).

Исследование накопления супероксид-аниона в инфекционных местах с помощью красителя нитросинего тетразолия (НСТ) показало, что здоровые ткани листьев не окрашивались. При развитии инфекционных структур гриба на поверхности листьев восприимчивых растений краситель накапливался в кончиках гиф и аппрессориях паразита в гранулярных структурах, соответствующих по размерам митохондриям. Вероятно, НСТ проникал в клетки гриба и выявлял дегидрогеназную активность митохондрий (рис. 1, *г*). При перемещении цитоплазмы из аппрессория в подустыич-

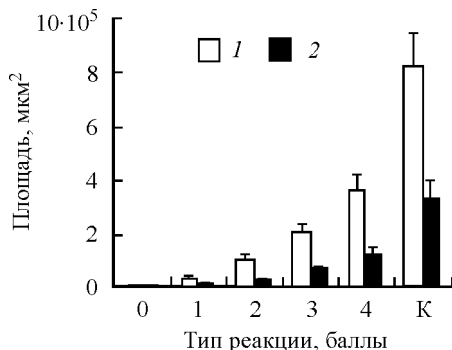


Рис. 3. Размеры колоний и пустул изолятов *Puccinia triticina* на листьях линии сорта Тэтчер с геном Lr19 в комбинациях с разным типом реакции.

1 — площадь колоний, 2 — пустул. К — контроль.

ную везикулу, а затем в инфекционные гифы происходило перемещение окрашенных митохондрий.

При взаимодействии авирулентных клонов с растениями выявлена генерация супероксид-аниона, свидетельствующая о развитии окислительного взрыва. В несовместимой комбинации (тип реакции 0) в 10—12 % мест инфекции через 11—12 ч после инокуляции отмечено интенсивное накопление O_2^- в зоне контакта аппрессориев с клеточными стенками замыкающих клеток устьиц. При этом краситель диффузно распределялся в цитоплазме клеток гриба, но не в цитоплазме замыкающих клеток устьиц (рис. 1, з). В некоторых случаях O_2^- накапливался на стенках мезофильных клеток при контакте с ними инфекционных гиф и материнских клеток гаусториев. Через 18—24 ч была обнаружена генерация супероксид-аниона вокруг внедрившихся в клетки карликовых гаусториев. Позже O_2^- был выявлен в коллапсированных мезофильных клетках вдоль плазматической мембраны, в органеллах и вакуолях. В комбинации с типом реакции 1 супероксид-анион генерировался замыкающими клетками устьиц менее интенсивно и позже, чем в несовместимой комбинации (рис. 4). Через 21—24 ч после инокуляции наблюдалось накопление O_2^- вокруг гаусториев, внедрившихся в мезофильные клетки, затем супероксид-анион концентрировался в цитоплазме коллапсированных мезофильных клеток растения (рис. 1, д, е). Накоп-

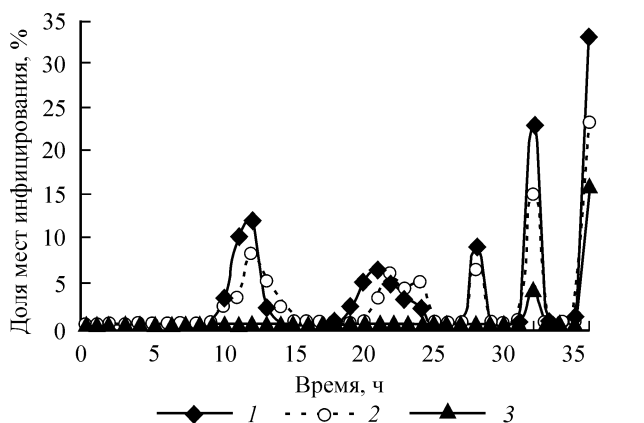


Рис. 4. Динамика генерации супероксид-аниона в листьях линии сорта Тэтчер с геном Lr19 при заражении авирулентными изолятами *Puccinia triticina* в комбинациях с разным типом реакции.

1 — 0, 2 — 1 балл, 3 — 2 балла.

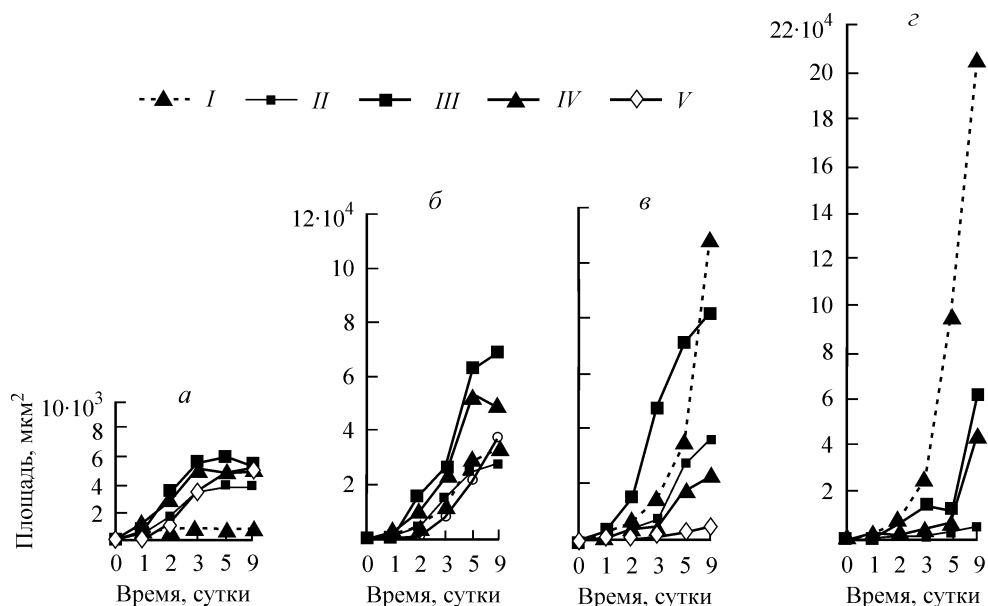


Рис. 5. Динамика развития колоний *Puccinia triticina* и проявления защитных реакций растений в листьях линии сорта Тэтчер с геном Lr19 в комбинациях с разным типом реакции.

a — 0, *б* — 1 балл, *в* — 2, *г* — 3 балла. *I* — межклеточный мицелий, *II* — реакция сверхчувствительности, *III* — растворимые фенолы, *IV* — каллоза, *V* — лигнин.

ление и распространение O_2^- в мезофильных клетках совпадало со временем развития реакции сверхчувствительности. При взаимодействии растений с изолятом, обладающим большей совместимостью (тип реакции 2), в местах проникновения гриба в устьица обнаружены только следы супероксид-аниона. Генерация O_2^- наблюдалась в коллапсированных мезофильных клетках через 32—36 ч после инокуляции, при этом реакция на супероксид-анион была слабее, чем в предыдущих комбинациях.

В комбинации с типом реакции 0 клетки растений после внедрения карликового гаустория отмирали. Через сутки после инокуляции коллапс и интенсивная окраска цитоплазмы наблюдались в половине мест инфекции, через 2 суток отмирали все клетки с гаусториями, а через 3 суток после инокуляции отмечалось слабое расширение зоны некроза — 2—3 клетки (рис. 2, *a*). Поскольку развитие гриба прекращалось через сутки после инокуляции, то в половине мест инфекции реакция сверхчувствительности развивалась после его остановки. Через 2—3 суток наблюдались утолщения стенок некротических клеток. Через сутки после инокуляции выявлены отложения каллозы, имевшие розовый цвет, на стенках всех клеток с внедрившимися в них гаусториями. Через 2 суток после инокуляции отложения каллозы на стенках некротизированных клеток увеличились, появились сферические отложения каллозы вокруг гаусториев. Обнаружены мощные каллозные отложения на стенках замыкающих клеток устьиц в местах контакта с аппрессориями (рис. 1, *ж*). Одновременно с расширением зоны некроза наблюдалось увеличение количества клеток с каллозными отложениями (рис. 5, *a*). При этом стенки некротических клеток проявляли интенсивную реакцию на каллозу, а стенки соседних клеток — слабую.

Проведенные ранее исследования накопления фенольных соединений в инфицированных *P. graminis* f. sp. *tritici* листьях устойчивых линий пшеницы показали, что цитоплазматические фенолы легко экстрагируются растворами щелочи (растворимые фенолы), а фенолы, связанные с клеточными стенками, не экстрагируются. На клеточных стенках выявлено присутствие комплексного фенолпропаноидного полимера — лигнина (Beardmore et al., 1983).

В наших экспериментах в здоровых частях листьев серноокислый анилин окрашивал в желто-коричневый цвет только лигнифицированные клетки проводящих пучков. В несовместимых комбинациях через 2—9 суток после инокуляции выявлено усиление реакции на фенолы сначала в цитоплазме, а затем и в стенках клеток, погибших в результате реакции сверхчувствительности. По мере роста колоний и расширения зоны некроза концентрация фенолов и размер зон, в которых происходил их синтез, увеличивались. Зоны автофлуоресценции фенолов совпадали с зонами, выявленными с помощью окраски серноокислым анилином. Однако применение люминесцентного микроскопа позволило наблюдать более отчетливые картины распределения фенольных соединений в тканях. В здоровых тканях зеленое свечение проявлялось в лигнифицированных клетках ксилемы проводящих пучков, клеточные стенки остальных клеток листа имели слабое зеленое свечение. В инфекционных клетках наблюдался метахроматический эффект — фенольные производные имели оттенки от желто-зеленого до красного цвета. Ранее метахроматический эффект, свидетельствующий о присутствии в клеточных стенках разных форм фенолов, был показан в папиллах и гало, образующихся при инфицировании листьев пшеницы непатогенными грибами (Ride, Pearce, 1979). Результаты изучения динамики накопления растворимых фенолов и лигнификации клеток растений в зоне колоний приведены по данным исследования автофлуоресценции.

В комбинации с типом реакции 0 автофлуоресценция фенолов в форме светло-красного свечения появлялась через сутки после инокуляции в небольших участках цитоплазмы замыкающих клеток устьиц в местах контакта с аппрессориями. Через 2 суток после инокуляции цитоплазма клеток, погибших в результате реакции сверхчувствительности, приобретала желто-оранжевое свечение, через 2—3 суток на их клеточных стенках появлялись мощные желтые отложения лигнина. В дальнейшем зоны синтеза растворимых фенолов и лигнификации существенно не увеличивались (рис. 5, а). В целом в данной комбинации защитные реакции были локальными, захватывали 3—6 клеток листа. Расширение зоны некроза, синтез каллозы и фенолов происходили после остановки развития гриба, т. е. были неспецифическими.

В комбинации с типом реакции 1 замедленное развитие колоний сопровождалось реакцией сверхчувствительности, за пределы зоны некроза выходило небольшое количество гиф (рис. 1, б). Интенсивное накопление каллозы выявлено на стенках замыкающих клеток устьиц и некротических клеток через 2 суток после инокуляции. Через 3—5 суток зона синтеза каллозы расширялась, при этом существенно утолщались клеточные стенки живых клеток, окружающих колонии (рис. 1, з; 5, б). Однако через 9 суток интенсивно реагировали на каллозу только клеточные стенки некротических клеток, а в соседних клетках реакция была слабой. Автофлуоресценция растворимых фенолов проявлялась через 2 суток после инокуляции в виде светло-красного свечения цитоплазмы некротических клеток (рис. 1, и). Позже автофлуоресценция фенолов в цитоплазме клеток и в апопласте усиливалась, становилась красной, зона свечения активно расширялась, что свидетельствует об интенсивном накоплении веществ в достаточно больших участках листа. Через 3—5 суток после инокуляции на клеточных стенках некротических и части соседних клеток появились лигниновые отложения желтого цвета (рис. 1, к). Лигнификация клеточных стенок тесно коррелировала с распространением реакции сверхчувствительности. Лигниновые отложения были особенно характерны для abortивных колоний. Если колонии гриба развивались более успешно и образовывали пустулы, то лигнин на клеточных стенках не откладывался. Размеры зон синтеза каллозы и накопления растворимых фенолов в цитоплазме клеток и апопласте были существенно больше, чем размеры мицелия и зоны некроза (рис. 5, д).

В комбинации с типом реакции 2 реакция сверхчувствительности протекала медленнее, чем в предыдущих вариантах, при этом значительная часть коллапсированных клеток сохраняла умеренную синюю окраску, что свидетельствует о частичном разрушении цитоплазмы. Рост мицелия существенно обгонял расширение зоны некроза (рис. 1, в). Отложения каллозы на клеточных стенках некротических клеток

растения в центре колонии были тонкими, появлялись с задержкой (рис. 5, в). К моменту споруляции умеренно окрашивались клетки растения, расположенные в зоне пустулы. Светло-красная автофлуоресценция растворимых фенолов проявлялась через 2—3 суток после инокуляции в цитоплазме клеток растения в зоне колонии, а также в 2—3 соседних слоях. Через 5 суток свечение фенолов в цитоплазме и апопласте усилилось и распространилось на большую зону, но к моменту образования пустул интенсивная автофлуоресценция сохранилась только в тканях растений, локализованных в центре колоний, а по периферии снизилась. В зоне маленьких abortивных колоний автофлуоресценция растворимых фенолов была более интенсивной, некротические клетки имели ярко-желтое свечение, а на клеточных стенках на периферии зоны некроза наблюдались небольшие лигниновые отложения. Характерным для данной комбинации было то, что защитные реакции растений были менее интенсивными по сравнению с комбинацией с типом реакции 1, проявлялись преимущественно в клетках, локализованных в центре колоний, а на периферии были подавлены (рис. 5, в).

В комбинации с типом реакции 3 мицелий развивался активнее. В зоне колоний отмечались единичные (1—3) коллапсированные клетки с цитоплазмой, умеренно окрашенной анилиновым синим, их клеточные стенки проявляли слабую реакцию на каллозу. К моменту спорогенеза каллозные отложения умеренной интенсивности распространялись на клетки, расположенные под спорогенной тканью пустулы. Слабая автофлуоресценция фенолов в цитоплазме клеток растения проявлялась через 2—5 суток после инокуляции в центре колонии. К моменту спороношения некоторое усиление автофлуоресценции фенолов наблюдалось в клетках растения, окружающих пустулу. Лигнификация клеточных стенок не была отмечена. В целом в данной комбинации защитные реакции проявлялись слабо, на поздних этапах патогенеза и преимущественно в клетках растений в центральной части колонии (рис. 5, з). В совместимой комбинации (тип реакции 4) защитные реакции в течение 1—5 суток не отмечены. Лишь к моменту спороношения наблюдались слабые каллозные отложения и умеренная автофлуоресценция фенолов в цитоплазме клеток растений, расположенных в зоне пустулы.

Появление в популяции *P. triticina* патотипов, преодолевающих действие гена устойчивости Lr19, перенесенного в геном мягкой пшеницы из *Agropyron elongatum*, представляет уникальную возможность цитофизиологического исследования становления признака вирулентности у ржавчинного гриба.

Как показано выше, при полной несовместимости изолята с растениями линии TcLr19 наблюдались нарушения развития поверхностных инфекционных структур *P. triticina* на листьях: частичная дезориентация ростковых трубок, подавление морфогенеза аппрессориев и нарушение процесса проникновения гриба в подустыичную полость. Сходные отклонения во взаимодействии наблюдались при развитии гриба на листьях видов-нехозяев — овса (*Avena sativa* L.) и ячменя (*Hordeum sativum* Jess.) (Плотникова, Кнаус, 2007). В части мест инфицирования после проникновения в устьица гриб останавливался в развитии на стадиях подустыичной везикулы или одной инфекционной гифы, в остальных случаях он формировал один карликовый гаусторий в мезофилльной клетке. Остановка развития гриба на стадии одной инфекционной гифы или при попытке внедрения в клетку считается типичной для взаимодействия с иммунными видами и продемонстрирована при заражении *P. graminis* f. sp. *tritici* растений кукурузы и *P. helianthi* растений семейства бобовых (Leath, Rowell, 1966; Heath, 1977). Таким образом, фунгицидное действие иммунных растений с геном Lr19 на развитие авирулентного изолята гриба сходно с проявлениями видового иммунитета.

По мере повышения совместимости изолятов с растениями изогенной линии (комбинации с типом реакции 1 и 2) морфогенез клеточных структур гриба становился более успешным: усиливалось образование аппрессориев, инфекционных гиф, более интенсивно образовывались материнские клетки гаусториев и гаустории в мезофилльных клетках растений. Следует отметить, что в комбинациях с типом реакции 0 и 1 гаустории гриба были недоразвиты и существенно отличались по размерам от нормальных, их проникновение в клетки сопровождалось окислительным взрывом

и интенсивной реакцией сверхчувствительности. В комбинации с типом реакции 2 балла размер гаусториев не отличался от контроля, их внедрение имело меньшее травматическое воздействие на растение, колонии гриба развивались активнее, а отмирание клеток растения происходило медленнее. При повышении совместимости уменьшалась доля абортивных колоний.

Успешное развитие инфекционных структур паразитических грибов стимулируется морфологическими и физическими особенностями поверхности органов растений, а также химическими составляющими их клеток (Heath, 1990; Moerschbacher, Mendgen, 2000; Collins et al., 2001). Добавление в среду для культивирования патогенов гидролизатов клеточных стенок растения-хозяина вигны стимулировало образование гаусториев ржавчинного гриба *Uromyces vignae* в аксенической культуре (Heath, 1990). Поскольку морфология поверхности листьев (форма и размеры клеток, количество устьиц, плотность расположения проводящих пучков) изогенной линии TcLr19 и сорта Тэтчер была практически идентичной, можно предположить, что ген определяет особенности химического состава, которые не воспринимаются авирулентными клонами как положительные стимулы. Повышение интенсивности развития поверхностных инфекционных структур при повышении совместимости изолятов с растениями линии TcLr19 показывает, что гриб в процессе микроэволюции адаптировался к этим сигналам.

На этапе контакта аппрессориев авирулентных клонов с замыкающими клетками устьиц и при внедрении проникающих выростов в подустьичные полости листьев нами выявлена первая активная защитная реакция в форме генерации супероксид-аниона. Активные формы кислорода (АФК) являются важной составной частью защитных механизмов растений от патогенов. В патогенезе они выполняют ряд функций: имеют антимикробный эффект; индуцируют передачу сигнала в НАДФН-оксидазной сигнальной системе; участвуют в реализации программы реакции сверхчувствительности; способствуют образованию поперечных связей между компонентами клеточной стенки (Boller, Keen, 2000). АФК могут генерироваться как экстраклеточно, так и интраклеточно (Baker, Orlandi, 1995). При развитии *Blumeria graminis* f. sp. *barley* на устойчивых растениях ячменя продемонстрирован двухфазный характер окислительного взрыва, причем первый пик был кратковременным, а второй развивался позже и длился дольше (Able, 2003).

Нами впервые было продемонстрировано, что при взаимодействии ржавчинного гриба *P. triticina* с растениями, несущими ген устойчивости далекого в филогенетическом отношении вида, АФК генерировались в разных тканях: первый пик отмечен при контакте аппрессориев с замыкающими клетками устьиц, а второй проявлялся при внедрении гаусториев в мезофилльные клетки. В первом случае супероксид-анион выделялся замыкающими клетками устьиц экстраклеточно и проникал в цитоплазму аппрессориев и подустьичных везикул, во втором случае накопление O_2^- было интраклеточным. Первый пик отмечен в части мест инфицирования (6—12 %). Вероятно, это связано, с одной стороны, с неравномерностью развития инфекционных структур гриба, а с другой — с кратковременностью реакции растений. Позже по мере проникновения гаусториев гриба в мезофилльные клетки и развития реакции сверхчувствительности количество мест инфицирования со специфической реакцией на O_2^- увеличилось. Интенсивность двух пиков окислительного взрыва была наибольшей в иммунных растениях. При повышении совместимости изолятов с растениями (типы реакции 1 и 2) снижалась интенсивность окислительного взрыва на устьицах, но супероксид-анион накапливался в мезофилльных клетках.

Ранее с помощью электронной микроскопии было показано, что при развитии *P. triticina* на иммунных растениях линии TcLr19 в подустьичных везикулах и первых инфекционных гифах было подавлено функционирование ядерного аппарата, а в митохондриях разрушены мембраны и дезорганизован матрикс. Карликовые гаустории через несколько часов после внедрения в клетки растений демонстрировали признаки отмирания: цитоплазма была осмиофильной, митохондрии разрушены, в то время как клетки растений имели минимальные нарушения (Плотникова, 2008а). При заражении *P. triticina* и *P. coronata* видов-нехозяев (овса и пшеницы соответственно) грибы

прекращали развитие на стадии аппрессориев. После подавления генерации АФК грибы формировали гаустории в мезофильных клетках (Плотникова, 2008б). Быстрое накопление АФК в папилле под проникающим выростом возбудителя мучнистой росы ячменя *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* способно остановить развитие гриба до внедрения (линия с геном mlo5), а в цитоплазме — после проникновения в одну клетку (ген Mlg) (Huckelhoven et al., 1999). Эти данные показывают, что окислительный взрыв может приводить к подавлению либо нарушению развития грибов в устойчивых растениях. Вероятно, по мере эволюции признака вирулентности к гену Lg19 гриб постепенно приобрел свойства не индуцировать (или подавлять) окислительный взрыв сначала на устьицах, а затем в мезофильных клетках растения. Такие особенности взаимодействия могут быть следствием утраты элиситорной активности разных структур патогена — аппрессориев и гаусториев либо приобретения грибом супрессоров окислительного взрыва.

Реакция сверхчувствительности часто связана с проявлением других механизмов устойчивости: накоплением PR-белков, фитоалексинов, фенольных соединений (Kombrink, Somssvich, 1995). В наших экспериментах реакция сверхчувствительности проявлялась во всех несовместимых комбинациях, однако ее влияние на результат взаимодействия неоднозначно. При проявлении растениями иммунитета гриб останавливался в некоторых местах инфицирования до развития реакции сверхчувствительности. В то же время после коллапса цитоплазма клеток разрушалась быстро, о чем свидетельствует интенсивная окраска анилиновым синим. Вероятно, в комбинации с типом реакции 0 основное защитное значение имел окислительный взрыв.

В комбинации с типом реакции 1 балл медленный рост колонии сопровождался интенсивным разрушением клеток в результате реакции сверхчувствительности и расширением зоны некроза. Некротические зоны самого большого размера наблюдались около колонии гриба в устойчивой комбинации с типом реакции 2, однако коллапс клеток растений происходил позднее по сравнению с предыдущими комбинациями, цитоплазма разрушалась медленнее, поэтому рост мицелия опережал распространение зоны некроза. Ранее было установлено, что программа отмирания клетки в результате реакции сверхчувствительности запускается окислительным взрывом (Levine et al., 1994). В наших экспериментах скорость разрушения цитоплазмы клеток растений коррелировала с интенсивностью накопления супероксид-аниона.

Накопление полисахарида каллозы (β -1,3-глюкана) на клеточных стенках является частью ответа растений на биотический стресс (Bowles, 1990). Каллоза является постоянным компонентом папилл — отложений на клеточных стенках растений, которые имеют защитное значение. Предполагается защитное действие каллозы в двух случаях: при образовании физического барьера, восстанавливающего целостность поврежденной клеточной стенки, и создании барьера, препятствующего поглощению питательных веществ из клеток хозяина (Aist, 1976; Heath et al., 1996). В наших экспериментах в комбинациях с типом реакции 0 и 1 накопление каллозы на клеточных стенках клеток с внедрившимися гаусториями наблюдалось уже через сутки после инокуляции и усиливалось при развитии реакции сверхчувствительности. Роль каллозы как защитного фактора, вероятно, более важна в комбинации с типом реакции 1, поскольку прогрессирующее ее накопление совпадало со временем ограничения роста колоний. В совместимых комбинациях (типы реакции 3 и 4) синтез каллозы был подавлен вплоть до момента спороношения гриба. Быстрое накопление каллозы на клеточных стенках связано с тем, что ее синтез индуцируется поступлением в цитоплазму ионов Ca^{2+} и происходит из имеющихся в клетке мономеров (Ohana et al., 1993), одновременно потоки Ca^{2+} необходимы для генерации АФК (Boller, Keen, 2000). В связи с этим объясним наблюдавшийся нами активный синтез каллозы в комбинациях с интенсивной генерацией АФК и реакцией сверхчувствительности.

Фенолы представлены в растениях большой группой соединений, различающихся по химическому составу и свойствам, они составляют существенную часть защитного арсенала растений от биотических и абиотических стрессов. Лигнин представляет собой полимер, составленный из фенилпропаноидных мономеров, он отличается высо-

кой химической стойкостью. В связи с этим лигнификация клеточных стенок считается важным способом защиты растений (Dixon, Palva, 1995).

Сведения о роли фенолов в защите пшеницы от ржавчинных болезней неоднозначны. Подавление активности ключевого фермента синтеза фенилпропаноидов — фенилаланин-аммиак лиазы с помощью ингибиторов приводило к снижению интенсивности реакции сверхчувствительности, уменьшению лигнификации тканей пшеницы, при этом развитие возбудителя стеблевой ржавчины усиливалось (Reisener et al., 1986; Moerschbacher et al., 1990). В то же время в исследованиях В. В. Чигрина с соавторами (1973) не выявлено усиления синтеза фенолов в устойчивых растениях пшеницы, инфицированных *P. graminis* f. sp. *tritici*. В других экспериментах на той же модели не обнаружена связь между содержанием фенолов и устойчивостью, хотя в устойчивых растениях накопление происходило быстрее (Kiraly, Farkas, 1962). В исследованиях на устойчивых к стеблевой ржавчине изогенных линиях пшеницы с генами Sr5 и Sr6 показано раннее усиление синтеза фенолов в несовместимых комбинациях. При этом во фракции растворимых фенолов выявлены фенольные кислоты и предшественники лигнина. Через 5—8 суток наблюдалась лигнификация стенок клеток устойчивых растений (Beardmore et al., 1983).

Наши данные подтверждают предположение, что синтез фенольных веществ является одним из существенных факторов защиты растений против ржавчинных грибов. При повышении совместимости с растениями изоляты гриба, вероятно, приобрели способы подавления этого механизма устойчивости. Лигнификация клеточных стенок растений проявлялась только в комбинациях с интенсивным накоплением АФК (типы реакции 0 и 1).

Таким образом, наши данные показывают, что взаимодействие *P. triticina* с иммунными растениями линии сорта Тэтчер с геном Lr19 сходно с видами-нехозяевами. В процессе микроэволюции гриб приобрел способность успешно формировать инфекционные структуры на поверхности и в ткани листьев. Одновременно у патогена появились свойства, позволяющие не индуцировать защитные реакции растений: окислительный взрыв, синтез каллозы и фенольных веществ, реакция сверхчувствительности. Становление признака вирулентности происходит не одноэтапно, вероятно, патоген должен приобрести большой набор свойств, позволяющих успешно паразитировать на растениях. Очевидно, этими причинами объясняется длительная эффективность гена устойчивости Lr19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятов А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: МГУ, 2004. 312 с.

Берлянд-Кожевников В. М. Сопряженная эволюция растения-хозяина и паразита и селекция пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине // Генетика и селекция болезнеустойчивых сортов культурных растений. М.: Наука, 1974. С. 17—40.

Джапаридзе Л. И. Практикум по микроскопической химии растений. М.: Сов. наука, 1953. 178 с.

Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1985. 351 с.

Крупнов В. А., Сибикиев С. Н. Чужеродные гены для улучшения мягкой пшеницы // Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб.: ВИР, 2005. С. 540—558.

Михайлов Л. А., Квитко К. В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm. // Микология и фитопатология. 1970. Т. 4, вып. 4. С. 269—273.

Плотникова Л. Я. Клеточные особенности иммунной реакции пшеницы с геном Lr19 на заражение возбудителя бурой ржавчины // Цитология. 2008а. Т. 50, № 2. С. 124—131.

Плотникова Л. Я. Влияние поверхностных свойств и физиологических реакций растений-нехозяев на развитие клеточных структур ржавчинных грибов // Цитология. 2008б. Т. 50, № 5. С. 439—446.

Плотникова Л. Я., Кнауц Ю. К. Клеточные механизмы иммунитета к бурой ржавчине видов-нехозяев и устойчивых видов злаков // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41, вып. 5. С. 461—470.

Чигрин В. В., Розум Л. В., Запрометов М. Н. Фенольные карбоновые кислоты и лигнин в листьях сортов яровой пшеницы, устойчивых и восприимчивых к стеблевой ржавчине // Физиол. растений. 1973. Т. 20, № 6. С. 942—948.

Able A. J. Role of reactive oxygen species in the response of barley to pathogens // Protoplasma. 2003. Vol. 221, N 1—2. P. 137—143.

Aist J. R. Papillae and related wound plugs of plant cells // Annu. Rev. Phytopathol. 1976. Vol. 14. P. 145—163.

Baker C. J., Orlandi E. W. Active oxygen in plant pathogenesis // Annu. Rev. Phytopathol. 1995. Vol. 33. P. 299—321.

Beardmore J., Ride J. P., Granger J. W. Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust // Physiol. Plant Pathol. 1983. Vol. 22. P. 209—220.

Boller T., Keen N. T. Perception and transduction of elicitor signals in host-pathogen interactions // Mechanisms of plant diseases / Eds A. J. Slusarenko et al. Kluwer Ac. Publ. the Netherlands, 2000. P. 189—230.

Bowles D. J. Defense-related proteins in higher plants // Annu. Rev. Biochem. 1990. Vol. 59. P. 873—907.

Chen C. Y., Heath M. C. Features of the rapid cell death induced in cowpea by the monokaryon of the cowpea rust fungus or the monokaryon-derived cultivar-specific elicitor of necrosis // Physiol. Molec. Plant Pathol. 1994. Vol. 44. P. 157—170.

Collins T. J., Moerschbacher B. M., Nick R. D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals // Physiol. Molec. Plant Pathol. 2001. Vol. 58, N 6. P. 259—266.

Dixon R. A., Palva N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1085—1097.

Gulyaeva K., Mikhailova L., Walther U., Kapahnke D. Comparison of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populations in Germany, Austria, Russia and Ukraine in 2000 / Proc. of Conf. «Sustainable system of cereal crop protection against fungal diseases a way of reduction of toxin occurrence in Food». Kromerizh, 2001. P. 175—178.

Heath M. C. A comparative study of non-host interactions with rust fungi // Physiol. Plant Pathol. 1977. Vol. 10. P. 73—88.

Heath M. C. Influence of carbohydrates on the induction of haustoria of the cowpea rust fungus in vitro // Exp. Mycology. 1990. Vol. 14. P. 84—88.

Heath M. C., Xu H., Eilam T. Nuclear behavior of cowpea rust fungus during the early stages of basidiospore — or urediniospore-derived growth in resistant or susceptible cowpea cultivars // Phytopathology. 1996. Vol. 86. P. 1057—1065.

Huckelhoven R., Fodor J., Preis C., Kogel K. H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid // Plant Physiol. 1999. Vol. 11. P. 1251—1260.

Kiraly Z., Farkas G. L. Relation between phenol metabolism and stem rust resistance in wheat // Phytopathology. 1962. Vol. 52. P. 657—664.

Kombrink E., Somssvich I. E. Defense responses of plants to pathogens // Adv. Bot. Res. 1995. Vol. 21. P. 2—34.

Leath K. T., Rowell L. J. Histological study of resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis* // Phytopathology. 1966. Vol. 56. P. 1305—1309.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response // Cell. 1994. Vol. 79. P. 583—593.

Mains E. B., Jackson E. S. Physiological specialization in the leaf rust wheat *Puccinia triticina* Erikss // Phytopathology. 1926. Vol. 16, N 1. P. 89—120.

- Mesterhazy A., Bartos P., Goyeau H., Niks R. E. et al. European virulence survey for leaf rust in wheat // *Agronomie*. 2000. N 20. P. 793—804.
- Moerschbacher B., Mendgen K. Structural aspects of defence // *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* / Eds A. J. Slusarenko et al. Kluewer Ac. Publ. the Netherlands, 2000. P. 231—278.
- Moerschbacher B. M., Noil U., Gorrichon L., Reisener H.-S. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust // *Plant Physiol*. 1990. Vol. 93. P. 485—470.
- Ohana P., Bemiman M., Delmer D. P. Stimulation of callose synthesis in vivo correlates with changes in intracellular distribution of the callose synthase activator P-furfuryl- β -glucoside // *Plant Physiol*. 1993. Vol. 101. P. 187—191.
- Person C. Genetic aspects of parasitism // *Can. J. Bot.* 1967. Vol. 45, N 8.
- Reisener H. J., Tiburzy R., Kogel K. H., Moerschbacher B., Heck B. Mechanism of resistance of wheat against stem rust in the Sr5/P5 interaction // *Biol. Molec. Plant Pathol. Inter.* 1986. P. 141—148.
- Ride J. P., Pearce R. B. Lignification and papilla formation at sites of attempted penetration of wheat leaves by non-pathogenic fungi // *Physiol. Plant Pathol.* 1979. Vol. 15. P. 79—92.
- Rubiales D., Niks R. E. Characterization of Lr34, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust // *Plant Dis.* 1995. Vol. 79, N 12. P. 1208—1212.
- Sharma D., Knott D. R. The transfer of leaf resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation // *Can. J. Genet. Cytol.* 1966. Vol. 8. P. 137—143.
- Watson I. A. Changes in virulence and population shifts in plant pathogens // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1970. Vol. 8. P. 209—230.
- Watson I. A., Luig N. H. Progressive increase in virulence in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // *Phytopathology*. 1968. Vol. 58, N 1. P. 70—73.

Омский государственный аграрный университет
Сибирский научно-исследовательский институт

Поступила 21 IV 2008

сельского хозяйства

Омск

lplotnikova@rambler.ru

Р Е З Ю М Е

Ген устойчивости Lr19, перенесенный из *Agropyron elongatum* в мягкую пшеницу, был преодолен ржавчинным грибом *Puccinia triticina*. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений между паразитическим грибом и пшеницей была изучена с использованием изолятов, вызывающих различные типы реакции с изогенной линией сорта Тэтчер с геном Lr19. Цитологические исследования показали, что по мере повышения совместимости изолятов с растениями развитие инфекционных структур на поверхности и в тканях постепенно усиливалось, а интенсивность защитных реакций (окислительного взрыва, реакции сверхчувствительности, синтеза каллозы и фенолов) снижалась.

Ключевые слова: *Puccinia triticina*, Lr19, сопряженная эволюция, цитология.

S U M M A R Y

The gene of resistance Lr19 transferred from *Agropyron elongatum* to common wheat had been negotiated by brown rust fungus *Puccinia triticina*. The evolution of cytophysiological relationships between parasitic fungus and wheat was investigated using isolates causing different reactions types with isogenic line cv. Thatcher with Lr19 gene. Cytological research revealed that with rising of compatibility of isolates with plants the development of infection structures on the surface and in tissues gradually enhanced and defence reaction (oxidative burst, hypersensitive reaction, synthesis of callose and phenols) were diminished.

Key words: *Puccinia triticina*, Lr19, coevolution, cytology.

УДК 582.284.99 : 581.144.1

© Е. Л. Постнова, Л. А. Завьялова, И. Д. Инсарова

**ФОРМИРОВАНИЕ АТИПИЧНЫХ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ И ПРИМОРДИЕВ
GANODERMA LUCIDUM IN VITRO И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС
АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**POSTNOVA E. L., ZAVYALOVA L. A., IN SAROVA I. D. FORMATION OF FRUIT BODIES
AND PRIMORDIA OF *GANODERMA LUCIDUM* IN VITRO AND INFLUENCE
OF ABIOTIC FACTORS ON THIS PROCESS

Ganoderma lucidum (Curtis: Fr.) P. Karst., трутовик лакированный, является представителем ксилотрофных базидиомицетов, вызывающих белую гниль листовных пород. В традиционной медицине Китая, Японии и Кореи этот вид широко используется как источник биологически активных добавок с широким спектром действия (Stamets, 1993). Впервые культивирование *G. lucidum* было проведено в Японии и Корее в 80-х годах прошлого столетия (Nanamiya, 1982; по: Seo, Shin, 1995).

Взросший интерес к культивированию базидиом данного вида как источника важных биологически активных веществ определил значимость одного из этапов работы — изучения особенностей чистых культур штаммов *G. lucidum*.

Наши исследования штаммов *G. lucidum* выявили способность чистых культур образовывать атипичные плодовые тела (АПТ), которые не развиваются в типичные базидиомы при поверхностном культивировании на агаризованных средах и постоянном освещении. Базидии и базидиоспоры в этом случае формируются прямо на поверхности АПТ. Аналогичные структуры отмечены в работе Сео и Шин (Seo, Shin, 1995) при исследовании штаммов *G. lucidum* из Кореи и Папуа — Новой Гвинеи.

Поскольку получение базидиом данного ксилотрофного базидиомицета — длительный и трудоемкий процесс, мы сочли возможным разработать более простой способ получения материала для модельных опытов с использованием АПТ.

В данной работе исследовано влияние абиотических факторов — света, аэрации и источников углеродного и азотного питания на образование АПТ и примордиев, а также морфология этих структур у 10 штаммов *G. lucidum* различного географического происхождения. Кроме того, были изучены 2 штамма *G. applanatum* (Pers.) Pat.

Дикариотические штаммы были взяты из коллекции культур кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова (МГУ), НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (табл. 1). Культуры хранили при 2 °С на пшеничном агаре, содержащем опилки листовных пород. Пересевы на свежеприготовленную среду осуществляли 1 раз в год.

Способность к формированию АПТ и примордиев изучали на твердых средах с различными источниками углерода и азота. За исходную брали среду следующего состава (г): 0.5 — MgSO₄, 0.46 — KH₂PO₄, 1 — K₂HPO₄, 2 — пептона, 2 — дрожжевого экстракта, 20 — глюкозы, 20 — агара, 1 л воды (Raudaskoski, Viitanen, 1982). В эксперименте состав среды варьировали, изменяя источники углерода и азота (табл. 2).

Штаммы грибов рода *Ganoderma*, использованные в работе

Штамм	Источник поступления	Год поступления в коллекцию	Место выделения (субстрат)
G.L 1	МГУ	1999	Кавказ (дуб)
G.L 2	НИИ по изысканию новых антибиотиков	1999	Кавказ (бук)
G.L 3		1999	—
G.L 4	Франция	2000	—
G.L 5	США	2001	—
G.L 6	МГУ	2001	Московская обл.
G.L 7	То же	1998	То же
G.L 8	НИИ по изысканию новых антибиотиков	2004	Кавказ
G.L 9		2004	»
G.L927	ВКМП	1961	Австрия
G. APP 926	То же	1930	Великобритания
G.APP 632	» »	1991	—

Примечание. G.L — *G. lucidum*, G.APP — *G. applanatum*. То же для табл. 3—7. Для штаммов субстрат неизвестен, за исключением G.L 1 и G.L 2.

Мицелиальные диски (5 мм в диам.) помещали в чашки Петри, содержащие 25 мл среды, и инкубировали 30 суток при температуре 25 ± 1 °С в термостате без освещения и в камере при постоянном освещении лампами дневного света Philips (1200 лк). Для оценки влияния аэрации часть чашек Петри после инокуляции заклеивали двойным слоем пленки PARAFILM «М». Скорость роста измеряли ежедневно, начиная с 3 суток, в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Морфологию АПТ и примордиев исследовали на временных препаратах с использованием светового микроскопа (СМ) МБР-1 (увел. 80 и 400), СМ Axioskop 40 FL, оснащенного цифровой камерой AxioCam MRC для фотографирования препаратов (увел. 80, 200, 400 и 1000), а также сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Jeol JSM-T300. Препараты для СЭМ готовили следующим способом: кусочки и срезы АПТ и примордиев фиксировали 72 ч в парах осмия (OsO_4), затем сушили в течение 2—3 суток и напыляли золотом.

При изучении влияния кислотности на образование АПТ и примордиев использовали среду 1 с исходным рН 5. Для получения нужных значений рН брали стерильные растворы HCl (1 или 6 М) и NaOH (1 или 6 М); рН доводили до необходимой величины после стерилизации среды во избежание гидролиза и изменения значений кислотности (Roberts, 2004). Оптимальным считалось значение рН, при котором наблюдалась максимальная скорость роста культуры.

Для сравнения формы размеров базидиоспор АПТ и базидиоспор типичных (полностью сформированных) базидиом были получены плодовые тела интенсивным ме-

Таблица 2

Среды, использованные в работе

Варианты сред	Источники азота		Источники углерода	
	пептон (2 г/л)	соевая мука (10 г/л)	глюкоза (20 г/л)	мальтоза (20 г/л)
1	+		+	
2		+		+
3	+			+
4		+	+	

Скорость роста штаммов в зависимости от аэрации и освещенности, мм/сутки

Штамм	На свету		В темноте	
	с аэрацией	без аэрации	с аэрацией	без аэрации
G.L 1	2.4 ± 0.5	5.2 ± 2.4	8.0 ± 2.7	10.1 ± 1.3
G.L 2	10.0 ± 1.0	14.1 ± 2.3	17.3 ± 1.5	23.6 ± 1.7
G.L 3	4.0 ± 1.1	6.5 ± 2.0	9.6 ± 1.3	16.4 ± 1.5
G.L 4	11.0 ± 2.1	14.8 ± 2.6	19.2 ± 2.5	24.7 ± 2.9
G.L 5	18.0 ± 0.5	20.4 ± 3.0	24.3 ± 2.0	26.8 ± 3.2
G.L 6	2.0 ± 0.3	4.5 ± 1.6	8.0 ± 1.3	11.5 ± 2.0
G.L 7	3.1 ± 0.2	4.6 ± 1.2	7.5 ± 1.7	10.5 ± 2.4
G.L 8	14.0 ± 2.4	19.3 ± 2.1	23.1 ± 3.4	27.0 ± 2.1
G.L 9	13.0 ± 1.9	15.0 ± 2.0	20.4 ± 2.1	25.1 ± 1.8
G.L 927	9.2 ± 0.9	13.2 ± 1.8	18.9 ± 1.4	24.3 ± 2.3
G.APP 926	6.3 ± 1.0	12.3 ± 1.8	17.4 ± 2.6	23.2 ± 1.9
G.APP 632	12.1 ± 1.2	15.8 ± 1.9	20.3 ± 2.5	24.6 ± 2.1

тодом (Stamets, 1993). Субстратом для получения посевного мицелия служило зерно пшеницы, которое варили, сушили и смешивали для разрыхления с мелом (1—1.5 %). Подготовленный субстрат раскладывали в стеклянные колбы с ватной пробкой и стерилизовали 30 мин при давлении 1 атм. После охлаждения зерно инокулировали и помещали в термостат при температуре 24—25 °С, периодически встряхивая. В качестве субстрата для получения плодовых тел использовали дубовые опилки и подсолнечную лузгу. Дубовые опилки заливали горячей водой на 24 ч и добавляли пшеничные отруби в пропорции 4 : 1 за 5 ч до подсушивания. Лузгу также замачивали в течение 24 ч. Влажность субстрата составляла 65—70 %. Для разрыхления в субстрат добавляли 1—1.5 % мела. Полипропиленовые пакеты (27 × 12 см) заполняли субстратом на ½ объема, закрывали ватной пробкой и дважды по 30 мин стерилизовали при давлении в 0.5 атм. Инкубацию проводили в термостате при температуре 24—25 °С до полной колонизации субстрата мицелием. Затем пакеты переносили в камеру с регулируемым освещением и температурой 19—24 °С для выгонки плодовых тел.

Условия, способствующие формированию АПТ и примордиев, изучали на изолятах, выращенных на агаризованных средах в течение 30 суток с освещенностью и без

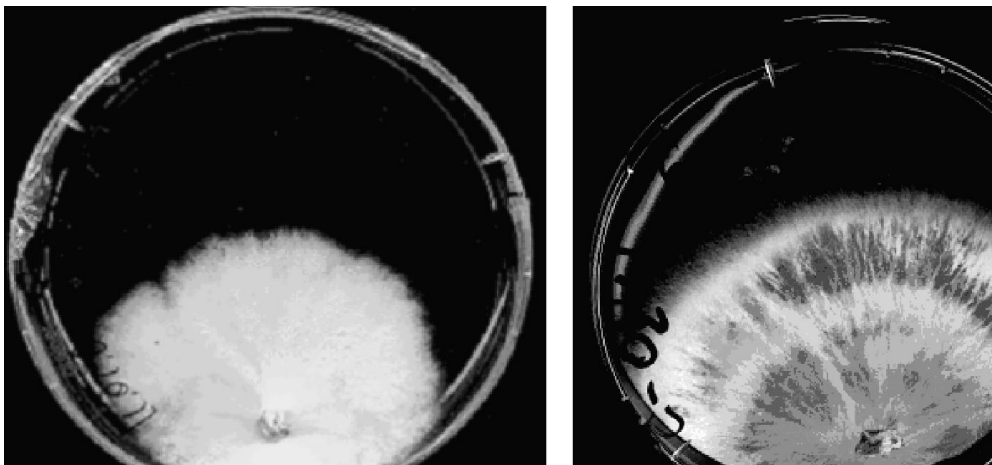


Рис. 1. Рост штамма G.L. 3 на свету (а) и в темноте (б).

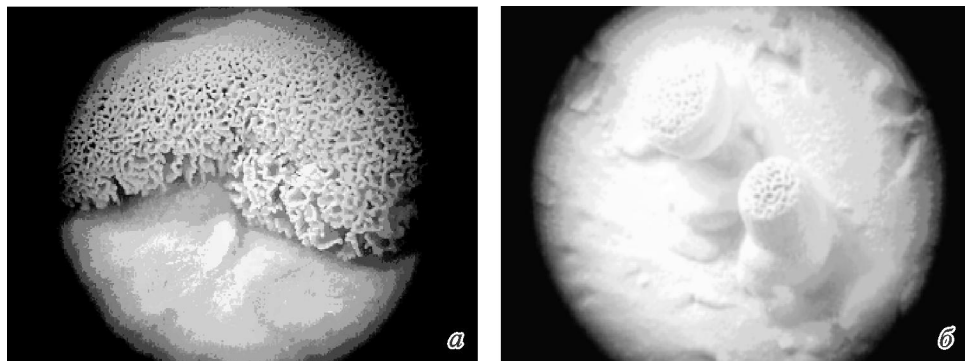


Рис. 2. АПТ штамма G.L 3 (а) и примордии штамма G.L 4 (б).

нее, с аэрацией и при ее отсутствии. Мицелиальный рост всех штаммов ингибировался наличием света и аэрацией (табл. 3). Аэрация приводила к уплотнению мицелиального мата, а отсутствие света — к сильной пигментации (рис. 1). Свет стимулировал формирование коричневых кораллоподобных АПТ на белом или слегка пигментированном мицелии у штаммов G.L 3 и G.L 9 из Кореи и Кавказа соответственно на 7-е и 5-е сутки (рис. 2, а). У остальных штаммов, кроме G.L 6 и G.L 7, наблюдалось образование примордиев на 9—14-е сутки (табл. 4, 5; рис. 2, б). У штамма G.L 1 примордии образовывались только на среде 3 с мальтозой на 10—12-е сутки. У штаммов G.L 6 и G.L 7 из Подмосквья отмечен лишь мицелиальный рост. Базидии и базидиоспоры формировались прямо на поверхности АПТ штаммов G.L 3 и G.L 9 и апикальной части примордиев штаммов G.L 8 и G.L 4 (рис. 2, а, б). Штаммы G.L 1, G.L 2, G.L 5 и G.L 927 базидии не образовывали. У всех штаммов без освещения отмечен только мицелиальный рост вне зависимости от аэрации. Аэрация замедляла мицелиальный рост как в темноте, так и при освещении, но в то же время являлась необходимым условием формирования АПТ и примордиев.

Морфологию АПТ и базидиоспор изучили с помощью светового и сканирующего микроскопов. Оказалось, что АПТ образовали вегетативные и скелетные гифы, а также кутикулярные клетки, которые имеют кораллоподобную форму. Для сравнительного анализа размеров и морфологии базидиоспор были получены типичные плодовые тела (рис. 3) и споровые отпечатки семи штаммов. Результаты анализа приведены в табл. 5.

Базидиоспоры АПТ были меньшего размера, но сходной морфологии, со спорами типичных базидиом. Базидии имели 4 стеригмы. Базидиоспоры коричневые в массе, яйцевидно-эллипсоидальные, на вершине усеченные, с двойной оболочкой. Эндоспо-

Таблица 4

Структуры, образуемые штаммами *Ganoderma lucidum* и *G. applanatum*

Штамм	Структура	Штамм	Структура
G.L 1	ПР	G.L 7	—
G.L 2	ПР + Б	G.L 8	ПР + Б
G.L 3	АПТ + Б	G.L 9	АПТ + Б
G.L 4	ПР + Б	G.L 927	ПР
G.L 5	ПР + Б	G.APP 926	ПР
G.L 6	—	G.APP 632	ПР + Б

Примечание. ПР — примордии, АПТ — атипичные плодовые тела, Б — базидиомы при интенсивном культивировании. То же для табл. 6.

Размер базидиоспор из АПТ и из типичных базидиом

Показатели	G.L 2	G.L 3	G.L 4
Размер спор АПТ, мкм	—	7.6—9.5 × 4.2—4.9	—
Споровый индекс	—	1.8	—
Размер спор базидиом, мкм	9.5—12.1 × 6.5—7.2	8.7—10.2 × 5.6—6.4	10.6—12.4 × 6.9—7.9
Споровый индекс	1.46	1.55	1.53

Таблица 5 (продолжение)

Показатели	G.L 5	G.L 8	G.L 9	G.APP 632
Размер спор АПТ, мкм	—	—	8.3—10.1 × × 4.3—5.2	—
Споровый индекс	—	—	1.9	—
Размер спор базидиом, мкм	11.5—12.9 × × 7.4—9.1	11.7—13.1 × × 7.7—9.1	10.5—12.6 × × 6.4—7.5	6.5—7.1 × × 5.8—6.3
Споровый индекс	1.55	1.52	1.6	1.1

Примечание. Споровый индекс — отношение длины спор к ширине (Seo, Shin, 1995).

рий морщинистый или шиповатый, эписпорий гладкий гиалиновый (рис. 4, 5). Базидиоспоры, полученные из обоих типов плодовых тел на твердой среде, прорастали на 3-и сутки типичным монокариотическим мицелием без пружек. Источники углеродного и азотного питания не оказывали существенного влияния на скорость образования АПТ и примордиев (табл. 6) и способность к их формированию. Лишь для штамма G.L 1 с Кавказа определяющим оказалось наличие в среде мальтозы. На всех средах, использованных в данной работе, АПТ и примордии появлялись в разные интервалы времени (в пределах 7—17 суток), но имели сходную морфологию (табл. 6).

Оптимальные значения pH для мицелиального роста разных штаммов варьировали от 5 до 7 (табл. 7). Культивирование на среде с иными значениями pH ингибировало появление АПТ и примордиев. АПТ и примордии при оптимальных значениях pH появлялись у разных штаммов на 7—10-е сутки. Формирование этих структур задерживалось на трое и более суток при культивировании штаммов на среде, кислотность которой отклонялась от оптимальных значений pH хотя бы на единицу. Происходило ингибирование как мицелиального роста, так и появления АПТ и примордиев при pH больше 7 и меньше 5.

Таблица 6

Скорость формирования АПТ и примордиев (ПР) на разных средах

Штамм	Среда 1/сутки роста	Среда 2/сутки роста	Среда 3/сутки роста	Среда 4/сутки роста
G.L 1	—	—	ПР 10—12	—
G.L 2	ПР 10—12	ПР 9—11	ПР 14—16	ПР 12—14
G.L 3	АПТ 7—10	АПТ 7—9	—	—
G.L 4	ПР 10—12	ПР 14—16	ПР 14—17	ПР 11—13
G.L 5	ПР 8—11	ПР 10—14	ПР 14—16	ПР 9—10
G.L 8	ПР 10—12	ПР 7—9	ПР 10—12	ПР 12—16
G.L 9	АПТ 5—10	АПТ 8—12	АПТ 7—10	АПТ 10—12
G.L 927	ПР 14—16	ПР 11—13	ПР 14—15	ПР 14—16
G. APP 926	ПР 14—16	ПР 17—20	ПР 14—16	—
G. APP 632	ПР 9—12	ПР 14—16	ПР 15—17	ПР 20—22

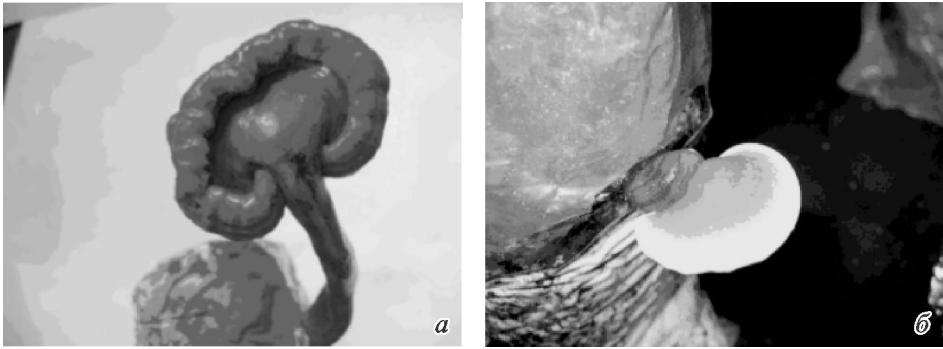


Рис. 3. Типичные базидиомы штаммов G.L 5 (а) и G.L 8 (б).

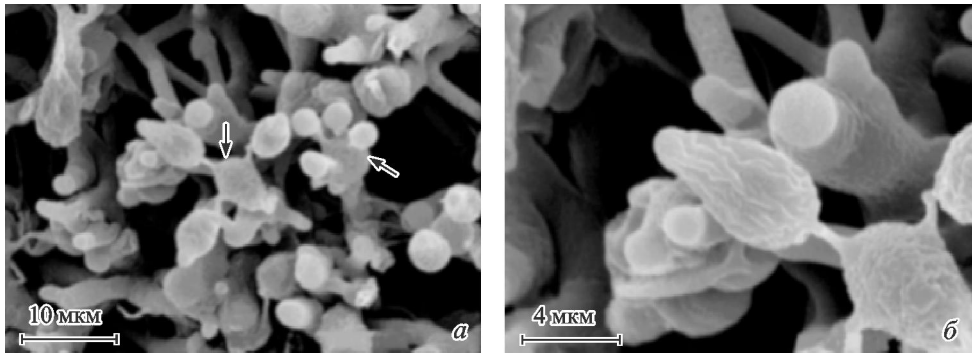


Рис. 4. Базидии (а) и базидиоспоры (б) АПТ штамма G.L 3 (СЭМ).

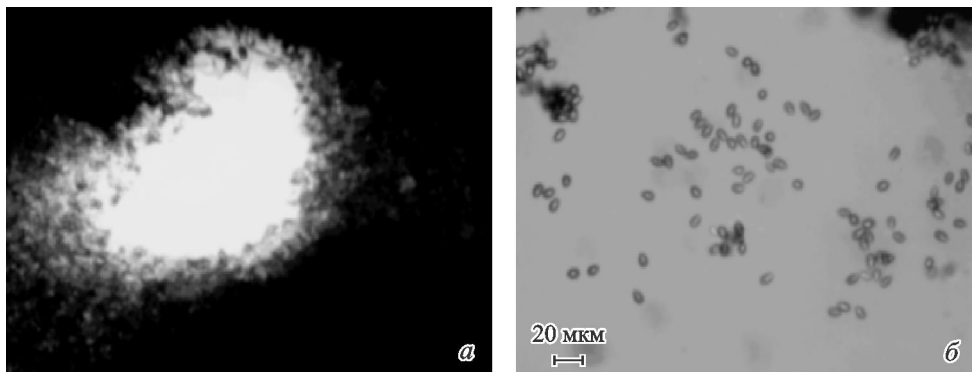


Рис. 5. Базидиоспоры АПТ G.L 3 (а) и G.L 9 (б). AxioCam MRc.

Оптимальные значения pH для мицелиального роста штаммов
Ganoderma lucidum и *G. applanatum*

Штамм	Значения pH	Штамм	Значения pH
G.L 1	6	G.L 7	5
G.L 2	6	G.L 8	5
G.L 3	5	G.L 9	5
G.L 4	5	G.L 927	6
G.L 5	5	G.APP 926	5
G.L 6	5	G.APP 632	7

Базидии и базидиоспоры высших базидиальных грибов формируются либо на гимениальных пластинках (у большинства агарикоидных базидиомицетов), либо в трубочках (у афиллофороидных базидиомицетов). Однако на искусственных средах развитие базидий и базидиоспор может происходить в гимениальном слое, сформированном прямо на мицелии без формирования плодовых тел. Такое явление было описано для *Crinipellis perniciososa* (Griffith, Hedger, 1993), *Ganoderma lucidum* (Seo, Shin, 1995), *Ceratobasidium* sp. (Uchida et al., 1986), *Lyophyllum tylicolor* (Yamanaka, Sagara, 1990) и др.

В нашей работе также установлено, что для двух штаммов *G. lucidum* характерно образование базидий и базидиоспор помимо формирования типичных плодовых тел. Освещенность и аэрация стимулируют образование АПТ и примордиев. Способность к формированию АПТ является штаммовым признаком и не зависит от состава агаризованной среды, значений pH и возраста колоний. АПТ сформированы вегетативными и скелетными гифами и кутикулярными клетками, что полностью согласуется с данными более ранних работ по морфологии базидиом *G. lucidum* (Бондарцева, 1998; Moncalvo, 2000; Гарибова и др., 2003). Базидии формируются из генеративных гиф на поверхности АПТ или апексах примордиев. Образуются базидиоспоры, характерные для вида, но их размеры на 10—20 % меньше спор, полученных от типичных базидиом. Исследованные штаммы *G. applanatum* атипичных плодовых тел не формировали.

Изученные источники углеродного и азотного питания не оказывают влияния на скорость образования примордиев и не влияют на способность к их формированию. Свет и аэрация — необходимые условия развития исследуемых структур. Отклонение значений pH от оптимальных оказывает ингибирующее действие на появление АПТ и примордиев. Базидиоспоры, образовавшиеся на поверхности АПТ, жизнеспособны.

Полученные данные имеют существенное значение для использования штаммов в модельных опытах, так как открывают простой и доступный способ получения материала для различных лабораторных исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-04-00492-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бондарцева М. А. Определитель грибов России. Вып. 2: Пор. Афиллофоровые. СПб.: Наука, 1998. 390 с.

Гарибова Л. В., Антимонова А. В., Завьялова Л. А., Краснопольская Л. М. Рост и морфологические признаки мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* в зависимости от условий культивирования // Микология и фитопатология. 2003. Т. 37, вып. 3. С. 14—19.

Griffith G. M., Hedger J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciososa* using a bran-vermiculite medium // Europ. J. Plant Pathol. 1993. Vol. 99, N 4. P. 227—230.

Moncalvo J. M. Systematics of *Ganoderma* // *Ganoderma Disease of Perennial Crops*. CABI Publishing, 2000. P. 23—52.

Raudaskoski M., Viitanen H. Effect of aeration and light on fruit body induction in *Schizophyllum commune* // *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 1982. Vol. 78. P. 89—96.

Roberts L. M. Australian *Ganoderma*: Identification, growth and antibacterial properties. 2004. P. 51.

Seo G. S., Shin G. C. Formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum* isolates on a nutrient agar medium // *Mycoscience*. 1995. Vol. 36. P. 1—7.

Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 1993. P. 335—337.

Uchida J. Y., Aragaki M., Yahata P. S. Basidiospore formation by *Ceratobasidium* sp. on agar // *Mycologia*. 1986. Vol. 78. P. 587—592.

Yamanaka T., Sagara N. Development of basidia and basidiospores from slide cultured mycelia in *Lyophyllum tylicolor* (Agaricales) // *Mycol. Res.* 1990. Vol. 94. P. 847—850.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова
insarovaid@mail.ru

Поступила 5 XII 2008

Р Е З Ю М Е

В различных географических регионах были собраны *Ganoderma lucidum* (10 штаммов) и *G. applanatum* (2 штамма), у которых протестировано образование атипичных плодовых тел (АПТ) и примордиев. Исследовано влияние освещенности, аэрации и значения pH агаризованной среды на формирование этих структур. АПТ появлялись на поверхности мицелия, базидии и жизнеспособные базидиоспоры образовывались на АПТ и апексах примордиев. Базидиоспоры АПТ были мельче базидиоспор, образовавшихся на типичных плодовых телах, но их морфологические характеристики были идентичны. Эти результаты позволяют быстро получить генетический материал непосредственно на чашках Петри, минуя трудоемкий и длительный процесс выгонки плодовых тел.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, атипичные плодовые тела (АПТ), абиотические факторы, состав среды, базидиоспоры.

S U M M A R Y

Total of 10 strains of *Ganoderma lucidum* and 2 strains of *G. applanatum* collected from various geographical regions were tested for the formation of atypical fruiting structures (AFS) and fruit body primordia. Effects of light, aeration and pH level on the formation of these structures on nutrient agar media were investigated. Brown AFS appeared on the white mycelial colony, basidia and basidiospores were produced on the external side of the AFS and on the apices of some primordia. AFS basidiospores were smaller than basidiospores from normally formed fruit body, but their other morphological characteristics were almost the same. The data are important for the model investigations and breeding practice.

Key words: *Ganoderma lucidum*, atypical fruiting structures (AFS), abiotic factors, medium composition.

УДК 582.244.2 : 581.15(471.343)

© С. А. Шейн, Д. И. Милютина, И. Н. Козловская, Е. В. Морозова,
М. А. Побединская, С. Н. Еланский

ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ

SHEIN S. A., MILYUTINA D. I., KOZLOVSKAYA I. N., MOROZOVA E. V.,
POBEDINSKAYA M. A., ELANSKY S. N. GENOTYPIC DIVERSITY OF *PHYTOPHTHORA*
INFESTANS ISOLATES FROM MARI EL

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary — возбудитель фитофтороза картофеля и томата — уже более полутора столетий привлекает пристальное внимание исследователей из разных стран. Внезапно появившийся в Европе в середине XIX столетия патоген вызвал эпифитотию фитофтороза картофеля, оставшуюся в памяти многих поколений.

На территории России фитофтороз встречается практически во всех регионах, занимающихся производством картофеля и томата. Нашими предыдущими исследованиями показано, что структура популяций возбудителя фитофтороза в разных регионах России различается (Elansky et al., 2001; Аманханова и др., 2004; Elansky, Smirnov, 2003). Так, популяции, распространенные на территории сибирской и дальневосточной частей России, состоят из ограниченного числа клонов, генетический обмен между которыми крайне редок. В то же время популяции Московской обл. и Северного Кавказа отличаются очень высоким генотипическим разнообразием, практически каждый штамм имеет свой уникальный генотип. Популяции *P. infestans* исследованы на территории Центрального, Северо-Кавказского, Северо-Западного и некоторых других регионов европейской части России. В то же время практически нет данных о структуре популяции в среднем и нижнем Поволжье, хотя в этом регионе не только интенсивно возделывается картофель, но и базируются крупные семеноводческие компании, реализующие семенные клубни во многих регионах Центральной России.

В предлагаемой работе впервые представлены результаты исследования популяций возбудителя фитофтороза картофеля и томата в Республике Марий Эл. Для сравнительного анализа использовали набор независимых маркерных признаков, включающих тип спаривания, генотипы локусов *Per-1* и *Per-2*, гаплотип митохондриальной ДНК и анализ микросателлитных повторов. Все изученные изоляты протестированы на устойчивость к фунгицидам — манкоцебу и металаксилу, проведено изучение вирулентности к образцам картофеля с различными генами устойчивости.

Материал и методы

Сбор пораженных фитофторозом образцов проводили в 2007 г. в окрестностях г. Йошкар-Ола с посадок картофеля и томата. Брали не более одного образца с одного

растения; по возможности на поле выбирали растения, отстоящие друг от друга не менее чем на 10 м.

Выделение изолятов *P. infestans* из пораженных фитофторозом органов растений (листьев, плодов, стеблей, клубней) проводили в лабораторных условиях с использованием метода влажных камер. Всего из собранных фитофторозных образцов было выделено в чистую культуру 44 изолята.

Определение типов спаривания проводили методом попарного сращивания исследуемого изолята с тестерными штаммами известных типов спаривания (A1 либо A2) на агаризованной овсяной среде.

Определение вирулентности к сортам-дифференциаторам с различными генами устойчивости, полученными из Международного картофельного центра в Лиме (Перу), проводили по методике, описанной в работе Ф. Х. Ахматхановой с соавторами (2004). Исследовали вирулентность к образцам с генами R1—R11.

Спектр изоферментов определяли на целлюлозоацетатных гелях согласно рекомендации производителя Helena Laboratories Inc. с небольшими модификациями (Elansky, Smirnov, 2003).

Гаплотипы митохондриальной ДНК идентифицировали согласно методике, разработанной Гриффит и Шоу (Griffith, Shaw, 1998). Продукты амплификации разделяли в 0.8%-м агарозном геле, продукты рестрикции — в 1.5%-м. Гели готовили на трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия.

Анализ микросателлитных повторов (SSR) проводили с помощью праймеров на locus Pi4G F: 5'-CGCTGTGTGGATGACAAGTA и R: 5'-TCGACCTGACATACGAGCTA. После электрофоретического разделения продуктов амплификации исследованных образцов были выявлены несколько фрагментов различной длины. Для анализа в настоящей работе были выбраны два фрагмента, четко видимые и легко идентифицируемые при анализе ПЦР-продуктов всех исследуемых изолятов. Первый фрагмент длиной около 160 пн был обозначен как L, второй (около 295 пн) — как H. Среди исследованных штаммов были выявлены как несущие оба фрагмента (генотип LH), так и один из фрагментов (генотипы L и H).

Определение устойчивости к манкоцебу и металаксилу проводили на овсяной агаризованной среде с добавлением фунгицида в концентрациях 1, 10 и 50 мг⁻¹. На основании полученных данных по относительной скорости роста вычисляли показатель EC₅₀ — концентрацию фунгицида, ингибирующую рост мицелия анализируемого изолята на 50 %.

Кодировку генотипов проводили в двоичной системе, с учетом порядка следования признаков: знаки 1 и 2 — типы спаривания 10-A1, 01-A2; 3 и 4 — генотипы локуса пептидазы Pep-1: 00 — 100/100, 10 — 92/100; 5 и 6 — генотипы локуса пептидазы Pep-2: 00 — 100/100, 01 — 100/112, 11 — 112/112; 7 и 8 — генотипы SSR: 10 — L, 01 — H, 11 — LH; знаки 9 и 10 — гаплотип митохондриальной ДНК: 10 — 1a, 01 — 2a.

Результаты и обсуждение

У штаммов, выделенных с плодов томата, соотношение типов спаривания было близким — A1 : A2 = 43 : 57, а у штаммов с листьев картофеля доля типа спаривания A2 была значительно больше (75 %), чем A1 (25 %). Штаммы, образующие ооспоры с обоими тестерными штаммами (A1A2), не были выявлены. Три изолята не образовали ооспор ни с одним из тестерных штаммов.

Изучение изоферментов пептидазы показало, что по локусу Pep-1 у всех марийских изолятов спектр соответствовал 100/100, кроме одного, выделенного с картофеля, который имел генотип 92/100. По локусу Pep-2 разнообразие оказалось шире: 26 изолятов имели спектр 100/100 (50 %), 9 изолятов — 100/112 (17 %) и 17 — 112/112 (33 %). Интересно, что среди штаммов, выделенных с картофеля, не было выявлено ни одного с генотипом 112/112 по локусу Pep-2, в то время как их было довольно много среди «томатных» штаммов.

Таблица 1

**Генотипический состав популяций *Phytophthora infestans*
из Марий Эл по 5 маркерным признакам**

Номер	Кодировка генотипа	Доля штаммов с указанным генотипом в популяции, %	
		на картофеле	на томате
1	1000001010	10	3
2	1000001110	0	3
3	1000011001	10	3
4	1000111001	0	3
5	1000110110	0	23
6	1000111110	0	6
7	0100001010	10	44
8	0100010101	0	3
9	0100011001	30	3
10	0100011010	0	3
11	0100110110	0	3
12	0100111001	0	3
13	0100001001	40	0
Всего проанализировано изолятов		10	34

Анализ микросателлитных повторов марийских изолятов показал присутствие в популяции трех различающихся по этому признаку типов штаммов, несущих генотипы L, L + H и H. Доля штаммов с генотипом L составляла 100 % на картофеле и 65 % на томате, доля H — 29 %, L + H — 6 % на томате.

Доля изолятов с гаплотипом митохондриальной ДНК Ia составляла 89 % среди выделенных с картофеля и 18 % с томата, IIa — 11 и 82 % соответственно. Таким образом, применение этого маркера показало существенные различия между «картофельной» и «томатной» популяциями. Штаммы с другими гаплотипами не были выявлены.

Анализ генотипической структуры показал высокое разнообразие в популяциях *Phytophthora infestans*, выделенных как с картофеля, так и с томата. Среди штаммов с картофеля идентифицировано 5 генотипов (проверено 10 изолятов), а среди выделенных с томата — 12 генотипов (проверено 34 изолята). Всего среди штаммов, выделенных в Марий Эл, было выявлено 13 генотипов (табл. 1). Большее разнообразие «томатной» популяции объясняется, видимо, большим объемом выборки. Так, генотипы № 2, 4, 8, 10, 11 и 12, отмеченные у единичных «томатных» изолятов, не обнаружены среди «картофельных». Однако генотип № 5, выявленный у 8 томатных изолятов, не обнаружен у «картофельных», а № 13, найденный у 4 из 10 «картофельных», не обнаружен у «томатных».

Все изоляты из Марий Эл отличались низкой устойчивостью к металаксилу; показатель EC_{50} варьировал от 0.5 до 4 млн⁻¹, причем у большинства штаммов он не превышал 1 млн⁻¹.

Устойчивость штаммов *P. infestans* к манкоцебу варьировала почти в 50 раз: значения показателя EC_{50} для разных образцов различались от 0.527 до 27 млн⁻¹. Сильные вариации значения EC_{50} были выявлены как среди «картофельных», так и среди «томатных» штаммов, хотя большая часть изолятов с повышенным уровнем устойчивости была выделена с плодов томата. Сравнительный корреляционный анализ значений EC_{50} по металаксилу и манкоцебу взаимосвязи двух этих параметров не выявил ($r_s=0.0686$, $P=0.6256$, $n=53$).

Средняя устойчивость к манкоцебу для групп штаммов с разными мультилокусными генотипами варьировала от 2.5 до 27 млн⁻¹ (табл. 2). Для большинства генотипов EC_{50} не превышала 10 млн⁻¹. Только у двух генотипов (№ 2 и 5) наблюдался высокий уровень устойчивости — 27 и 14.3 млн⁻¹ соответственно. Однако если к перво-

Таблица 2

Устойчивость штаммов *Phytophthora infestans* с различными генотипами к манкоцебу и металаксилу

Номер	Кодировка генотипа	Уровень устойчивости EC ₅₀ , млн ⁻¹	
		манкоцеб	металаксил
1	1000001010	2.5	1.3
2	1000001110	27	0.6
3	1000011001	6.3	0.6
4	1000111001	6.8	0.6
5	1000110110	14.3	0.6
6	1000111110	7.7	0.6
7	0100001010	4.5	0.7
8	0100010101	6.5	1.1
9	0100011001	3.7	0.5
10	0100011010	н/д	0.5
11	0100110110	4.4	2.5
12	0100111001	5.3	0.5
13	0100001001	7.1	0.6
Среднее для всех генотипов		7.3	0.7

му генотипу принадлежал только один исследованный штамм (самый устойчивый из всех проверенных), то ко второму — 8 штаммов, большинство из которых обладали высоким уровнем устойчивости. Присутствие штаммов с высоким значением EC₅₀, вероятно, связано с интенсивным применением манкоцеба в сельскохозяйственных областях страны. Поскольку резистентность к мультисайтовым препаратам контролируется большим числом слабоекспрессивных генов, приобретение устойчивости происходит постепенно, а не скачкообразно, что подтверждают данные этого исследования. Вероятно, у устойчивых штаммов постепенно происходило накопление мутаций и шел отбор механизмов, обеспечивающих устойчивость к манкоцебу.

В исследованных популяциях преобладали сложные расы с числом генов вирулентности, близким к максимальному. Все изоляты были протестированы на вирулентность к 11 генам устойчивости картофеля. Средняя вирулентность «картофельных» штаммов составляла 9.4, «томатных» — была несколько ниже (8.9). Гены R1, R2, R3 были отмечены у всех исследованных штаммов. Наиболее редкими оказались R5 и R9, остальные гены встречались практически у всех протестированных штаммов (табл. 3). Это совпадает с результатами исследований, выполненных для других регионов России (Elansky et al., 2001; Аманханова и др., 2004).

Проведенные исследования показывают, что популяции *P. infestans* из Марий Эл, как и популяции из других частей Европейской России, Белоруссии (Пляхневич, Еланский, 2008), Западной Европы, отличаются высоким генотипическим и фенотипическим разнообразием. В них обнаружены изоляты с A1 и A2 типами спаривания, все три возможных аллельных состояния (две гомозиготы и гетерозигота) по локусу

Таблица 3

Частота отдельных генов вирулентности в исследованных популяциях *Phytophthora infestans* из Марий Эл

Популяции	Гены вирулентности										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Картофель	100	100	100	100	64	91	100	82	10	100	91
Томаты	100	100	100	89	50	94	94	78	10	83	94

Рер-2, разные генотипы мтДНК и микросателлитных повторов. Генотипический анализ, проведенный на основании комплекса независимых маркерных признаков, выявил 5 генотипов среди 10 исследованных штаммов, выделенных с картофеля, и 12 — среди 34, выделенных с томата. Особо следует отметить наличие генотипов, распространенных только среди «томатных» или только среди «картофельных» штаммов.

Отдельного внимания заслуживают результаты, показывающие высокие различия в уровне устойчивости штаммов к манкоцебу, поскольку это один из наиболее популярных в России фунгицидов, широко используемый как отдельно, так и в смесевых препаратах и на картофеле, и на томате. Появление высокоустойчивых штаммов в среднем Поволжье, где сосредоточены многие семеноводческие хозяйства, может способствовать их быстрому распространению в других регионах России с семенным материалом.

Таким образом, исследования, проведенные нами в последние годы в разных регионах европейской части России и в Белоруссии, показывают повсеместное высокое внутрипопуляционное генотипическое разнообразие. Практически во всех популяциях встречаются штаммы обоих типов спаривания, несущие близкое к максимальному число генов вирулентности, которые различаются по уровню устойчивости к металаксилу и манкоцебу. В пораженных образцах часто присутствуют ооспоры (В. П. Апрышко, личное сообщение). Высокое генотипическое разнообразие может объясняться разными причинами, среди которых могут иметь место интенсивный обмен семенным материалом, хорошие условия для миграции спорангиев в атмосфере, гибридизация при образовании ооспор.

Работа выполнена при поддержке МНТЦ (проект № 3440).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аматханова Ф. Х., Дьяков Ю. Т., Петрунина Я. В., Побединская М. А., Еланский С. Н., Козловская И. Н., Козловский Б. Е., Морозова Е. В., Смирнов А. Н. Популяции *Phytophthora infestans* на Северном Кавказе // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38, вып. 3. С. 71—78.

Пляхневич М. П., Еланский С. Н. Генотипический анализ белорусских штаммов возбудителя фитофтороза картофеля // Матер. II Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». СПб., 2008. С. 79—83.

Elansky S. N., Smirnov A. N. Second locus of Peptidase as a marker for genetic investigations of *Phytophthora infestans* // Botanica Lithuanica. 2003. Vol. 9 (3). P. 275—283.

Elansky S. N., Smirnov A. N., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozlovskiy B., Koslovskaya I., Russo P., Smart C., Dry W. Genotypic analysis of Russian *Phytophthora infestans* isolates from the Moscow region, Siberia and Far East // J. Phytopathol. 2001. Vol. 149. P. 605—611.

Griffith G. W., Shaw D. S. Polymorphism in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure culture or from host lesion // Appl. Env. Microbiol. 1998. Vol. 64, N 10. P. 4007—4014.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

ВНИИ фитопатологии
Московская область
diakov@herba.msu.ru

Поступила 22 XII 2008

Р Е З Ю М Е

У изолятов *Phytophthora infestans*, выделенных в 2007 г. в Республике Марий Эл, был проанализирован комплекс независимых маркерных признаков, включающий тип спаривания, спектр изоферментов двух локусов пептидазы, гаплотип митохондриальной ДНК, генотипы

микросателлитных повторов. На основании результатов тестирования признаков этого комплекса для каждого исследованного штамма был составлен мультилокусный генотип.

С помощью анализа генотипической структуры было выявлено высокое разнообразие в популяциях *P. infestans*, выделенных как с картофеля, так и с томата. Среди штаммов, выделенных с картофеля, идентифицировано 5 генотипов (проверено 10 изолятов), а среди выделенных с томата — 12 генотипов (проверено 34 изолята). Выявлены генотипы, встречающиеся только среди «картофельных» или только среди «томатных» штаммов.

Все штаммы также были протестированы на устойчивость к фунгицидам — металаксилу и манкоцебу. Все изоляты из Марий Эл отличались низкой устойчивостью к металаксилу, показатель EC_{50} варьировал от 0.5 до 4 млн⁻¹, причем у большинства штаммов он не превышал 1 млн⁻¹. Устойчивость штаммов *P. infestans* к манкоцебу варьировала почти в 50 раз: значения показателя EC_{50} для разных образцов составляли от 0.527 до 27 млн⁻¹. Сильные вариации значения EC_{50} были выявлены как среди «картофельных», так и среди «томатных» штаммов, хотя большая часть изолятов с повышенным уровнем устойчивости была выделена с плодов томата.

Все изоляты были протестированы по вирулентности к образцам картофеля с 11 генами устойчивости. В исследованных популяциях преобладали сложные расы с числом генов вирулентности, близким к максимальному. Средняя вирулентность «картофельных» штаммов составила 9.4, «томатных» — 8.9. Гены R1, R2, R3 были отмечены у всех исследованных штаммов. Наиболее редкими оказались гены R5 и R9, остальные встречались практически у всех протестированных штаммов.

Ключевые слова: болезни картофеля, фитофтороз, генотипический анализ, манкоцеб, устойчивость к фунгицидам.

S U M M A R Y

Phytophthora infestans strains collected from the Mari El during 2007 were analyzed on the mating types, resistance to fungicides metalaxyl and mankozeb, isozyme loci Pep-1, Pep-2, haplotypes of mitochondrial DNA, microsatellite (SSR) genotypes. High level of genotypic and phenotypic diversity was mentioned in populations from tomato and potato. Mating types A1 and A2 were in comparative ratio in populations from tomato, and A2 prevailed in population from potato. At locus Pep-1 the genotype 100/100 prevailed, the frequency of heterozygote 92/100 was very low (only 1 isolate from potato). At locus Pep-2 genotype 100/100 also prevailed, but 112/112 and heterozygote 100/112 occurred often, too. Mitochondrial haplotypes IIa and Ia occurred populations, other described haplotypes were not found. There were several multilocus genotypes, identified on potato or tomato only.

Complex potato races predominated in all studied populations, virulence genes R1—R4, R7, R8, R10 and R11 were often, R5 and R9 were rare. Majority of tested isolates were sensitive to metalaxyl (EC_{50} different from 10.5 to 4 ppm). Resistance to another fungicide, mankozeb, varied about 50 times, EC_{50} differed from 0.5 to 27 ppm.

Key words: potato diseases, late blight, *Phytophthora infestans*, fungicide resistance, genotypic analysis, mankozeb.

**ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ,
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

УДК 582.288 : 581.144.1

© А. А. Васильева, Л. Н. Чекунова, А. В. Полякова

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
HORMOCONIS RESINAE И *PHIALOPHORA* SP.,
РАЗВИВАЮЩИХСЯ В АВИАЦИОННОМ ТОПЛИВЕ**VASILYEVA A. A., CHEKUNOVA L. N., POLYAKOVA A. V. EFFECTS OF THE
TEMPERATURE ON THE GROWTH AND THE VIABILITY OF *HORMOCONIS RESINAE*
AND *PHIALOPHORA* SP. DEVELOPED IN AVIATION FUEL

В последние несколько десятилетий в нашей стране не уделялось должного внимания проблеме биоповреждения авиационного топлива и материалов топливных баков. Тем не менее данная тема остается актуальной и в настоящее время. Жизнеспособность грибов и бактерий, развивающихся за счет углеводов авиационного топлива, может приводить к ухудшению его качества, усилению коррозии металлических баков, засорению фильтров биомассой и, наконец, опасности возникновения аварий.

Одним из наиболее важных вопросов, касающихся проблемы биоповреждения авиационного топлива, является влияние температуры на рост и жизнеспособность грибов, развивающихся за счет топлива. В последние годы увеличились поставки российской авиационной техники в страны с тропическим и субтропическим климатом. Этот факт требует постоянных исследований в области влияния температуры на рост и развитие микроорганизмов. В процессе полета топливо может охлаждаться до довольно низких температур, а при длительной стоянке самолета в условиях жаркого климата нагреваться до 60—70 °С. Кроме того, имеет значение время перелетов и длительность стоянок.

Реакция грибов, развивающихся за счет углеводов авиационного топлива, на перепады температуры может быть крайне разнообразной и зависит от физиологических свойств грибов. Известно, что оптимальная температура для развития большинства плесневых грибов, в том числе и поражающих нефтепродукты, находится в интервале 24—30 °С (Благник, Занова, 1965; Atlas, 1975).

Литературных данных о выживаемости микромицетов в авиационном топливе при отрицательных температурах довольно мало. Споры штаммов *Aspergillus fumigatus*, выделенных из топлива сверхзвуковых самолетов, выживают при температурах до -32 °С (Scott, Forsyth, 1976; Thomas, Hill, 1977; Каневская, 1984). Согласно другому источнику (Билай, Коваль, 1980), некоторые виды родов *Aspergillus* и *Cladosporium* способны выживать при охлаждении до -196 °С.

Сведений об устойчивости грибов в авиационном топливе к высоким положительным температурам также немного. Существуют данные, что некоторые штаммы *Hormoconis resiniae* способны развиваться в топливе при температуре 50 °С, а штаммы *Aspergillus fumigatus* выживают в авиационном керосине до 80 °С (Scott, Forsyth, 1976; Thomas, Hill, 1977; Каневская, 1984).

Материал и методы

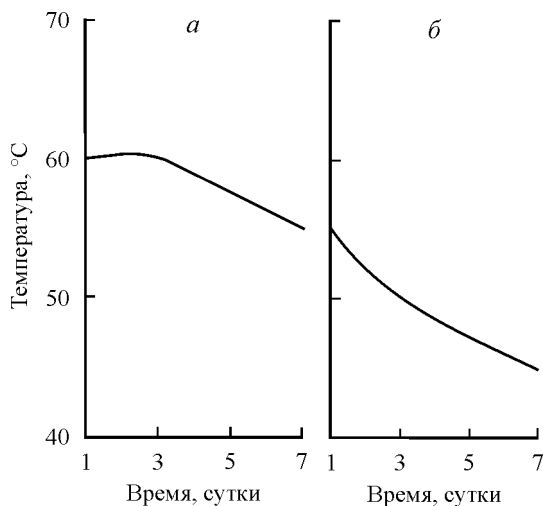
В данной работе были использованы грибы *Hormoconis resiniae* (Lindau) Arx et G. A. De Vries и *Phialophora* sp., выделенные нами ранее из загрязненной фильтрационной системы самолета. Для проведения опытов готовили водные суспензии спор грибов из двухнедельных культур. С помощью добавления стерильной воды добивались примерно равной концентрации спор в суспензиях обоих грибов в камере Горяева.

Влияние положительных температур на микромицеты изучали в диапазоне от 9 до 70°, отрицательных — при –20 и –57 °С. Исследовали активность роста микромицетов при –20, 9, 18, 28 и 36 °С. В пробирки разливали по 3 мл авиационного топлива и 3 мл минеральной среды, добавляли 0.5 мл споровой суспензии штаммов *Hormoconis resiniae* или *Phialophora* sp. и помещали их в термостаты с соответствующей температурой на необходимый срок. Признаки роста грибов оценивали визуально по 5-балльной шкале. Для изучения жизнеспособности данных штаммов при экстремальных положительных (начиная с 40 °С и выше) и отрицательных (–57 °С) температурах вместо авиационного керосина с минеральной средой использовали жидкое сусло в целях обеспечения безопасности эксперимента.

После выдерживания пробирок в термостатах из них проводили высев спор в чашки Петри со свежим сусло-агаром. Далее чашки помещали в термостат с температурой 28 °С и проверяли рост грибов через каждые 3—4 суток.

Результаты и обсуждение

Для изучения влияния температуры на рост и жизнеспособность микромицетов штаммы *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. были выбраны не случайно. Оба вида преобладали в количественном отношении по сравнению с другими видами грибов в исследуемом нами образце пораженного топлива. Кроме того, повторная инокуляция стерильного топлива суспензией спор выделенных грибов показала, что штаммы *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. способны к активному развитию за счет углеводов авиационного топлива. Если гриб *Hormoconis resiniae* довольно часто выделяли из образцов пораженного топлива, то *Phialophora* sp. был выделен из авиационного топлива впервые. Интересен тот факт, что штамм *Phialophora* sp. по скорости



Область жизнеспособности штаммов *Hormoconis resiniae* (а) и *Phialophora* sp. (б) при положительных экстремальных температурах.

Жизнеспособность микромицетов при экстремальных температурах

Вид гриба	Время, сутки	Температура, °С							
		-57	-20	40	45	50	55	60	70
<i>Hormoconis resiniae</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	—
	3	+	+	+	+	+	+	+	—
	7	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>Phialophora</i> sp.	1	+	+	+	+	+	+	—	—
	3	+	+	+	+	+	—	—	—
	7	+	+	+	+	—	—	—	—

Примечание. «+» — сохранение, «—» — отсутствие жизнеспособности. Отмечен рост грибов в термостате при 40 и 45 °С.

роста превосходит *Hormoconis resiniae*. Поэтому особое внимание уделялось сравнению реакции этих двух грибов на изменения температурного режима.

Исследования показали, что штаммы *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. остаются жизнеспособными при -20° в топливе и -57 °С в жидком сусле в течение 1, 3 и 7 суток (табл. 1). После размораживания пробирок и посева из них инокулята на питательные среды оба штамма образовывали новые колонии в течение уже первых 5 суток. Таким образом, нижняя температурная граница выживаемости этих видов остается пока неизвестной.

Наиболее активный рост *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. на авиационном топливе был отмечен при температуре 28 °С (табл. 2). У *Hormoconis resiniae* признаки роста проявились позже, чем у *Phialophora* sp. При увеличении или снижении температуры отмечено снижение активности роста обоих грибов.

Что касается высоких положительных температур, то здесь штаммы *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. отличались по своей жизнеспособности (табл. 1; см. рисунок). При температурах 40 и 45 °С наблюдался рост обоих штаммов еще во время выдерживания в термостате. Особенно обильный рост штамма *Hormoconis resiniae* отмечен при температуре 40 °С, чуть менее активным был штамм *Phialophora* sp. Таким образом, *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. не только остаются жизнеспособными при данных температурах, но и активно развиваются. При температуре 50 °С и выше рост *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. во время выдерживания в термостате не наблюдался. Однако споры штамма *Hormoconis resiniae* оказались жизнеспособными

Таблица 2

Рост микромицетов в топливе при положительных температурах (в баллах)

Вид гриба	Время проявления признаков роста, сутки	Температура, °С			
		9	18	28	36
<i>Hormoconis resiniae</i>	7	0	0	0	0
	14	0	1	2	0
	21	1	2	3	1
<i>Phialophora</i> sp.	7	0	0	2	0
	14	1	2	4	2
	21	2	2	4	3

Примечание. 0 — отсутствие признаков роста, 1 балл — помутнение водного слоя, образование осадков, 2 балла — появление мелких хлопьев в водном слое, 3 — появление крупных хлопьев в водном слое, 4 — образование небольших сгустков, 5 баллов — образование крупных сгустков.

при 50 и 55 °С в течение 1, 3 и 7 суток. При высеве спор *Hormoconis resiniae* из опытных пробирок на питательные среды спустя 5—7 суток образовывались новые колонии, в пробирках с жидким сушлом после перенесения в термостат с температурой 28 °С также наблюдалось образование мицелия через 7 суток. Верхней границей для развития штамма *H. resiniae* оказалась температура 60 °С. После содержания при данной температуре в течение 1 и 3 суток споры *H. resiniae* образовывали новый мицелий как при высеве на среду, так и в пробирках, перенесенных в термостат с температурой 28 °С. Однако при выдерживании пробирок со штаммом *H. resiniae* в течение 7 суток при 60 °С споры погибали, рост не отмечен как при посевах на питательные среды, так и в пробирках после переноса в термостат с температурой 28 °С.

Штамм *Phialophora* sp. оказался менее устойчивым к влиянию высоких положительных температур. Гриб образовывал новые колонии только после 1 и 3 суток выдерживания при 50° и полностью терял жизнеспособность, находясь при этой температуре 7 суток. Для штамма *Phialophora* sp. верхняя температурная граница оказалась 55 °С. Только после выдерживания в течение суток споры гриба при высеве на среду прорастали единичными колониями в течение 7 суток, а в пробирках при температуре 28 °С наблюдалось довольно скудное образование мицелия на 7—9-е сутки. При более длительном выдерживании *Phialophora* sp. (3 и 7 суток) споры оказались нежизнеспособными при температуре 55 °С и погибали через 1, 3 и 7 суток при 60°.

После суточного нахождения при температуре 70 °С споры штаммов *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. погибали.

Таким образом, штамм *Hormoconis resiniae* сохраняет жизнеспособность в температурном диапазоне от –57 до 60 °С, а штамм *Phialophora* sp. — от –57 до 55 °С. Проведенное исследование касается физиологических свойств только исследуемых штаммов *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. Другие штаммы тех же видов могут отличаться по скорости роста и жизнеспособности при разных температурах. Для установления статистики выживаемости микромицетов в авиационном топливе при экстремальных температурах требуются дополнительные исследования. Однако на примере *Hormoconis resiniae* и *Phialophora* sp. мы можем сделать вывод о том, что грибы, растущие в авиационном топливе, обладают довольно высокой устойчивостью к изменениям температуры. Последнее следует учитывать при разработке методов защиты топлива от биоповреждений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Билай В. И., Коваль Э. З. Рост грибов на углеводородах нефти. Киев: Наук. думка, 1980. 340 с.
- Благник Р., Занова В. Микробиологическая коррозия. М.; Л.: Химия, 1965. С. 11—20.
- Каневская И. Г. Биологическое повреждение промышленных материалов. Л.: Наука, 1984. 232 с.
- Atlas R. M. Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation // Appl. microbiol. 1975. Vol. 30 (3). P. 396—403.
- Scott J. A., Forsyth T. J. Thermophilic microorganisms in aircraft fuel // Int. Biodeteriorat. Bull. 1976. Vol. 12, N 1. P. 1—4.
- Thomas A. R., Hill E. C. Aspergillus fumigatus and supersonic ariation // Int. Biodeteriorat. Bull. 1977. Vol. 13, N 1. P. 1—4.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Всероссийский институт авиационных материалов
Москва
kopengagen8@mail.ru

Поступила 5 XII 2008

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние температуры на рост и жизнеспособность изолированных из авиационного топлива *Hormoconis resinae* (Lindau) Arx et G. A. De Vries и *Phialophora* sp. Оба вида сохраняли жизнеспособность при -57°C . Споры *Hormoconis resinae* оставались жизнеспособными при 60° не более 3 суток и погибали при 70°C . Споры *Phialophora* sp. сохраняли жизнеспособность при 55° не более суток и погибали при 60°C . Наиболее активный рост обоих видов на топливе происходил при 28°C .

Ключевые слова: микромицеты из авиационного топлива, *Hormoconis resinae*, *Phialophora* sp., жизнеспособность спор.

S U M M A R Y

Effects of the temperature on the growth and the viability of *Hormoconis resinae* (Lindau) Arx et G. A. De Vries and *Phialophora* sp. isolated from aviation fuel were studied. Both fungi species stayed alive at -57°C . Spores of *Hormoconis resinae* were viable at 60° not more than 3 days and died at 70°C . Spores of *Phialophora* sp. were viable at 55° not more than 1 day and died at 60°C . The most active growth of both fungi in fuel was at 28°C .

Key words: microfungi from aviation fuel, *Hormoconis resinae*, *Phialophora* sp., spores viability.