



УДК 581.4:582.28

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *EREMOTHECIACEAE*

Е.Ф. Семенова
А.И. Шпичка

Пензенский государственный
университет, 440026, г. Пенза,
ул. Красная, 40
e-mail: seft1957@mail.ru

Выявлены макро- и микроморфологические особенности 2 видов семейства *Eremotheciaceae*. В сравнительном аспекте дана морфологическая характеристика мицелия на разных стадиях роста и развития.

Ключевые слова: *Eremothecium ashbyi* Guilliermond, *Eremothecium gossypii* Kurtzman, макро- и микроморфология, культура in vitro.

Введение

Как известно, представители семейства *Eremotheciaceae* являются фитопатогенами, они развиваются на плодах, вызывая так называемые стигматомикозы. Виды рода *Eremothecium* паразитируют на коробочках хлопчатника и образуют мицелий ярко-желтого цвета, обусловленного накоплением рибофлавина. Промышленные штаммы *E. ashbyi* и *E. gossypii* являются сверхсинтетиками витамина В₂ [1]. Кроме того, было обнаружено, что виды рода *Eremothecium* также способны синтезировать эфирное масло, основными компонентами которого являются гераниол (69,5...84,9 %) и β-фенилэтанол (12,7...27,7 %), а минорными - нерол, цитронеллол, нераль и гераниаль, что свидетельствует о сходстве изучаемого масла с эфирным маслом из свежих цветков розы. Количество эремотециевого масла достигает 180 мг/л культуральной жидкости в течение первых двух суток роста на ферментационной среде, что сопоставимо с содержанием розового эфирного масла в 500...600 г ферментированных цветков [2-5].

Целью данного исследования является изучение макро- и микроморфологических особенностей некоторых видов семейства *Eremotheciaceae*.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили штаммы *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКМ F-124, ВКМ F-3009 (мутант, получен селекционным путем из штамма ВКМ F-124) и *Eremothecium gossypii* (S.F.Ashby et W.Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним *Ashbya gossypii* (S.F.Ashby et W.Nowell 1926) Guilliermond 1928) ВКМ F-1398, ВКМ F-3276 (мутант, получен путем отбора из штамма ВКМ F-1398), ВКМ F-3296. Данные микроорганизмы относятся к царству *Fungi*, типу *Ascomycota*, классу *Endomycetes*, порядку *Saccharomycetales*, семейству *Eremotheciaceae* [6,7].

Изучаемые штаммы поддерживали на скошенной агаризованной среде, содержащей соевую муку (4%) и сахарозу (1%) [5], сусло-агаре, агаре Сабуро, картофельно-глюкозном агаре, мясо-пептонном агаре, среде Чапека, питательном агаре [1]. Морфологию поверхностных культур исследовали под микроскопом БИОМЕД-3 (кратность увеличения 10, 40, 100) в окрашенных метиленовым синим, черной тушью микропрепаратах. Фотографирование осуществляли аппаратом Panasonic DMC-FX100 с объективом Lumix 12 mega pixels.

Результаты и обсуждение

Макроморфология. *E. ashbyi* на твердой агаризованной среде образует плоские матовые (позднее глянцевые) колонии желтого цвета, легко снимающиеся с агара. Форма колоний округлая, диаметром 8...12 мм (на сусло-агаре через 3 сут. роста при 27±1°C). На мясо-пептонном, питательном агарах и агаре Сабуро пигментация изучае-



мых штаммов менее выражена по сравнению с глюкозо-картофельным агаром, сусло-агаром, средой Чапека.

Следует отметить, что популяция штамма *E. ashbyi* ВКМ F-124 была наиболее гетерогенна, по сравнению с другими изучаемыми штаммами, по некоторым морфологическим показателям отдельных колоний (диаметру, пигментации и др.).

E. gossypii образует колонии, которые на сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре, среде Чапека с кукурузным экстрактом через 3 суток роста при температуре $27\pm 1^\circ\text{C}$ достигают 6 мм, пигментированы, желтого цвета с четким краем. Форма колоний округлая, они плоские, матовые, плотные, с агара легко снимаются петлей в виде пленки. Спустя 10 суток светло-желтые, слегка выпуклые в середине, с поверхностно-разбросанным бесцветным краем. Пигмент (рибофлавин) окрашивает среды в желто-коричневые тона. Рост по штриху на среде Чапека – скудный, сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре – умеренный, на среде Чапека с кукурузным экстрактом, питательном агаре – хороший.

Микроморфология. *E. ashbyi* имеет дихотомически ветвящийся мицелий, состоящий из многоядерных клеток, желтеющий с возрастом. Окраска мицелия обусловлена присутствием рибофлавина, который накапливается в таких количествах, что может выпадать в виде кристаллов в вакуолях. Диаметр гиф варьирует в пределах 2,5...16,5 мкм. При старении некоторые клетки становятся спорогенными. Конидии веретеновидные. Спорангии продолговатые, многоспоровые, в цепочках, но иногда и одиночные, 65-90x14-20 мкм, в них свободно расположены аскоспоры, которые высвобождаются и прорастают после разрыва оболочки аска. Споры булавовидно-игловидные, прямые или часто изогнутые, простые, часть споры сужается к концу и лишена гранул. Размеры аскоспор составляют: длина – 20,2...26,7 мкм, диаметр – 2,5...2,8 мкм.

E. gossypii образует гифы, часто вакуолизированные и содержащие многочисленные включения, сначала несептированные, при старении септированные, дихотомически ветвящиеся. Вегетативное размножение осуществляется латеральными конидиями или поперечным расщеплением гифы. У некоторых штаммов участки гиф становятся раздутыми и толстостенными. Аски (спороносные сумки, спорангии) многочисленны, одиночные, в группах или цепочках, 100-200x10-20 мкм, вакуолизированные или содержащие гранулированную протоплазму. Их форма от булавовидной до цилиндрической или более часто сигмоидальная. Аскоспоры параллельно сгруппированы в 2 или более грозди из 2 или 6, уложенные по длине аска; количество их составляет от 4 до 32 на аск. Размеры аскоспор – 25-37x2-5 мкм; форма от игловидных до веретеновидных, часто с тонкой септой в центре.

При культивировании изучаемых штаммов на твердых питательных средах существенных отличий микроморфологических показателей не наблюдалось. В вегетативных гифах суточной культуры (экспоненциальная фаза роста) присутствуют липосомы. Выраженная вакуолизация мицелия отмечается в период 36...48 часов культивирования. Спорогенез начинается при старении культуры, не ранее стационарной фазы (48...60 часов роста): аски с аскоспорами образуются интеркалярно, а почкующиеся клетки (конидии) – терминально или латерально на гифах мицелия. Сумки разрываются или автолизуются для высвобождения зрелых аскоспор, начиная со стационарной фазы роста и развития культуры.

В результате проведенного микроскопического анализа не было выявлено существенных отличий по микроморфологическим показателям между *Eremothecium ashbyi*, *Eremothecium gossypii* (*Ashbya gossypii*, *Nematospora gossypii*), что подтверждает предложенную Kurtzman'ом таксономическую классификацию, основанную на результатах дивергенции последовательностей рибосомальной РНК и рибосомальной ДНК, и позволяет отнести их к одному роду семейства *Eremotheciaceae* [6,7].

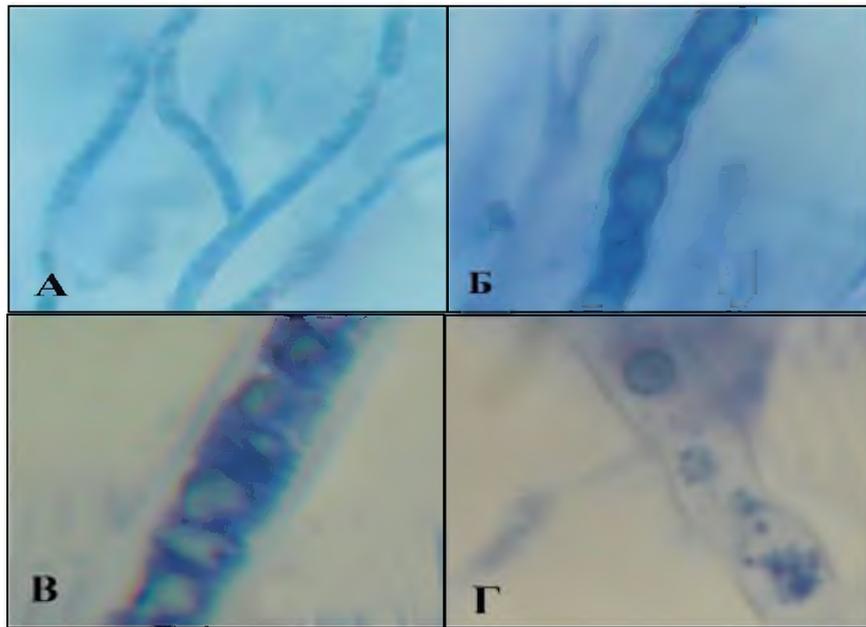


Рис. 1. Мицелий в процессе развития: *А* – экспоненциальная фаза;
Б – фаза замедления роста; *В* – стационарная фаза;
Г – начало фазы отмирания (увеличение 4х100, окраска метиленовым синим)



Рис. 2. Аскопоры (увеличение: слева 4х40, справа 4х100; окраска метиленовым синим)



Рис. 3. Слева – толстостенные вздутия (выросты), расположенные латерально на гифах мицелия; справа – участок гифы мицелия с межклеточной перегородкой – септой (увеличение 4х100, окраска метиленовым синим)



Рис. 4. Липидные капли в гифах мицелия
(увеличение 4х100, негативный способ окраски тушью)

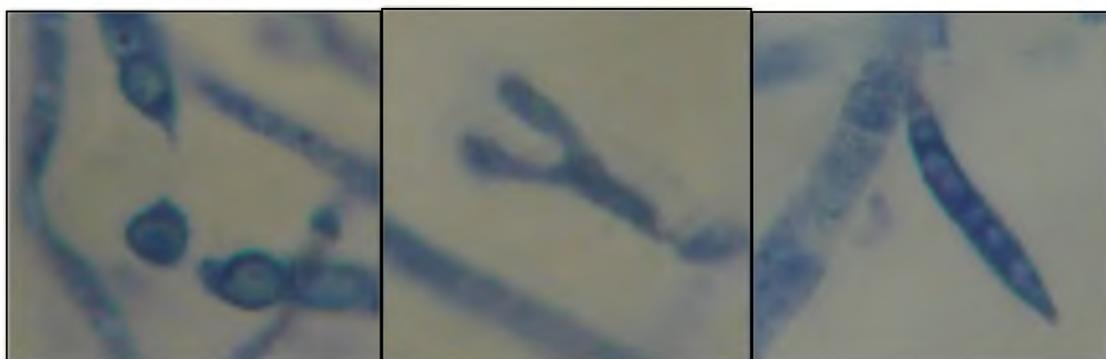


Рис. 5. Слева – почкующиеся дрожжеподобные клетки;
в центре – дихотомическое ветвление гифы мицелия;
справа – веретеновидные конидии (увеличение 4х100, окраска метиленовым синим)

Таким образом, для изучаемых видов характерны следующие морфологические признаки: возможное при определенных условиях культивирования наличие почкующих, мультилатеральных на тонком основании клеток шаровидной, яйцевидной, эллипсоидальной или цилиндрической формы; образование конидий и присутствие псевдогиф и истинных гиф; колонии гладкие или матовые белого или желтого цвета; аски содержат 4-32 веретеновидных или игольчатых аскоспоры, часто изогнутые, имеющие центральную септу и иногда клиновидное, терминальное утолщение клеточной стенки, что согласуется с данными приведенными в научной литературе [2-4, 6,7].

Выводы

1. Макроморфологическими особенностями *Eremothecium ashbyi* являются более крупные (в 1,5-2 раза) по сравнению с *E. gossypii* матовые колонии на твердых питательных средах, которые становятся глянцевыми при культивировании свыше 3 суток.

2. В условиях поверхностного культивирования штаммов видов *Eremothecium ashbyi* и *Eremothecium gossypii* на твердых питательных средах микроморфологических отличий не выявлено; определены общие признаки: возможность наличия почкующих, мультилатеральных на тонком основании клеток шаровидной, яйцевидной, эллипсоидальной или цилиндрической формы; образования конидий и присутствия псевдогиф; наличия асков с веретеновидными или игольчатыми аскоспорами, часто изогнутыми и септированными.



3. Сравнительный макро- и микроскопический анализ показал, что не имеется существенных морфологических отличий между *Eremothecium ashbyi*, *Eremothecium gossypii* (*syn. Ashbya gossypii*, *Nematospora gossypii*), что подтверждает предложенную Kurtzman'ом таксономическую классификацию дрожжеподобных и мицелиальных грибов и позволяет отнести их к одному роду семейства *Eremotheciaceae*.

Список литературы

1. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1973. – 242 с.
2. А.с. 1454845 СССР. Штамм гриба *Eremothecium ashbyi* ВКМФ-3009Д – продуцент эфирного масла / Семенова Е.Ф., Родов В.С., Бугорский П.С. (СССР) Заявл. 28.07.87. Опубл. 30.01.89, БИ № 4.
3. А.с. 1794948 СССР. Штамм гриба *Ashbya gossypii* ВКМФ – 3276Д – продуцент эфирного масла / Семенова Е.Ф., Бугорский П.С., Радзимовская С.Б. (СССР). Заявл. 23.08.90. Опубл. 15.02.93, БИ № 6.
4. О биосинтезе компонентов эфирного масла грибом *Eremothecium ashbyi* (структурно-функциональные особенности) / Погорельская А.Н., Бугорский П.С., Семенова Е.Ф., Бузулукова Н.П., Горнунг Е.И. // Вестник Российской академии с.-х. наук, 2003. - № 1.- С. 83-85
5. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. // Известия вузов. Поволжский регион, 2007.-Серия «Медицинские науки», № 4.-С. 44 – 50.
6. The yeast, a taxonomic study. Ed. by Kurtzman C.P., Fell J. W. Fourth Edition, Elsevier Science, 1998. - 1055 p.
7. Kurtzman C.P. Relationships among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* determined from rDNA sequence divergence// Journal of Industrial Microbiology, 1995. - Vol.14.- P. 523-530.

MORPHOLOGICAL RESEARCH OF SOME REPRESENTATIVES OF FAMILY *EREMOTHECIACEAE*

E.F. Semenova

A.I. Shpichka

*The Penza State University, 40,
Krasnaya st., Penza,
440026, Russia*

e-mail: sef1957@mail.ru

The macro- and micromorphological features of 2 species of family *Eremotheciaceae*. are revealed. The mycelium morphological characteristic on different stages of growth and development is given in comparative aspect.

Key words: *Eremothecium ashbyi* Guilliermond, *Eremothecium gossypii* Kurtzman, macro- and micromorphology, culture *in vitro*.