

УДК 630*937.14

М. О. Середич

Белорусский государственный технологический университет

**КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ГРИБА *PHOMA* SP.1 – ВОЗБУДИТЕЛЯ ФОМОЗА
ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ХВОЙНЫХ ПОРОД**

Фомоз посадочного материала хвойных пород – новое заболевание посадочного материала в лесных питомниках республики. Основным возбудителем является гриб *Phoma* sp.1, не имеющий в настоящий момент таксономического описания. В данной работе изучены основные культурально-морфологические особенности штамма гриба *Phoma* sp.1.

Установлено, что по температурному оптимуму (22°C) гриб относится к мезофильной группе микроорганизмов. Выявлено, что культура *Phoma* sp.1 способна к образованию вегетативных покоящихся спор – хламидоспор. Процесс их образования начинался с обособления фрагментов протоплазмы, затем мицелий септировался и покрывался плотной оболочкой. Хламидоспоры наиболее быстро формировались на голодной питательной среде при температуре +4°C на 7-й день культивирования. Пикниды гриба образовывались в толще питательной среды только после длительного хранения мицелия при пониженных температурах на голодном агаре, однако созревания спор не происходило.

По отношению к кислотности гриб является ацидофильным. Максимальная скорость накопления биомассы штаммом наблюдалась при pH среды от 4,3 до 4,9, однако рост гриба *Phoma* sp.1 может осуществляться в более широком диапазоне pH – от 2,5 до 8,5 (в зависимости от состава питательной среды). В процессе жизнедеятельности гриб изменяет реакцию среды на различное число единиц pH, приближая ее к оптимальной для своего развития. Отмечено, что кислотность среды влияет на внешний вид колонии *Phoma* sp.1 в чистой культуре.

Более благоприятные условия для гриба *Phoma* sp.1 наблюдаются при постоянной аэрации (встряхивании) среды – происходит образование сфер мицелия правильной формы и стабильное накопление биомассы.

Ключевые слова: *Phoma* sp.1, фомоз, морфология мицелия, колонии, питательные среды, скорость роста, хламидоспоры, кислотность, биомасса.

М. О. Seredich

Belarusian State Technological University

**CULTURAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF FUNGUS *PHOMA* SP.1 – PHOMA BLIGHT CAUSING AGENTS
IN CONIFEROUS TREE SEEDLINGS**

Phoma blight of coniferous seedling – a new and poorly understood disease in forest nurseries of the country. The main causing agents is a pathogenic species *Phoma* sp.1, for the moment, has no taxonomy description. The basic morphological and cultural characteristics of the fungal strain *Phoma* sp.1 are investigated in this paper.

It was found that the according to the optimum temperature (22°C) the fungus belongs to the mesophilic group. It was found that the culture of *Phoma* sp.1 have been capable of forming a vegetative resting spores – chlamydo spores. The process of formation began with the separation of protoplasm fragments, then the mycelium septated and covered with a dense shell. Chlamydo spores formation was the most rapid agar medium at +4°C for 7 days cultivation. Pycnidia of the fungus formed deep in the the nutrient media only after prolonged low-temperature storage of mycelium on agar media, but the spores have not been ripen.

The influence of pH on the relative fungus it is acidophilic. Maximizing biomass productivity rate was into the 4.3–4.9 range, but the growth of the fungus *Phoma* sp.1 is can be carried out in a wide pH range – from 2.5 to 8.5 depending on the composition of the nutrient medium. In the process of life fungus alters the reaction medium at a different number of pH units, bringing it closer to optimal for it development. The pH of the medium also affected cellular and colony morphology of *Phoma* sp.1.

More favorable conditions for the fungus *Phoma* sp.1 observed at constant medium aeration – the formation of the typical mycelium with proportional growth and stable biomass accumulation.

Key words: *Phoma* sp.1, Phoma blight, mycelium morphology, colonies, nutrient medium, growth rate, chlamido-spories, acidity, biomass.

Введение. Фомоз хвойных пород в лесных питомниках Беларуси – новое, но уже широко распространенное заболевание [1]. Первые симптомы заболевания проявляются в начале мая – нижняя хвоя сеянцев и саженцев становится золотисто-коричневой, потом буреет и начинает отмирать. Затем патоген распространяется по молодому стволу, вызывая отмирание боковых побегов текущего года и верхушечной почки. В результате растение сильно отстает в росте и в конце лета полностью усыхает. Несмотря на высокую вредоносность болезни, ее возбудители (грибы рода *Phoma* Sacc.) практически не изучались на лесных древесных породах, хотя известно значительное количество фомозов сельскохозяйственных растений [2].

Гриб *Phoma* sp.1 – отобранный нами изолят, который наиболее часто выделялся из пораженного посадочного материала хвойных пород при лабораторной диагностике. Следует отметить, что грибы рода *Phoma* сложны в своей систематике в связи с отсутствием половых органов размножения у большинства видов, высокой морфологической изменчивостью в естественных условиях и полифилией [3, 4]. В настоящее время в международном генном банке данных NCBI гриб не имеет видового названия и таксономического описания [5].

Грибы р. *Phoma* известны своей повышенной устойчивостью к действию горячей воды и фунгицидных веществ, способны долго сохраняться во внешней среде: в почве, на подстилке, что способствует их распространению среди восприимчивых растений [6].

Одним из этапов включения гриба в таксономическую базу данных и присвоения ему видового названия является описание его вегетативных и репродуктивных структур *in vivo* и *in vitro*, а также изучение условий роста мицелия и формирования спорангиев.

В данной работе нами были изучены культурально-морфологические особенности гриба *Phoma* sp.1 (внешний вид колонии, скорость роста на питательных средах различного состава, влияние pH питательной среды и аэрации на накопление биомассы и др.).

Основная часть. Непосредственный объект исследований, чистая культура гриба *Phoma* sp.1, была выделена из пораженного посадочного материала ели европейской, взятого в постоянном лесном питомнике ГЛХУ «Ивацевичский лесхоз» с типичными симптомами фомоза. Подтверждение принадлежности гриба к распространенному штамму *Phoma* sp.1. производилось путем анализа его ДНК, выполненного сотрудниками ГНУ «Институт леса» НАН Беларуси (О. Ю Барановым, С. В. Пантелеевым).

Сравнение нуклеотидной последовательности объекта исследований с данными генного банка NCBI показало, что наиболее близкородственным видом является *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel (97%-й уровень сходства генетического материала).

Изучение культурально-морфологических свойств изолята гриба *Phoma* sp.1 проводили согласно протоколу Воегема Г. Н. [3] с использованием следующих питательных сред: голодного агара, сусло-агаровой среды, овсяного, картофельно-морковного агара, агаризованной среды Чапека-Докса и стандартной среды Malt Extract Agar.

Оценку влияния температуры на ростовые процессы проводили в контролируемых условиях при следующих ее значениях: +4; +15; +22; +28; +36°C.

Для выявления степени влияния pH на накопление биомассы патогенного гриба использовали две различные жидкие питательные среды: картофельно-декстрозную и сусло среду. Различные величины pH сред создавали путем добавления к ним необходимого объема 1 н. растворов NaOH или HCl. Оценку pH растворов проводили pH-метром HI 8314 (membrane pHmeter). По окончании опыта (на 15-й день) мицелий фильтровали, промывали, высушивали при $t = 103 \pm 2^\circ\text{C}$ до окончания потери массы, что контролировали на торсионных весах TW. Также оценивали способность гриба менять кислотность питательной среды, сравнивая показатель pH в опытных вариантах с контролем (без мицелия).

С целью изучения влияния аэрации на ростовые процессы штамма проводили поверхностное и глубинное культивирование грибницы (температура – +22°C, начальное значение pH сусло-среды – 4,5) в вариантах с длительностью выращивания мицелия в 7, 10, 14 и 21 день. Описывали морфологические параметры мицелия, определяли скорость увеличения его массы.

Все эксперименты проведены в 3-х повторностях для каждого варианта опыта, обработка данных сделана в статистической части электронных таблиц Excel.

Полиморфизм патогена устанавливали по морфологии колоний, скорости роста мицелия, особенностям образования хламидоспор.

В морфологических особенностях роста мицелия на различных агаризованных питательных средах следует отметить, что на начальных этапах роста гифы сначала светлые или светло-серые, затем постепенно темнеют. В конечном итоге мицелий становится темно-серым или темно-охристым, и только по краю колония остается светлоокрашенной. У отдельных изолятов после длительного хранения наблюдалась окраска мицелия кремовая, потемне-

ние мицелия наблюдалось только в центре высева инокулюма. Нередко на поверхности культуры наблюдается выделение капель жидкости. На стандартной питательной среде Malt Extract Agar появляется характерная концентрическая зональность, которая впоследствии исчезает.

Данные по влиянию температур на рост колонии гриба *Phoma* sp.1 и морфологию мицелия на различных питательных средах представлены в табл. 1.

В результате эксперимента по влиянию температур на ростовые процессы *Phoma* sp.1 было выявлено, что максимальная скорость роста наблюдается при температуре 22°C на следующих питательных средах: картофельно-морковный агар, сусло-среда и Malt Extract Agar – колония гриба по диаметру прирастает в среднем на $11,4 \pm 0,5$; $11,2 \pm 0,4$ и $10,2 \pm 0,3$ мм/сут соответственно. Понижение и повышение температур оказывают определенный фунгистатический эффект. При высоких температурах (36°C и выше) мицелий полностью прекращал свой рост (погибал) уже через 12 ч после начала опыта.

Покоящаяся стадия гриба в виде хламидоспор быстрее формируется при низких температурах. Так, время появления хламидоспор при температуре +4°C колеблется от 6 до 30 сут. На голодной среде хламидоспоры появлялись уже на 7-й день после начала культивирования, в то время как на стандартной питательной среде Malt Extract Agar хламидоспоры появлялись только после истощения/высыхания питательной среды, примерно через месяц после начала

опыта. Образование пикнид происходило в толще питательной среды, однако споры не созревали (вероятно, это связано с недостатком специфических элементов питания в среде или необходимостью создания определенных условий освещения).

После длительного хранения (около года при температуре от 0 до +4°C) культура гриба легко пересевалась на свежую среду с образованием колоний описанного выше внешнего вида.

Результаты влияния кислотности питательной среды на рост мицелия *Phoma* sp.1 приведены в табл. 2.

Полученные данные показывают, что рост штамма на картофельно-декстрозной среде возможен в диапазоне pH от 3,5 до 8,5, на сусло-среде – от 2,5 до 8,6.

Сужение диапазона кислотности для роста *Phoma* sp.1 на картофельно-декстрозной среде связано, вероятно, с тем, что недостаток элементов питания существенно снижает толерантность гриба к сильноокислым и высокощелочным условиям.

Наибольшее накопление биомассы мицелия на сусло-среде имело место в варианте с pH 4,8–4,9; на картофельно-декстрозной – с pH 4,3. При таких значениях pH отмечается существенное накопление биомассы – $3,45 \pm 0,03$ и $2,52 \pm 0,12$ г/л соответственно. Следовательно, при отсутствии дефицита питательных веществ, оптимальной кислотностью для ростовых процессов штамма *Phoma* sp.1 являются значения pH 4,3–4,9.

Таблица 1

Морфологические особенности и скорость роста мицелия *Phoma* sp.1 на разных питательных средах в различных температурных режимах

Питательная среда	Скорость роста мицелия по диаметру колонии, мм/сут, при температуре культивирования, °C				Сроки появления хламидоспор, сут, при +4°C	Внешний вид колонии
	+4	+15	+22	+28		
Сусло-агаровая	$1,3 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$	18–21	Слегка бархатистая, цвет светло-серый, местами темно-охристый, по краю колонии светлее
Картофельно-морковный агар	$1,2 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,3$	$11,4 \pm 0,5$	$4,11 \pm 0,4$	15–21	Бархатистая, неровной текстуры, цвет в центре серый, на краю колонии светлее
Чапека-Докса	$1,3 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,4$	15–21	Бархатистая, почти плоская, светло-серого цвета
Malt Extract Agar	$1,8 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,4$	$10,2 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,3$	25–30	Слегка шерстистая, с концентрической зональностью, серовато-охристая
Голодный агар	$0,6 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	6–10	Плоская, полупрозрачная, темно-серого цвета
Овсяный агар	$1,1 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	15–21	Шерстистая, серого и светло-серого цвета

Таблица 2

Влияние pH питательной среды на биомассу *Phoma* sp.1

Картофельно-декстрозная среда			Сусло-среда		
pH		масса мицелия, г/л	pH		масса мицелия, г/л
в начале опыта	в конце опыта		в начале опыта	в конце опыта	
2,5	2,5	–	2,5	3,0	0,58 ± 0,12
3,5	3,4	0,51 ± 0,01	3,5	3,8	1,10 ± 0,11
4,5	4,3	2,52 ± 0,12	4,5	4,8	3,45 ± 0,03
5,5	5,1	0,82 ± 0,05	5,5	4,9	1,58 ± 0,07
6,5	6,0	0,61 ± 0,08	6,5	5,8	1,18 ± 0,11
7,5	6,7	0,50 ± 0,01	7,5	6,1	1,07 ± 0,10
8,5	7,9	0,21 ± 0,02	8,5	7,4	0,69 ± 0,05
9,5	–	–	9,5	–	–

Таблица 3

Влияние различных условий аэрации питательной среды на накопление биомассы *Phoma* sp.1

Метод культивирования	Масса воздушно-сухого мицелия, г/л			
	Средняя скорость накопления биомассы, г/л-сут			
	дни учета			
	7	10	14	21
Стационарный (без аэрации)	0,49 ± 0,07	0,51 ± 0,06	1,47 ± 0,21	2,15 ± 0,16
	0,07	0,05	0,10	0,10
Встряхивание (с аэрацией)	1,76 ± 0,26	2,76 ± 0,01	4,99 ± 0,44	5,68 ± 0,52
	0,25	0,28	0,36	0,27

Кислотность питательной среды активно регулируется штаммом. Было зафиксировано, что в процессе своей жизнедеятельности гриб изменяет реакцию среды на различное значение pH, приближая ее к оптимальной для своего развития.

Наблюдения за характером роста *Phoma* sp.1 показали, что кислотность среды влияет на морфологию колонии гриба. В жидких средах с pH 4,3–5,8 гриб развивает типичную для него структуру мицелия (рисунок).



Формирование характерных сфер мицелия при глубинном культивировании *Phoma* sp.1 на картофельно-декстрозной питательной среде

На кислых средах (pH до 3,5) колонии гриба располагаются в виде отдельных плотных островков в глубине питательной среды. На щелочных средах колония представляет собой рыхлую, полупрозрачную массу.

Выявлены различия в накоплении биомассы при различных условиях аэрации жидкой питательной среды (табл. 3).

При условиях пониженного содержания кислорода мицелий гриба *Phoma* sp.1 представлял собой полупрозрачную рыхлую белую массу, расположенную по краю колбы или стелющуюся по поверхности, образования хламидоспор практически не наблюдалось.

При культивировании в условиях постоянной аэрации питательной среды на вторые сутки на дне колбы наблюдалось появление 3–4-х ватообразных пушистых комочков. Количество сфер мицелия, вероятно, связано с числом фрагментов, которые отделяются от инокулюма. Скорость роста мицелия начинает замедляться после двух недель опыта, вероятно, это связано с истощением среды и накоплением в ней метаболитов патогена.

Заключение. Штамм патогенного гриба *Phoma* sp.1 имеет ярко выраженный полиморфизм, проявляющийся в различных условиях роста и развития.

Гриб *Phoma* sp.1 для роста и развития не требует специальных селективных сред со сложным составом. Оптимальной питательной средой для культивирования гриба является стандартная сусло-агаровая среда. Хорошими для роста мицелия гриба являются также среды картофельно-морковная и Malt Extract Agar. На этих же средах без потери своих свойств можно хранить мицелий длительное время (год и бо-

лее). Однако для быстрого получения вегетативных спор (хламидоспор) рекомендуется выращивать гриб на голодном агаре при температуре около +4°C. Для образования бесполой спор (пикнид с конидиями) требуются специфические условия культивирования, которые предстоит выяснить.

Мицелий на агаризованных питательных средах приобретает типичную окраску, текстуру и плотность. В морфологии колоний можно выделить три их типа: плоская, шерстистая, бархатистая. Все колонии серого цвета имеют различный оттенок, иногда ох-

ристый. Пигментация питательной среды не наблюдается.

Для своего развития гриб предпочитает слабокислые среды (рН 4,3–4,9), однако он может существовать в кислых и сильнощелочных средах. Степень его пластичности по отношению к кислотности зависит от богатства питательной среды.

Полиморфизм присутствует также при различных условиях аэрации среды. Средняя скорость накопления биомассы гриба в условиях постоянного встряхивания жидкой среды в 3–4 раза больше, чем без ее аэрации

Литература

1. Фомоз посадочного материала в лесных питомниках / В. А. Ярмолович [и др.]. Лесное и охотничье хозяйство. 2013. № 3. С. 18–24.
2. Aveskamp M. M., De Gruyter J. and Crous P. W. Biology and recent development in the systematic of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity* 38, 2008. P. 1–18.
3. Boerema G. H., Gruyter J., Noordeloos M. E. *Phoma* identification manual. CABI Publishing, Cambridge, 2004. P. 1–479 p.
4. Aveskamp M. M. Phylogeny and DNA-based identification in *Phoma* and related genera, Wageningen. 2014. P. 18–24.
5. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed: 14.09.2015).
6. James R. L. Effects of fumigation on soil pathogens and beneficial microorganisms. Paper presented at the intermountain forest nursery association annual meeting, Bismarck, North Dakota, august 14–18, 1989.

References

1. Yarmolovich V. A., Baranov O.Yu., Dishuk N. G., Seredich M. O. Fomoz posadochnogo materiala v lesnykh pitomnikakh. *Lesnoe i okhotnich'ye khozyaystvo* [Forest and hunting economy], 2013, no. 3, pp. 18–24 (In Russian).
2. Aveskamp M. M., De Gruyter J. and Crous P. W. Biology and recent development in the systematic of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity* 38, 2008, pp. 1–18.
3. Boerema G. H., Gruyter J., Noordeloos M. E. *Phoma* identification manual. CABI Publishing, Cambridge, 2004, pp. 1–479.
4. Aveskamp M. M. Phylogeny and DNA-based identification in *Phoma* and related genera, Wageningen. 2014, pp. 18–24.
5. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Electronic resource]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed: 14.09.2015).
6. James R. L. Effects of fumigation on soil pathogens and beneficial microorganisms. Paper presented at the intermountain forest nursery association annual meeting, Bismarck, North Dakota, august 14–18, 1989.

Информация об авторах

Середич Марина Олеговна – аспирант кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: romina_mo@bk.ru

Information about the authors

Seredich Marina Olegovna – PhD student, the Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romina_mo@bk.ru

Поступила 16.02.2016