

С. Г. БАТИКЯН

НЕКОТОРЫЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГРИБОВ ИЗ РОДА *FUSARIUM* И ОЦЕНКА ИХ ЗНАЧЕНИЯ ДЛЯ СИСТЕМАТИКИ

Грибы из рода *Fusarium* являются возбудителями вреднейших заболеваний растений, они вызывают трахеомикозы или болезни увядания, а также наносят большой ущерб продуктам сельского хозяйства при хранении, вызывая всевозможные гнили. Они, кроме того, типичны, как компоненты почвенной микофлоры в ризосфере различных растений. Отдельные виды этого рода образуют токсины, сильно тормозящие рост культурных растений, а некоторые из них патогенны для человека и животных.

Род *Fusarium* был впервые описан в 1809 г. Линком. Лишь через 100 лет после этого трудами Аппеля и Волленвебера [13] и несколько позже Волленвебера и Рейнкинга [29] была обстоятельно разработана его систематика, в основу которой для разграничения видов были положены только морфологические признаки, а для определения более мелких внутривидовых форм использовались также свойства приуроченности к тем или иным субстратам и некоторые другие физиологические особенности. Однако при этом не учитывалась изменчивость этих признаков в различных условиях культивирования.

Работами Снайдера и Гансена [27] была значительно упрощена классификация грибов рода *Fusarium*. Эти авторы объединяют отдельные, даже с резко выраженными морфологическими различиями виды одной из близких секций в один вид, выделяя в пределах вида формы только на основе патогенных свойств. В результате такого укрупнения видов весь род по этим авторам состоит из 9 видов с 38 формами. Однако укрупнение отличных друг от друга видов в один вид, даже с учетом изменчивости их морфологических различий, не может считаться оправданным.

Райлло [9] с целью классификации рода *Fusarium* применила экспериментально-морфологический метод, благодаря чему она осуществила проверку степени константности основных морфологических и культуральных признаков для разрешения вопроса видовой систематики *Fusarium*; в качестве отличительных признаков видов в пределах секции при этом использовались форма и некоторые особенности строения конидий, в частности, структура верхней клетки, степень изогнутости, преобладающее число перегородок и другие. На этих основах Райлло выделяет в роде *Fusarium* 17 секций с 55-ю видами.

На основании многолетних исследований видов *Fusarium* в результате экспериментального изучения изменчивости основных видовых

признаков, В. И. Билай [3] предложила их новую систему. Отрицая главное значение строения верхней клетки для разграничения видов, предложенное Райлло, Билай за основу классификации принимает морфологию макроконидий в целом и, кроме того, микроконидий. Культуральные свойства используются как для разграничения отдельных видов, так и для более мелких форм в пределах вида. Разработанная ею система рода привела к значительному сокращению числа видов (26 видов и 29 разновидностей).

М. А. Литвинов в своем определителе почвенных грибов [5] род *Fusarium* определил в основном по системе А. И. Райлло, с некоторыми изменениями и дополнениями.

Однако при выделении и определении этих грибов в условиях Армении мы в своих работах сталкивались с большими затруднениями. Нам кажется, что не следует слишком укрупнять виды, ибо в таком случае в один и тот же вид попадают слишком разные формы, и изменчивость вида в таких случаях может расцениваться как беспредельно широкая, что едва ли соответствует действительности.

В поисках новых критериев для разграничения видов у рода *Fusarium*, мы обратились к некоторым цитологическим исследованиям. Поведение и характер ядер у несовершенных грибов изучены очень мало. Для разрешения теоретических и практических проблем инфекционных заболеваний растений, вызываемых грибами, важно понимание степени и природы их изменчивости, которая, несомненно, тесно связана и с цитологическими особенностями клеток.

Ряд авторов указал на некоторые важные свойства грибов в зависимости от численности их хромосомных наборов. Так, Маклис и Крейсман [20] выявили, что физиологические особенности штаммов *Euallostus* связаны с полиплоидизацией ядер, Стеббинс [11] отрицает или считает редким явление полиплоидии у грибов. Однако в настоящее время ряд работ свидетельствует о роли полиплоидии и многоядерности в процессе формообразования и приспособительной изменчивости.

Одной из причин изменчивости грибов (с появлением новых форм) является широко распространенное анастомозирование клеток мицелия. Данное явление впервые было описано Понтекорво и Сермонтье [23] в отношении грибов из рода *Penicillium* и *Aspergillus*. Алиханян и Борисова [1] указали на образование новых форм у тех же грибов при анастомозировании гиф. Аналогичные работы по изучению подобного механизма изменчивости были проделаны у грибов из рода *Fusarium* Бэкстон и Астиг, Рот и Брандт (цитировано по Рысбаевой [10]).

Вопрос деления ядра у грибов более или менее освещен как в отечественной, так и в зарубежной литературе. Однако, если в отношении мейоза в процессе полового воспроизведения существует относительно единое мнение, то в отношении митоза в клетках вегетативных гиф грибов зачастую встречаются противоречивые данные.

В работах Брешгабера, Вильсона, Айста [14] описывается способ деления соматических ядер *Ceratocystis fagacearum*, наблюдаемый также

у многих фитопатогенных грибов, как виды *Alternaria*, *Fus. oxysporum* и т. д., деление ядра у которых происходит перпендикулярно оси гифы. Указанное направление деления ядра является морфологически необходимым для стадии метафазы, ибо многие грибы имеют гифы, диаметр которых меньше размера их ядер в стадии метафазы. Обнаружены также диплоидные ядра и центриолеподобные тела.

Олив на основании литературных данных пришел к выводу, что соматические ядра грибов делятся митотически. Однако Робиноу [24, 26] указывает, что имеющиеся в литературе сведения для такого обобщения недостаточны, и ядра в вегетативных гифах грибов делятся различными способами. К такому заключению пришли и другие авторы [14, 25, 28].

Приводя цитологические работы в отношении грибов рода *Alternaria*, Нагаи и Такахаши [21] установили, что количество ядер в клетках гиф мицелия вначале бывает небольшим, далее возрастает до максимума и затем снова резко падает до последнего срока наблюдения. После появления анастомозов они наблюдали изменение количества ядер в гифах, в результате чего делается вывод о вероятности миграции ядер из одной клетки в другую, вследствие чего может произойти гетерокариоз. Наблюдалось деление ядер в растущей части гифы в возрасте 12—36 час. В метафазе различались группы точковидных, палочковидных хромосом.

Курсанов [4] отметил, что у грибов нечетко выражено ахроматиновое веретено, хромосомы неясно отделяются друг от друга. Процесс деления ядра происходит быстро, хотя оболочка ядра сохраняется долго [19].

Рысбаева [10] при изучении гриба *Verticillium dahliae* люминесцентным методом выявила одноядерность клеток гриба, за исключением небольшого процента двуядерных конидий. Однако автор считает, что признак двуядерности клеток не является наследственным, ибо двуядерные споры при проращивании не давали культуру с двумя ядрами в клетках гиф. Багаутдинова, Мацкевич [2] при изучении несовершенного гриба *Piricularia oryzae* зафиксировали в онтогенезе несколько типов деления ядра. В конидиях *P. oryzae*, по их данным, в большинстве случаев содержатся гаплоидные ядра с постоянным числом хромосом. Для спор характерно митотическое деление классического типа. При замедлении ростовых процессов диплоидизация и полиплоидизация ядер осуществляется эндомитотически.

По мнению Пешкова [8], митоз без веретена является эволюционно ниже стоящим способом деления ядра, и эволюция от одноклеточных к многоклеточным организмам связана с изменением репродукции их ядер.

Из приведенного краткого обзора ясно, что специальных работ по количеству и поведению ядер у грибов из рода *Fusarium* почти не было, и все сведения об этом ограничены 2—3 приведенными ссылками.

Для цитологического исследования нами были выбраны 3 штамма *Fusarium*, относящиеся к 3 видам: *Fusarium avenaceum* (Fr) (секция *Roseum* Wt. emend. Bilai), вызывающему увядание гвоздики; *Fusarium*

solani (Mart.) App. et. Wr. (секция *Martiella* Wr., emend Bilai) — возбудителю увядания левкоев и *Fusarium oxysporum* (Schlecht. emend. Snyd. et Hans, emend Bilai), выделенному из томата. Первые 2 вида вызывают распространенные и вредоносные в условиях Армении заболевания [12]. Третий — возбудитель увядания помидоров. Все 3 вида совершенно не изучены в цитологическом отношении.

Было проведено определение количества и поведения ядер в клетках гиф и конидиях моноспоровых культур вышеуказанных грибов. Для выращивания культур было использовано жидкое сусло. Грибы выращивались в колбах Эрленмейера при 24—25°. Прижизненные исследования проводились методом фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. Для люминесцентно-микроскопического выявления ядер клетки грибов флуорохромировали раствором акридинового оранжевого (1 : 20 000). По данным Мейселя и Корчагина [6], акридиновый оранжевый, связываясь с ДНК или ДНК—протеидом, придает им ярко-зеленую люминесценцию.

Аналогичные результаты были получены и в наших опытах в гифах и конидиях грибов из рода *Fusarium*. Одновременно для обнаружения ядер материал обрабатывался по методу НС1-Гимза, являющемуся наиболее эффективным для грибов, а также по Фельгену.

Люминесцентно-микроскопические исследования велись с помощью люминесцентного микроскопа МЛ-1, фотографирование проводилось микрофотонасадкой МФН-3 на флуорографическую пленку РФ-3.

Для приготовления постоянных и временных препаратов использовали культуру, выращенную непосредственно на жидком пивном сусле. Растущий материал фиксировался в течение 15-и дней через определенные промежутки времени. Повторность наблюдений 3-х кратная.

Проведенные по отдельным видам *Fusarium* исследования дают некоторое представление о поведении ядер в клетках мицелия и в их конидиях, что отражено на соответствующих фотографиях. В частности, по *Fusarium avenaceum*, выделенному из больных растений гвоздики при изучении гиф по методу НС1-Гимза и под люминесцентным микроскопом (рис. 1, а, б), количество ядер в клетках гиф колеблется от 1 до 4.

Ядра при окраске по Гимза имеют темно-лиловый цвет, четко обрисованы, округлой, овальной или бобовидной формы, вытянуты вдоль оси гифы, иногда неправильных очертаний. Под люминесцентным микроскопом нуклеиновые кислоты ядрышек и цитоплазмы окрашиваются в красный цвет, а ядра (ДНК) — в зеленый светящийся цвет. Такое состояние гиф наблюдается в течение первых трех суток роста мицелия.

Начиная с конца третьих суток и до 10—11-х в зависимости от степени развития каждой гифы, в ядрах можно наблюдать обособление хромосом (рис. 1, в, г). Последние имеют форму скученных зернышек, трудно поддающихся подсчету. По-видимому, гаплоидный набор хромосом у этого вида составляет 5, но не во всех ядрах это видно четко. Примерно в те же сроки в клетках можно наблюдать разные стадии деления ядер (рис. 1, д—ж) и часто приобретаемую ими при этом очень

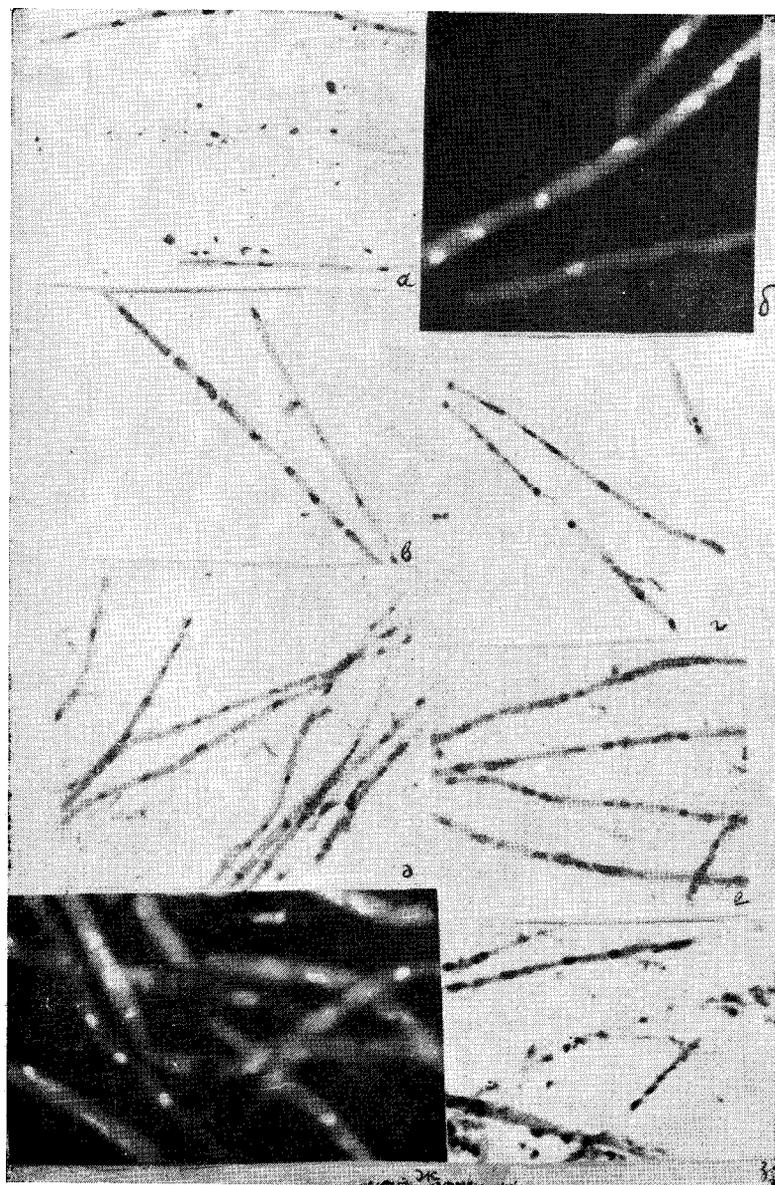


Рис. 1. Ядра *Fusarium avenaceum* (Fr.) (секция *Roseum* Wr. emend Bilal) из гвоздики: а — ядра в клетках гиф; б — ядра в клетках и обособление хромосом; в—г — обособление хромосом; д—е—ж — разные стадии деления ядер; з — разделившиеся дочерние ядра.

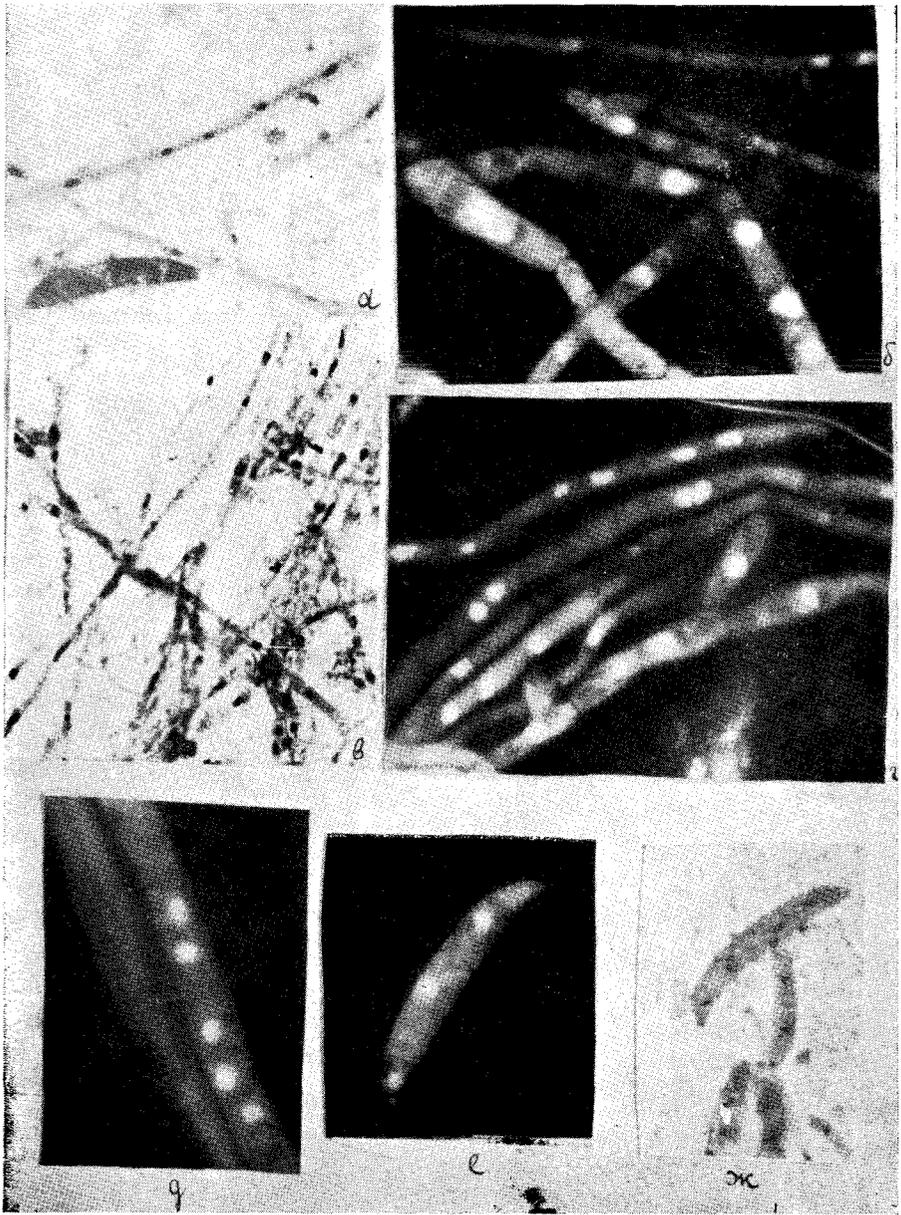


Рис. 2. Ядра *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. (секция Martiella, Wr. emend Bilai) из левкоев. а—б — ядра в клетках гиф; в—г — обособление хромосом и разные стадии деления ядер; д — дочерние ядра; е—ж — конидии с одноядерными клетками.

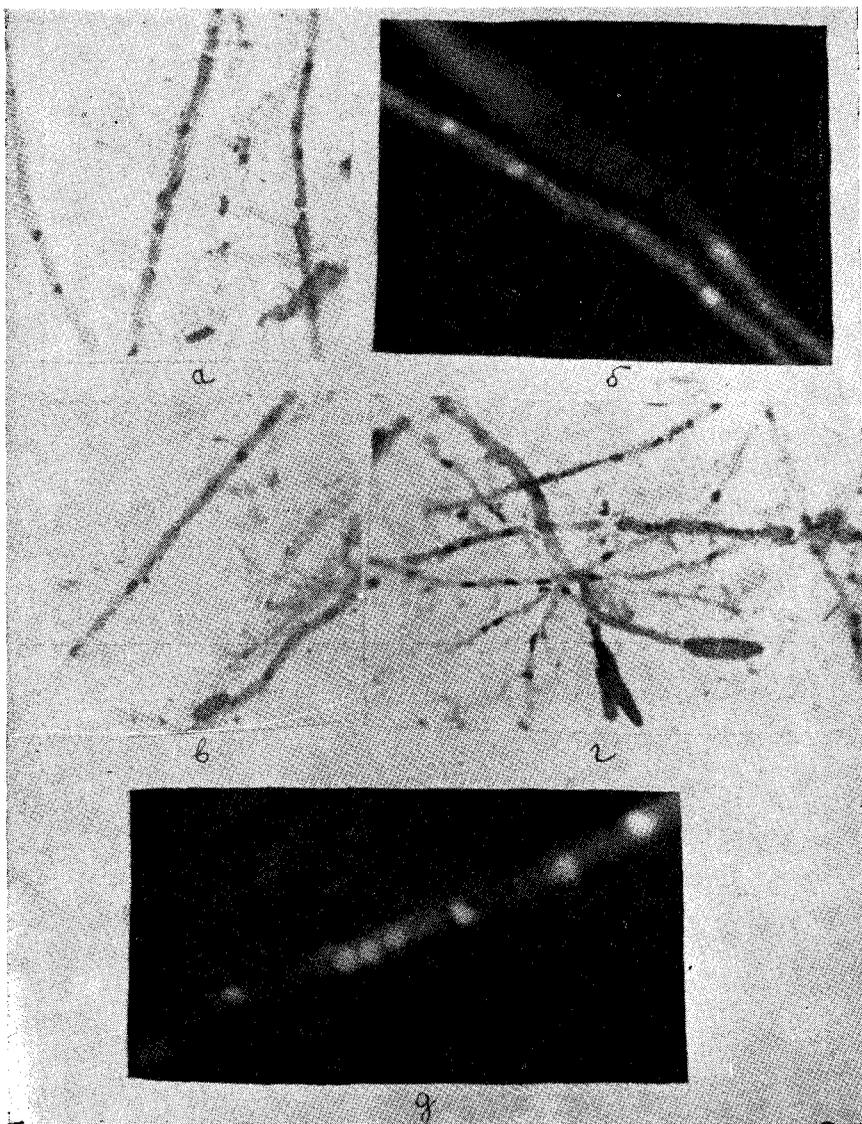


Рис. 3. Ядра *Fusarium oxysporum* (Schlecht, emend Snyder et Hans. emend Bilal), выделенные из томата. а—б — ядра в клетках гиф; в — обособление хромосом; г — разные стадии деления ядра; д — дочерние ядра.

вытянутую форму. К 7-м суткам и позже наряду с продолжающимися делиться ядрами, хорошо заметны уже разделившиеся дочерние ядра (рис. 1, з), расположенные по 2 или по 4 в клетке в непосредственной близости друг от друга и восстановившие свои четкие очертания.

При окраске гиф *Fusarium solani* по методу НСI-Гимза и под люминесцентным микроскопом (рис. 2, а, б) количество ядер в клетках гиф колеблется от 1 до 5. Ядра имеют овальную форму и вытянуты вдоль оси гифы. В самых молодых растущих кончиках гиф количество ядер редко превышает 1. Под люминесцентным микроскопом ядра (ДНК) окрашиваются в светящийся зеленый цвет. Неделаящиеся ядра имеют правильную форму, однако уже при 24—48-часовой культуре в гифах наблюдается обособление хромосом, а также разные стадии деления ядер (рис. 2, в, г). Они приобретают удлинненную неправильную форму. Количество хромосом колеблется от 4 до 5. Часто наблюдаются анастомозы между гифами.

По-видимому, использование моноспоровых культур *Fusarium* исключает возможность появления в них вариаций в результате внутреннего гетерокариозиса. Таким образом, выделение моноспоровых культур остается полезным средством для получения гомокариотических изолятов. В определенном возрасте в гифах хорошо заметны разделившиеся дочерние ядра, расположенные по 2 или 3 в клетках гиф (рис. 2, д). Они имеют отчетливые контуры, округлую форму.

На десятые сутки в культуре *Fusarium solani* образуются многочисленные конидии. Клетки их одноядерны, ядра гаплоидны, округлой формы, с ясно выраженными гладкими контурами (рис. 2, е, ж).

Клетки гиф *Fusarium oxysporum*, выделенные из помидоров, в основном, двуядерные. Однако встречаются гифы с большим количеством ядер (3—5). Ядра в клетках гиф имеют округлую или, как и в предыдущих случаях, вытянутую вдоль гифы яйцевидную форму. Их контуры резко очерчены (рис. 3, а, б). В первые сутки роста в ядрах наблюдается обособление хромосом в количестве 4—5 (рис. 3, в). Ядра при этом приобретают неправильную форму, с неясными контурами. В растущих частях гиф в возрасте культуры 24—48 час. наблюдается деление ядер (рис. 3, г).

Дочерние ядра в клетках гиф расположены или отдельно, или в ряд непосредственно друг около друга (рис. 3, д). Они встречаются в клетках в количестве до 3 и имеют хорошо выраженную округлую форму.

Изложенные результаты свидетельствуют о том, что в роде *Fusarium* гаплоидное число хромосом у отдельных видов почти сходно и составляет 4, 4—5. Разграничиваются они нечетко и трудно поддаются подсчету. Число ядер в гифах моноспоровых культур отличается по видам не резко (1—4, 1—5, 3—5), форма ядер у всех исследованных видов одинакова. Поэтому в разграничении видов друг от друга, а тем более секций рода *Fusarium*, характер и поведение ядер может служить лишь очень приблизительным дополнительным критерием.

В этом отношении желательнее в дальнейшем изучить ядра мицелия популяционных (не моноспоровых) культур отдельных видов, где при анастомозировании гиф, возможно будет наблюдать явления гетерокариоза.

З а к л ю ч е н и е

Изучение ядер моноспоровых культур трех видов рода *Fusarium*, относящихся к разным секциям рода, проведенное методами фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии, показало следующее.

Количество ядер в клетках гиф у *Fusarium avenaceum* составляет от 1 до 4; у *Fusarium solani* — от 1 до 5; у *Fusarium oxysporum* — от 2 до 5.

Форма ядер почти одинакова у изученных видов. Ядра имеют округлую, овальную или бобовидную форму и расположены вдоль оси гифы.

Гаплоидное количество хромосом у *Fusarium avenaceum* — 5, у *Fusarium solani* — от 4 до 5, у *Fusarium oxysporum* — также от 4 до 5. Хромосомы нечетко разграничиваются и трудно поддаются подсчету.

В клетках гиф удается наблюдать различные стадии деления ядер. К 7—10 суткам роста мицелия и позже хорошо заметны уже разделившиеся дочерние ядра, расположенные по 2 или по 3—4 в клетке в непосредственной близости друг от друга и восстановившие свои четкие очертания.

Клетки конидий изученных видов строго одноядерны, ядра их гаплоидны. Они округлой формы, с ясно выраженными гладкими контурами.

Таким образом, в разграничении видов, а тем более секций рода *Fusarium*, друг от друга, характер и поведение ядер могут служить лишь приблизительным дополнительным критерием, ибо, как видно из приведенных данных, разница в количестве ядер, хромосом и других наблюдавшихся цитологических особенностей у изученных видов очень незначительна.

Приношу свою благодарность М. Н. Малатяну за оказанную помощь по освоению методики цитологических исследований грибов.

Ереванский государственный университет,
кафедра ботаники

Поступило 4.VI 1968 г.

Ս. Գ. ԲԱՏԻԿՅԱՆ

FUSARIUM ՅԵՂԻ ՍՆԿԵՐԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԲՋՋԱԲԱՆԱԿԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԵՎ ՄԻՍՏԵՄԱՏԻԿԱՅԻ ՀԱՄԱՐ
ՆՐԱՆՑ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո մ

Մոնոսպորիկ կուլտուրաներից *Fusarium*-ի 3 ցեղերի կորիզների ֆազոկոնտրաստային և լյումինեսցենտ միկրոսկոպիայի մեթոդներով ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ կորիզների թիվը *Fusarium avenaceum*-ի բջիջներում տատանվում է 1—4-ի, *Fusarium solani*-ի մոտ՝ 1—5-ի, *Fusarium oxysporum*-ի մոտ՝ 2—5-ի սահմաններում:

Ուսումնասիրվող տեսակների կորիզների ձևը գրեթե նույնն է: Կորիզները կլոր են, օվալ կամ լորձաձև և տեղավորված են հիֆերի երկարությամբ:

Քրոմոսոմների պապլոիդ թիվը *F. avenaceum*-ի մոտ 5 է, *F. solani* և *F. oxysporum*-ի մոտ՝ 4—5: Քրոմոսոմները խիստ արտահայտված չեն և դժվար են հաշվվում:

Հիֆերի բջիջներում հաջողվել է դիտել կորիզի բաժանման տարբեր փուլերը: Միցելների աճման 7—10 օրերի ընթացքում և ապա ավելի ուշ երևում են բույր կորիզները՝ ընդգծված սահմաններով, որոնք առաջացած բջիջներում դասավորված են 2—4-ական: Ուսումնասիրվող տեսակների կոնիդիաների բջիջները բացարձակապես միակորիզ են: Հապլոիդ կորիզներն ունեն կլորավուն ձև և պարզ արտահայտված հարթ սահմաններ:

Այսպիսով, տեսակների սահմանազատման ժամանակ, *Fusarium*-ի սեկցիաները կորիզների բնույթով և վարքագծով կարող են միայն մոտավոր լրացուցիչ չափանիշ ծառայել:

Բերված տվյալներից երևում է, որ կորիզների քրոմոսոմների և ուրիշ դիտված բջջաբանական յուրահատկությունների քանակի տարբերությունը շատ չնչին է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алиханян С. И. и Борисова Л. Н. Изв. АН СССР, 2, 1956.
2. Багаутдинова Л. К. и Мацкевич Н. В. Микология и фитопатология, т. I, вып. 2, 1967.
3. Билай В. И. Фузариин. Изд. АН, Укр. ССР, Киев, 1955.
4. Курсанов Л. И. Микология, 1940.
5. Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Изд. Наука. Ленинградское отделение, 1967.
6. Мейсель М. Н. и Корчагин В. Б. Бюл. эксперимент. биологии и медицины, 3, 1952.
7. Пешков М. А. Руководство по цитологии, 1, 1965.
8. Пешков М. А. Доклады на симпозиуме о роли и функции клеточного ядра, 1966.
9. Райлло А. И. Грибы рода *Fusarium*, Сельхоз. М., 1950.
10. Рысбаева А. С. Труды НИИЗР, вып. 8, 1967.
11. Стеббинс Дж. Л. Полиплоидия, М., И. Л., 1956.

12. Тетеревникова-Бабаян Д. Н., Батикян С. Г. Биологический журнал Армении АН АрмССР, т. XXI, 2, 1968.
13. Appel et Wollenweber Grundlagen einer Monographie der Gattung Fusarium (Link) (in Arb. Anstalt für Land—und Forstwirtschaft 8, pp. 1—207, 1910.
14. Brushaber John, Wilson Charles L., Aist James R. Phytopathology, 57, 1, 1967.
15. Dowding E. S. a. J. Weijer. Nature, 188, 4747, 1960.
16. Fordice C., Jr. J. R. I. Grax js. Phytopathology, 53, 1963.
17. Gauger W. Z. pp. Dok. thesis. Purdue Univ. 41, pp. 1956.
18. Hastie A. C. Genetic recombination in the hopwilt, 1962.
19. Knox-Davies E. S. a. J. G. Dickson. Amer. Journ. Bot., 43, 8, 1956.
20. Machlis L. a. J. Grasmann. Amer. Journ. Bot., 43, 8, 1956.
21. Nagai Masaji, Takahashi Koki. Trans. Mycol. Soc. Japan, 7, 2—3, 1966.
22. Olive L. S. Botan. Rev., 19, 1953.
23. Pontecorvo G. a. Sermonti G. Journ. Genet. Microbiol. 11, 1, 1954.
24. Robinow G. F. Canad. Journ. Microbiol., 3, 5, 1957a.
25. Robinow G. F. Journ. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 4, 1961.
26. Robinow G. F. Canad. Journ. Microbiol., 3, 5, 1957b.
27. Snyder W. C., Hansen H. Amer. Journ. Bot., 27, 2, pp. 64, 1945.
28. Turian G. a. E. C. Cantino. Cytol., 25, 1960.
29. Wollenweber H. a. Reiking O. Die Fusarten, Berlin, 1935