

УДК:578.864

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ МІКРОКОНІДІЙ ГРИБОМ *SCLEROTINIA* *SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY

М. Й. ПІКОВСЬКИЙ, кандидат біологічних наук, доцент
<http://orcid.org/0000-0003-0689-604X>

E-mail: mprmir@ukr.net

М. М. КИРИК, доктор біологічних наук, професор

В. В. БОРОДАЙ, доктор сільськогосподарських наук, доцент

E-mail: veraboro@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0002-8787-8646>

О. В. КОЛЕСНІЧЕНКО, доктор біологічних наук, професор

<http://orcid.org/0000-0003-4767-6844>

E-mail: okolesnichenko67@gmail.com

В. І. МЕЛЬНИК, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

<http://orcid.org/0000-0002-8782-1236>

E-mail: vik4865@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України

<https://doi.org/10.31548/bio2020.01.003>

Анотація. Гриб *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary належить до небезпечних патогенів, що викликають значні економічні втрати сільськогосподарських культур. Його популяції є поліморфними за морфолого-фізіологічними та біохімічними ознаками. У біологічному циклі розвитку патоген розмножується статевим і безстатевим способом, продукуючи різні структури. Водночас особливості формування конідіальної стадії є недостатньо вивченим.

Мета дослідження – встановити особливості формування мікроконідій *S. sclerotiorum* і вивчити їхню морфологію. Об'єктами досліджень були уражені стебловою формою білої гнилі зразки рослин сої, ріпаку, соняшнику, гороху та жоржини, відібрані в різних ґрунтово-кліматичних умовах України.

Установлена здатність гриба *S. sclerotiorum* продукувати *in vitro* мікроконідії різними шляхами: на поодиноких видовжених, септованих конідієносцях, довжиною 100–250 мкм і групами на коротких конідієносцях, розташованих на гіфах, товщиною 8–12 мкм. Вони утворювалися у вигляді ланцюжків на конідієгенних клітинах – фіалідах, товщина яких становила 6–8 мкм, а довжина 15–25 мкм. Розмір мікроконідій – 4–5 мкм, вони гіалінові, мали кулясту форму з вираженою оболонкою та з вкращенням у центрі. Виявлена закономірність утворення даного спороношення тільки за культивування міцелію несумісних ізолятів, незалежно від рослини-живителя з якої вони вилучені. Подальші дослідження спрямовані та встановленні ролі мікроконідій у біологічному та інфекційному циклах патогену.

Ключові слова: мікроконідії, *Sclerotinia sclerotiorum*, міцелій, спороношення, несумісність ізолятів

Актуальність. На структуру популяцій фітопатогенних грибів значною мірою впливає тривала коеволюція мікроміцетів некротрофного типу живлення та рослин-господарів. Гриб *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Vary більше століття привертає увагу багатьох дослідників (Boland, Hall, 1994), оскільки є поширеним на багатьох культурах (Кутук, Піковський, Азаїкі, 2012), належить до небезпечних патогенів, що викликають значні економічні втрати сільськогосподарських культур. Загалом він уражує сотні різних видів рослин (Кирик, Элланская, Бородай, 2010). Популяції *S. sclerotiorum* є поліморфними за морфолого-фізіологічними та біохімічними ознаками, генами вегетативної сумісності, вірулентності, агресивності та іншими ознаками. У біологічному циклі розвитку гриб розмножується статевим і безстатевим способом, продукуючи різні структури (склеротії, міцелії, апотеції з аскоспорами та мікроконідії). Водночас особливості формування конідіальної стадії (мікроконідій) залишається недостатньо вивченим (Vinod Kumar et al., 2015).

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Наявність мікроконідій є притаманною багатьом аскоміцетам (Watanabe, 2002). Сучасні дослідження розкривають різні аспекти цих структур. Наприклад, Чжан Х. зі співавторами (Zhang et al., 2014) встановили, що приблизно 10 % мікроконідій *Magnaporthe oryzae* проростає на поверхнях рослин і приймає участь у патогенезі. Проростання мікроконідій у *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* та *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* стимулює утворення специфічних кореневих ексудатів томатів (Steinkellner, Mammeler, Vierheilig, 2005). Як вказує у своїй роботі Maheshwari Ramesh (Maheshwari Ramesh, 1999), умови оточуючого середовища, що сприяють формуванню мікроконідій у гриба *Neurospora crassa* і закономірність їхнього розвитку досить відрізняються від умов для макроконідій.

Водночас аналіз наукової літератури засвідчує, що умови формування мікроконідій грибом *S. sclerotiorum* залишаються мало дослідженими, а їхнє значення є дискусійним (Bolton, Thomma, Nelson, 2006; Vinod Kumar et al., 2015).

Мета дослідження – встановити особливості формування мікроконідій *S. sclerotiorum* та вивчити їхню морфологію.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктами досліджень були уражені стебловою формою білої гнилі зразки рослин сої, ріпаку, соняшнику, гороху та жоржини, відібрані в різних ґрунтово-кліматичних умовах України. Дослідження проводили в проблемній науково-дослідній лабораторії "Мікології і фітопатології". Для вилучення ізолятів *S. sclerotiorum* склеротії поверхнево стерилізували 70 % етиловим спиртом протягом 2 хв., промивали в стерильній дистильованій воді, просушували між шарами стерильного фільтрувального паперу та в асептичних умовах розкладали в чашки Петрі на картопляно-глюкозний агар (КГА). Надалі їх інкубували в термостаті за температури 22–24 °C протягом 3 діб. Після чого з кожного ізоляту з кінчиків гіфальних культур гриба проводили відсів на КГА. Надалі із чотирьох денної культури з краю активно ростучої колонії *S. sclerotiorum* корковим свердлом відбирали агарові диски діаметром 5 мм і попарно розміщували їх на КГА. Серед ізолятів були обрані всі можливі комбінації. Також було оцінено взаємовідносини в межах кожного ізоляту (Devasahayam, Henry, 2009; Vinod Kumar et al., 2015). Через 5 діб культивування, щоденно здійснювали мікроскопічний аналіз зон взаємодії міцелію різних ізолятів. Візуально сумісність або несумісність була оцінена через 10 днів після інкубування культур за температури 24 °C.

Результати дослідження та їх обговорення. Явище продукування мікроконідіального спороношення грибом *S.*

sclerotiorum уперше виявлено у варіантах із міцеліальною несумісністю ізолятів. За відмічених вище умов, початок формування мікроконідій відбувалося на десяту добу інкубування культур. Виявлена закономірність утворення даного спороношення тільки за культивування ізолятів, які були несумісними. Даний тип безстатевих спор формувалася в зоні взаємодії міцелію несумісних ізолятів незалежно від рослини-живителя, з якої вони вилученні.

Макроскопічний огляд зон формування мікроконідій дозволив виявити їх у вигляді поодиноких крапкоподібних, або скупчених, світлих, слизистих утворень (рис. 1а), які містилися серед вегетативних гіф міцелію гриба. Мікроконідії утворювалися двома способами. На довгих (100–250 мкм), поодиноких, септованих конідієносцях (рис. 1б, в), або коротких конідієносцях, групами, розташованих на гіфах (товщи-

ною 8–12 мкм) (рис. 1г). В обох випадках також формувалися конідієгенні клітини – пляшкоподібні фіаліди, товщиною 6–8 мкм та довжиною 15–25 мкм (рис. 1г, д), на верхівках яких містилися мікроконідії у вигляді ланцюжків. Мікроконідії мали кулясту форму, розміром 4–5 мкм (рис. 1е, є) з чітко вираженою оболонкою, гіалінові, з вкрапленням у центрі.

У науковій літературі наявна інформація про різні способи формування мікроконідій. Так, у дослідженнях Л. М. Кон (Kohn, 1979) мікроконідії утворювалися на повітряному міцелії, на поверхні склероціїв і гіменіальній поверхні апотеціїв. Також вказується на можливість ендogenous та екзогенного формування мікроконідій на коротких гіфах (Bolton, Thomma, Nelson, 2006). Конідіальне спороношення *S. sclerotiorum* виявили М. М. Кирик, І. А. Елланська та В. В. Бородай (Кирик,

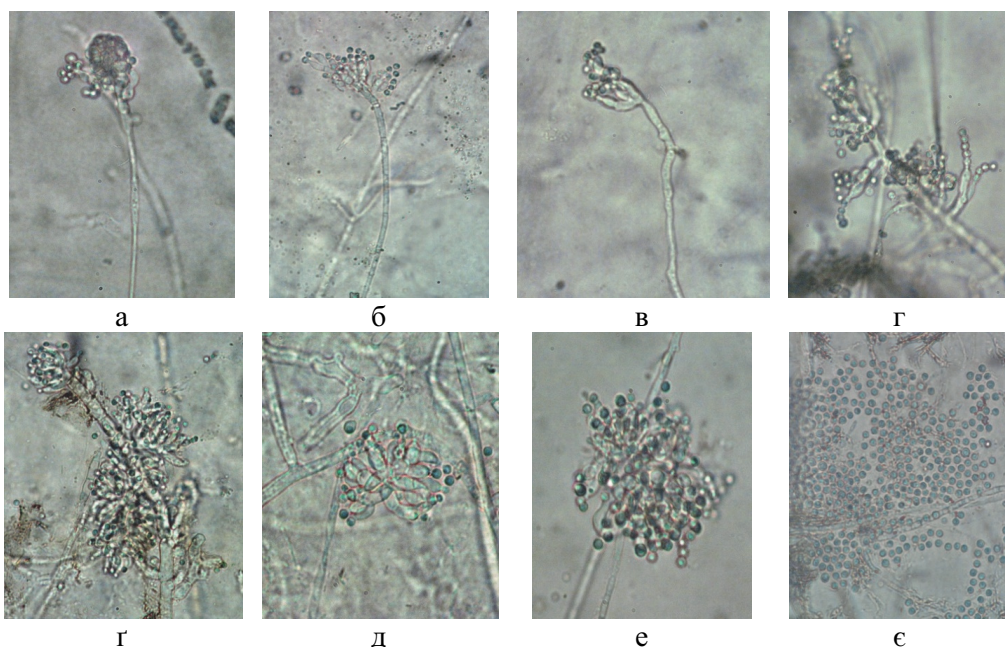


Рис. 1. Морфологічні особливості формування мікроконідіального спороношення *S. sclerotiorum*: а, б, в – утворення мікроконідій на довгих конідієносцях (х 750); г – спори у вигляді ланцюжків на коротких конідієносцях (х 750); г – скупчення на гіфах фіалід з мікроконідіями (х 900); д – фіаліди (х 1000); е – мікроконідії у вигляді грона (х 950); є – загальний вигляд розсіяних мікроконідій (х 950)

Элланская, Бородай, 2010) під час інкубування інокульованих подрібненими склероціями дисків коренеплодів моркви за температури 20–25 °С. Автори (Кирик, Элланская, Бородай, 2010) вказують, що на 3–4 добу на субстраті спостерігали утворення пишного білого ватоподібного міцелію; на 5 добу на ньому було виявлено початок формування склероціїв, поруч із котрими на 7–8 добу утворювалися конідіеносці з мікроконідіями. Вінод Кумар С. та ін. (Vinod Kumar et al., 2015), вивчаючи біологію та інфекційний цикл *S. sclerotiorum*, що викликає загнивання стебел гвоздики в Індії, крім аскоспор, спостерігали також спермації або мікроконідії, які були поодинокі прикріплені до фіалідів. Також вказується на здатність тільки окремих штамів гриба формувати мікроконідії *in vitro* на селективних середовищах (Sleight Belinda, 2001).

Згідно з нашими дослідженнями у витяжках різної концентрації із соку бульб *Solanum tuberosum* L., листків *Brassica napus* L., *Glycine max* L., *Dahlia* Cav., а також у дистильованій воді, розчинах глюкози та сахарози (1,0; 3,0 та 5,0 %) проростання мікроконідій не виявлено. Отримані дані узгоджуються із літературними щодо складності проростання мікроконідій (Kohn, 1979) та формування протягом тривалого періоду слабозвинутих зародкових трубок (Sleight Belinda, 2001).

Водночас роль мікроконідій у біологічному циклі розвитку гриба залишається малодослідженою та дискусійною. Зокрема, не встановлено їхню сперматизаційну функцію (Kosasih, Willetts, 1975; Vinod Kumar et al., 2015) та роль у вегетативному розмноженні (Devasahayam, Henry, 2009). Ці питання потребують подальшого вивчення.

Висновки й перспективи. Встановлена здатність гриба *S. sclerotiorum* продукувати *in vitro* мікроконідії різними шляхами: на поодиноких видовжених, септованих конідіеносцях, довжиною 100–250 мкм і на коротких конідіеносцях, групами, розташованих на гіфах, товщиною 8–12 мкм.

Мікроконідії утворювалися у вигляді ланцюжків на конідієгенних клітинах – фіалідах, товщина котрих становила 6–8 мкм, а довжина 15–25 мкм. Розмір мікроконідій становив 4–5 мкм, вони мали кулясту форму, з вираженою оболонкою, гіалінові, з вкрапленням у центрі.

Виявлена закономірність утворення даного типу безстатевих спор тільки за культивування вегетативно несумісних ізолятів, незалежно від рослини-живителя з якої вони вилучені.

Вивчення біологічних особливостей отримання спороношення *S. sclerotiorum* та його ролі в біологічному та інфекційному циклах патогену є маловивченими та потребують подальших досліджень.

References

1. Boland G. J., Hall R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Plant Path. Vol. 16. № 2. PP. 94–108.
2. Bolton M. D., Thomma B. P. H. J., Nelson B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol Plant Pathol. Vol. 7. № 1. PP. 1–16. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x PMID: 20507424
3. Devasahayam H. L., Henry L. D. C. (2009). Illustrated Plant Pathology: Basic Concepts. New India Publishing Agency. PP. 104–105.
4. Irani, Hossein, Heydari, Asghar, Javan-Nikkhah, Mohammad, brahimov, A av li. (2011). Pathogenicity Variation and Mycelial Compatibility Groups in *Sclerotinia Sclerotiorum*. Journal of plant protection research. Vol. 51. № 4. PP. 229–236.
5. Kirik N. N., Ellanskaya I. A., Borodai V. V. (2010). Konidial'noye sporonosheniye griba *Sclerotinia sclerotiorum* – vzbuditelya beloy gnili morkovi [Conidial stage of *Sclerotinia sclerotiorum* – a pathogen causing white rot of carrots]. Mikologiya i Fitopatologiya. Vol. 34. № 3. PP. 56–57. (in Russ.).

6. Kohn L. M. (1979). A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon. Vol. 9. № 2. PP. 365–444.
7. Kosasih B. D., Willetts H. J. (1975). Ontogenetic and Histochemical Studies of the Apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. Annals of Botany. Vol. 39, Issue 2. PP. 185–191. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084928>
8. Kyryk M. M., Pikovskiy M. Y., Azaiki S. (2012). Diagnostic signs of diseases of vegetable crops and potato. Kyiv: Phenix. 175 p.
9. Maheshwari, Ramesh. (1999). Microconidia of *Neurospora crassa*. Fungal genetics and biology. Vol. 26. № 1. PP. 1–18. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1103>
10. Sleight Belinda E. (2001). An investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* as a containable mycoherbicide. A thesis submitted in fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. Lincoln University. PP. 147–149.
11. Steinkellner S., Mammerler R., Vierheilig H. (2005). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. Journal of Plant Interactions. Vol. 1. № 1. PP. 23–30. DOI: 10.1080/17429140500134334
12. Vinod Kumar S., Ponnusamy, Rajeshkumar, Sevugapperumal, Nakkeeran & Aiyathan, Eraivan. (2015). Developmental biology and infection cycle of *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of carnation in India. African journal of microbiology research. 9 (49). PP. 2328–2336. DOI: 10.5897/AJMR2015.7690.
13. Watanabe T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Second Edition. CRC Press LLC. 486 p.
14. Zhang H., Wu Z., Wang C., Li Y., Xu J.-R. (2014). Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Nat. Commun. № 5. PP. 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5518>

SUMMARY

M. Y. Pikovskiy, M. M. Kyryk, V. V. Borodai, O. V. Kolesnichenko, V. I. Melnyk. FEATURES OF THE FORMATION OF MICROCONIDIA BY THE FUNGUS SCLEROTINIA SCLEROTIORUM (LIB.) DE BARY. Biological Resources and Nature Managment. 2020. 12, №1–2. P.21–26. <https://doi.org/10.31548/bio2020.01.003>

Abstract. The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary belongs to dangerous pathogens that cause significant economic losses of crops. Its populations are polymorphic in morphological, physiological and biochemical characteristics. In the biological cycle of development, the pathogen reproduces sexually and asexually, producing various structures. At the same time, the features of the formation of the conidial stage are not well understood.

The purpose of the study was to establish the features of the formation of microconidia by *S. sclerotiorum* fungus and study their morphology. The objects of research were samples of soybean, rapeseed, sunflower, pea, and dahlia plants affected by the stem form of white mold, taken in various soil and climatic conditions of Ukraine.

The ability of *S. sclerotiorum* fungus to produce microconidia in vitro in various ways was established:

on individual elongated, septated conidiophores, 100–250 µm long and on the short conidiophores located in groups, on hyphae, 8–12 µm thick. Spores formed in the form of chains on conidiogenic cells – phialids, the thickness of which was 6–8 microns and a length of 15–25 microns. The size of the microconidia was 4–5 microns, they had a spherical shape, with a pronounced membrane and interspersed in the center, were hyaline the revealed regularity of the formation of this sporulation was obtained only during the cultivation of incompatible isolates. This type of asexual spores formed in the zone of interaction of the mycelium, regardless of the host plant from which they were isolated. Further studies are aimed at establishing the role of microconidia in the biological and infectious cycles of the pathogen.

Key words: microconidia, *Sclerotinia sclerotiorum*, mycelium, sporulation, incompatibility of isolates

АННОТАЦІЯ

М. Й. Піковський, Н.Н. Кирик, В. В. Бородай, О. В. Колесніченко, В. І. Мельник. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОКОНИДИЙ ГРИБОМ SCLEROTINIA SCLEROTIORUM (LIB.) DE BARY. Биоресурсы и природопользование. 2020. 12, №1–2. P.21–26. <https://doi.org/10.31548/bio2020.01.003>

Аннотация. Гриб *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Barv относится к опасным патогенам, вызывающим значительные экономические потери сельскохозяйственных культур. Его популяции являются полиморфными по морфолого-физиологическим и биохимическим признакам. В биологическом цикле развития патоген размножается половым и бесполом способом, образуя различные структуры. В то же время особенности формирования конидиальной стадии недостаточно изучено.

Цель исследования – изучить условия формирования микроконидий грибом *S. sclerotiorum* и их морфологию. Объектами исследований были пораженные стеблевой формой белой гнили образцы растений сои, рапса, подсолнечника, гороха и георгины, отобранные в различных почвенно-климатических условиях Украины.

Установлена способность гриба *S. sclerotiorum* производить *in vitro* микроконидии различными путями: на отдельных удлиненных, септирован-

ных конидиеносцах, длиной 100–250 мкм и на коротких конидиеносцах, расположенных группами, на гифах, толщиной 8–12 мкм. Споры образовывались в виде цепочек на конидиогенных клетках – фиалидах, толщина которых составляла 6–8 мкм, а длина 15–25 мкм. Размер микроконидий составлял 4–5 мкм, они имели шарообразную форму, с выраженной оболочкой, с гиалиновым оттенком и с вкраплением в центре. Закономерность образования данного спороношения установлена только при культивировании несовместимых изолятов. Данный тип бесполого спор формировался в зоне взаимодействия мицелия, независимо от растения-хозяина с которого они выделены. Дальнейшие исследования направлены на установление роли микроконидий в биологическом и инфекционном циклах патогена.

Ключевые слова: микроконидии, *Sclerotinia sclerotiorum*, мицелий, спороношение, несовместимость изолятов