С. Г. БАТИКЯН

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ У ВИДОВ *FUSARIUM* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

С целью найти новые систематические критерии для внутривидовых подразделений в роде *Fusarium* нами изучался онтогенез некоторых видов и форм этого рода с момента превращения конидии в вегетативную клетку и до образования нового поколения конидий.

Была поставлена задача исследовать в процессе развития поведение волюгяновых гранул у глубинного мицелия, имеющего различный темп развития. Для этого применялись методы прижизненного окрашивания.

Для изучения процесса развития или фаз роста были взяты следующие 2 штамма: *Fusarium oxysporum* Schlecht emend, Snyd. et Hans. и *Fusarium javanicum* Koord. var. *chrysanthemi* — *leucanthemi* S. Batikian.

Их моноспоровые культуры выращивались глубинным способом в 250-миллиметровых колбах Эрленмейера при 24—26°C. Каждая—в двух вариантах: на качалке с 135 кол/мин и в стационарной культуре.

В каждом варианте опыта использовались 2 среды—минеральная среда Чапека и пивное сусло—(синтетическая и производственная). Колбы с 50 мл питательной среды засеивались суспензией спор.

Микроскопический контроль при цитохимическом изучении глубинного мицелия *Fusarium* проводился следующим образом. Каждые 24 часа отбирались пробы культуральной жидкости с мицелием, капля которой помещалась на предметное стекло, затем культуральная жидкость отсасывалась фильтровальной бумагой, и мицелий окрашивался витальными красителями (метиленовой синей, нейтральной красной, суданом III), после чего велись исследования цитохимических особенностей.

Наблюдения за развитием мицелия проводились нами в основном над нефиксированными, окрашенными витальными красителями, клетками. Применение витальных красителей является очень удобным, т. к. уменьшает вероятность появления в клетках изменений (артефактов), вызываемых фиксацией. Одновременно готовились препараты для наблюдения в люминесцентный микроскоп с фиксацией и окраской по НС1—Гимза.

При прижизненном окрашивании микроорганизмы продолжительное время остаются живыми, это очень важно, ибо организм в данном случае изучается в динамике, а при фиксации препарата и дальнейшем его окрашивании клеточные структуры изучались в статике.

При наблюдении морфологических изменений и фаз роста применялись красители основного характера. Так, 1 г нейтральной красной растворялся в 100 см³ стерильной дистиллированной воды. Из этого исходного раствора готовился рабочий водный раствор путем разведения 1:2000 (0,05% р—р) и 1:5000 (0,02% р—р).

По данным Ромейса [5], при прижизненном окрашивании витальными красителями происходит подкраска преобладающих в клетках гранулярных включений, они могут увеличиваться в определенных условиях при воздействии красителей.

Метиленовую синь, также являющуюся красителем основного характера, использовали следующим образом: каплю культуральной жидкости с мицелием наносили на предметное стекло, затем отсасывали культуральную жидкость и окрашивали метиленовой синью (водным раствором 1:50). Покровным стеклом препарат покрывали через 2—3 мин.

Для выявления капель жира препарат окрашивался суданом III (насыщенным спиртовым раствором) с докраской метиленовой синью.

Для выявления ядер мицелий фиксировали в течение 15 мин в жидкости Карнуа и окрашивали по методу НСI-Гимза.

Как указывает Дмитриева [3], «о характере развития грибного мицелия в глубинной культуре судят по скорости прохождения им возрастных фаз».

В наших исследованиях каждая возрастная фаза имела свои определенные признаки, наблюдаемые при использовании прижизненной окраски клетки основными анилиновыми красителями.

Однако стадии развития мицелия у *Fusarium* были не так ясно выражены, как это наблюдалось Беккер [1] у грибов—продуцентов антибиотиков. *Fusarium* в отличие от *Penicillium* в качающейся культуре образует несколько поколений конидий (так же, как и *Verticillium dahliae*, по Бондарцевой) [2]. Вследствие этого ни одна стадия, кроме исходной, не наблюдалась в чистом виде: в каждой фазе имелся также более молодой мицелий предыдущей фазы развития. Штаммы двух выбранных нами видов при прохождении фаз роста резко не отличались друг от друга. Однако у *Fus. oxysporum*, *F. gladioli* наблюдались все 6 фаз развития, хотя и не резко выраженные, а у *Fus. javanicum* var. *chrysanthemi* — *leucanthemi*, только 5 фаз. При этом у *Fus. oxysporum* f. *gladioli* в III фазе развития наступает обильное образование жира в мицелии, что не так характерно для *Fus. javanicum* var. *chrysanthemi* — *leucanthemi*.

Необходимо отметить, что наиболее характерно развитие гриба проходит в настенной пленке на пивном сусле, в то время как в глубинной культуре оно отстает в сроках. В настенной пленке у *Fus. oxysporum* наблюдались все 6 фаз развития. Это явление Бондарцева [2] для *Verticillium* объясняет тем, что глубинная культура более богата органическими веществами по сравнению с настенной пленкой, где питательных веществ задерживается меньше, по ее мнению, это и является причиной такого различия.

На минеральной среде Чапека, где гриб четко проходит 4 стадии развития, фазы роста выражены менее четко по сравнению с пивным суслом. Затем начинается набухание, утолщение гиф, образование хламидоспор.

Для *Fusarium* характерно при прохождении фаз роста образование хламидоспор в отличие от *Penicillium*, что, несомненно, отражается на прохождении мицелием всех стадий развития, т. к. при обеднении среды питательными веществами гриб начинает образовывать хламидоспоры.

Гифы при окраске витальными красителями на разных этапах развития обладают разной степенью базофилии. На первых стадиях разви-

гия в гифах имеется малое количество РНК, а на 4—5 и 8—9 сутки в вакуолях обнаруживаются гранулы кринома. При окрашивании метиленовой синью наблюдается образование темно-синих гранул. При дальнейшем росте гифы содержат крупные или мелкие капли жира в зависимости от степени развития. В старых культурах часто наблюдается жировое перерождение; или жировые гранулы находятся вместе с цитоплазматическими в цитоплазме, или же гифы полностью автолизуются. Много жира содержат споры. При окрашивании метиленовой синью конидии становятся бледно-голубыми, синими или фиолетовыми с большими золотистыми каплями жира.

Толстые, переродившиеся конидиеносцы при окраске нейтральной красной (НК) окрашиваются в ярко-розовый цвет, в их отростках часто обнаруживаются большие капли жира, которые в отростках, лишенных протоплазматического содержимого, приобретают форму глыбок, заполняя весь отросток. Хламидоспоры образуются в результате утолщения и набухания гиф в форме цепочек, они окрашены часто в голубые или голубовато-фиолетовые, лиловые тона, заполнены каплями жира вначале, но на последних этапах развития они целиком при окраске судан 3+ мет. синь окрашиваются в золотисто-желтый цвет. Непереродившиеся конидиеносцы в чисто химическом отношении похожи на гифы.

При воздействии витальными красителями (НК и МС) последние окрашивают цитоплазму в слабо-розовый и в слабо-голубой цвета, далее краситель проникает в вакуоли через тонопласт, образуя ярко-синие и ярко-красные гранулы, которые почти исчезают в III фазе. В этой фазе МС и НК окрашивают цитоплазму, а затем в IV—V фазах гранулы вновь появляются, а в VI фазе МС и НК диффузно окрашивают мицелий в светло-оранжеватый цвет. Ростковые трубки прорастающих конидий также окрашиваются диффузно, в них наблюдается базофилия, вакуоли бывают мелкими. Таким образом, мелкие гранулы возникают уже во II фазе роста, в III фазе исчезают и снова возникают в IV возрастной фазе.

В наших исследованиях обильные анастомозы между клеточными структурами наблюдаются в основном, в начальной стадии развития.

Прорастающие конидии и их ростковые трубки анастомозируют друг с другом при помощи растворения оболочек в местах слияния. Но у *F. javanicum* в культуре на качалке на 4-й день развития анастомозы наблюдались и между зрелыми гифами. Бондарцева [2] это явление объясняет тем, что на ранних этапах развития мицелия образуются гетерокариотические гифы, после некоторого времени расщепляющиеся на ветви с ядрами одного типа. Эти гомокариотические ветви снова проявляют способность к анастомозам.

В стационарной культуре гриб проходит те же стадии развития, что и на качалке, с тем отличием, что фазы роста наступают гораздо раньше. При этом культуры имеют, кроме исходной фазы, еще другие, особенно после трех дней развития. В отличие от качалки после 24 часов роста уже мало прорастающих конидий, в основном присутствуют гифы.

Нами отмечены и некоторые морфолого-культуральные особенности изучаемых видов.

В глубинной культуре на качалке оба вида грибов на среде Чапека и пивном сусле образуют комочки, более крупные на среде Чапека, чем на пивном сусле. На стенках колбы, на границе вращения жидкости, на обеих средах образуется пленка, которая после девяти-десяти суток в основном состоит из хламидоспор и автолизированных гиф.

Пленка на стенках колбы на среде с пивным суслом более обильная и шире, чем в колбах со средой Чапека.

В стационарной культуре глубинный мицелий не развивается, там наблюдается обильный поверхностный его рост.

Для обоих изученных штаммов характерно то, что конидиеносцы на среде Чапека и пивном сусле наблюдаются уже после 24 часов роста, причем на среде Чапека они уже более характерные после первых суток, чем на пивном сусле, и разветвлены. Наиболее сильное ветвление их наблюдается после трех дней развития на сусле, в основном на четвертые сутки. В первые дни ветвление их большей частью моноподиальное, а после 3-го дня уже есть многократно разветвленные конидиеносцы.

Образование хламидоспор в глубинной культуре начинается на третьи-четвертые сутки развития. Конидиеносцы и проросшие конидии, не способные к дальнейшему росту, начинают утолщаться, округляться, стенки их набухают, при окраске МС они приобретают лиловый цвет и позже постепенно превращаются в хламидоспоры. При наблюдении в микроскоп на 14-ый день видны только обильные хламидоспоры, автолизированные гифы, потерявшие свое цитоплазматическое содержимое и не перешедшие в хламидоспоры.

Конидии на всех средах типичные, многочисленные.

Кратко резюмируя изложенное, можно сказать, что развитие у обоих изученных видов *Fusarium* протекает в виде 6 фаз.

В табл. 1 приводится детальная характеристика фаз роста *Fusarium*.

Таблица 1

Фазы роста *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyd. et Hans.
f. gladioli Massey (в культурах на качалке)

Сроки наблюдения в сутках	С о с т а в с р е д ы	
	Среда Чапека	Пивное сусло
1	2	3
1	Прорастание и анастомозы конидий. Появляются новые конидиеносцы. Гифы часто с мелкими вакуолями и гранулами кринома в них. Базофилия слабая, но встречаются и сильно окрашенные, мелкогранулированные конидиеносцы. Прорастающие конидии	Прорастание и анастомозы конидий. Образование пока еще слабо-разветвленных конидиеносцев. Протоплазма сине-голубая, мелкогранулированная. Встречаются ростки и гифы с мелкими вакуолями, внутри их — мелкие гранулы. При окраске НК — протоплазма красноватая, мел-

1	2	3
	<p>анастомозируют друг с другом. I фаза.</p>	<p>когранулированная. В глубинной культуре меньше прорастающих конидий, чем в настенной пленке. I фаза. Начало II.</p>
2	<p>В гифах наблюдаются гранулы, но некрупные. Вакуоли в гифах мелкие, иногда с гранулами кринома. Сильно выраженная базофилия, обилие конидиеносцев, прорастающих конидий. II фаза.</p>	<p>По сравнению с 1-м днем очень большое количество прорастающих конидий, анастомозирующих друг с другом. Появились конидиеносцы. Наблюдается вакуолизация гиф с гранулами кринома и без них. Базофилия протоплазмы сильная. Появились темно-синие или темно-красные гранулы волютина на светло-голубом или темно-синем фоне. Цитоплазма прерывистая, у концов гиф гомогенная. В отростках гиф рядом с синими гранулами встречаются мелкие вакуоли. При окраске НК мелкогранулированная цитоплазма. Встречаются вакуоли с гранулами кринома. II фаза.</p>
3	<p>Цитоплазма прерывистая, базофильная. Часто встречаются гифы с синими гранулами, а также вакуолизированные гифы. Обилие желтых жировых капель в мицелии. В головках конидий капли оранжевые. II—III фазы.</p>	<p>Цитоплазма прерывистая, базофильная, окрашена в диффузно-розовый цвет. Встречаются гифы с крупными вакуолями, а также окрашенные в фиолетовый цвет, с гранулами. Обилие мелких жировых капель в гифах. При окраске МС гифы темно-голубые, мелкогранулированные. Иногда встречаются гифы с жировым перерождением. В глубинной культуре реакция на жир более слабая. II—III фазы.</p>
4	<p>Встречаются уродливые конидиеносцы. Реакция на жир сильнее, чем на сусле. Цитоплазма базофильная. Переродившиеся конидиеносцы окрашиваются в ярко-розовый и лиловый цвета. III фаза.</p>	<p>Цитоплазма прерывистая, местами гомогенная. В разветвленных конидиеносцах и гифах на фиолетовом фоне имеются темно-синие или темно-красные гранулы в вакуолях и между ними. Наблюдается образование хламидоспор. Реакция на жир намного слабее, чем на 3-ий день. III—IV фазы.</p>
5	<p>Большое обилие разветвленных конидиеносцев, обильные мелкие жировые включения. Усиленное образование хламидоспор. Много гиф, окрашенных в фиолетовый цвет. III—IV фазы.</p>	<p>Встречаются автолизированные гифы, наряду с ними разные другие. На темно-синем фоне крупные вакуоли, часто с гранулами кринома. Появление утолщенных гиф и образование хламидоспор. В головках прорастающих конидий и их ростковых трубках жир выражен сильно (видимо, это</p>

1	2	3
6	<p>Гифы разнообразные, автолиз мицелия. Много неравномерно окрашенных гиф с каплями и гранулами. Есть гифы, окрашенные в фиолетовый цвет, с гранулами. При окраске НК встречаются темноокрашенные гифы, конидиеносцы, много светлоокрашенных зеленовато-розоватых гиф. Жир выражен слабо, в основном в конидиях.</p> <p>Большое количество автолизированных гиф. Много гиф, окрашенных в светло- и темно-голубой цвет неравномерно. Обилие хламидоспор. Жир выражен слабо.</p>	<p>старые, не способные к дальнейшему росту конидии). При окраске НК—гифы очень слабо окрашены (желтовато-розоватый цвет с зеленоватыми каплями). Базофилия резко падает. Есть гифы, окрашенные в слабо-розовый цвет с концентрацией краски в середине. Встречаются молодые гифы мелкогранулированные, окрашенные в темно-синие или темно-розовые цвета (вторичный рост). Часто наблюдаются в гифах вакуоли с гранулами кринома. В утолщенных гифах—старых или образующих хламидоспоры, крупные золотистые капли жира. II—IV фазы.</p> <p>Автолиз гиф. Кроме светлоокрашенных, при окраске МС—встречаются мелкогранулированные гифы, темно-синие с фиолетовым оттенком. Прорастающие конидии и конидиеносцы—новые и старые, неспособные к дальнейшему росту. Они не окрашены или окрашены в темно-синий или в темно-красный цвета, с мелкими гранулами. Жир в основном в конидиях, их ростковых трубках, хламидоспорах. В глубинной культуре встречаются мелкогранулированные синие гифы, а также гифы с крупными гранулами на голубом и синем фоне. Жир содержится также в старых гифах. III—IV фазы.</p> <p>Сильный автолиз гиф. Встречаются мелкогранулированные синие гифы (вторичный рост), а также гифы с крупными гранулами. Жир в старых гифах в виде желтых капель. Много его в хламидоспорах и конидиях. При окраске НК—гифы неокрашенные или окрашенные в сплошной зеленовато-красный цвет с обильными каплями. Крупные, зеленоватые капли в утолщенных старых гифах, образующих хламидоспоры. В глубинной культуре есть прорастающие конидии с гранулами кринома в вакуолях и между ними. Жир в старых гифах, в головках конидий и хламидоспорах. II—IV фазы.</p>

1	2	3
8		<p>Обилие автолизированных гиф или светло-фиолетовых с голубоватыми каплями. Но наряду с ними очень много новообразующихся, темноокрашенных гиф с вакуолями и мелкими гранулами. Прорастающих конидий много (новых и старых, не способных к дальнейшему росту). Жир в головках конидий и в толстых—мало окрашенных гифах. При окраске НК—кроме неокрашенных гиф—много гиф окрашенных в интенсивно-розовый цвет с зеленоватыми каплями. В настенной и глубинной культурах усиленное образование хламидоспор. Базофилия от сильной до почти отсутствующей II—IV фазы.</p>
9	<p>Автолиз мицелия. Много синеекрасных гиф с вакуолями, окрашенными диффузно в синий и розовый цвет. Жир встречается в гифах, но в основном его много в конидиях и хламидоспорах V—VI фазы. Есть гифы с гранулами в вакуолях и между ними.</p>	<p>Наряду с автолизированными гифами мицелий нового поколения. Гифы с гранулами темно-красными и темносиними в вакуолях и между ними, с мелкими каплями жира. Цитоплазма прерывистая, неравномерно-окрашенная, в концах гиф гомогенная. Базофилия от сильной до отсутствующей. Обилие хламидоспор—во всех стадиях развития. Иногда встречаются гифы с вакуолями, окрашенными в диффузно-розовый цвет. II—VI фазы.</p>

Вышеуказанные фазы роста бывают не резко разграничены во времени, и поэтому в одном и том же препарате можно наблюдать одновременное существование нескольких фаз.

Заметной разницы в прохождении фаз у обоих изученных видов не наблюдалось.

Ереванский государственный университет,
кафедра низших растений

Поступило 8.VII 1971 г.

Ս. Հ. ԲԱՏԻՅԱՆ

ՈՐՈՇ ՅԻՏՈՔԻՄԻԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՊԵՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ FUSARIUM-Ի ՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՄՈՏ ԿՈՒՆԻՍԻՍՏԱՄԱՆ
ՏԱՐԲԵՐ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Fusarium-ի որոշ տեսակների և ձևերի անհատական զարգացման ուսումնասիրության ժամանակ սկսած կոնիդիոսթների ծղելու մոմենտից մինչև նոր սերնդի առաջացումը, կենսական ներկման և որոշ ցիտոքիմիական մեթոդների

կիրառման պայմաններում, պարզվել է, որ դարդացումը ուսումնասիրված տեսակների մոտ ընթանում է 6 փուլերով: Սրանք մեկը մյուսից տարբերվում են մակրո- և միկրոկոնիդիումների ծմամբ, ծիլային խողովակների և հիֆերի անաստամոզեցման աստիճանով, մետաբրոմատիկ դրանուլների առաջացմամբ, վակուոլիզացման ճարպակալման աստիճանով, և, վերջապես, հիֆերի ավտոլիզով: Առանձին տարբերություն փուլերի անցկացման միջև ուսումնասիրված տեսակների մոտ չի նկատվել:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Беккер З. Э. Физиология грибов и их практическое использование. Изд-во Московского университета, 1963.
2. Бондарцева М. А. Микология и фитопатология, т. 2, в. 3, изд-во Наука, 1968.
3. Дмитриева С. В. Автореферат канд. диссертации. М., 1966.
4. Насонов Д. Н. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение, 2-ое изд. Изд. АН СССР, 1962.
5. Ромейс. Микроскопическая техника, 1953.