

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра ботаники**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к занятиям спецпрактикума по разделу
«Микология. Методы экспериментального изучения
микроскопических грибов»
для студентов 4 курса дневного отделения специальности
«G 31 01 01 — Биология»

**МИНСК
2004**

УДК [632.4+581.24+582.28].08(075.8)

ББК

С41

А в т о р ы – с о с т а в и т е л и:

В.Д. Поликсенова, А.К. Храмцов, С.Г. Пискун

Р е ц е н з е н т :

доцент кафедры микробиологии
биологического факультета Белгосуниверситета
канд.биол. наук Желдакова Р.А.

Рекомендовано Ученым Советом
биологического факультета
28 июня 2004 г., протокол № 11

С41 **Методические** указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 курса дневного отделения специальности «G 31 01 01 – Биология» / Авт.-сост. В.Д. Поликсенова, А.К. Храмцов, С.Г. Пискун. – Мн.: БГУ, 2004. – 36 с.

Изложены общие методические указания к выполнению заданий на занятиях спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов».

Для студентов 4 курса дневного отделения специальностей «G 31 01 01 — Биология».

УДК [632.4+581.24+582.28].08(075.8)

ББК

ВВЕДЕНИЕ

Спецпрактикум представляет собой часть учебного процесса специализирующихся студентов, в рамках которого запланирована самостоятельная работа студентов.

Один из разделов спецпрактикума – «Экспериментальное изучение микроскопических грибов» (40 ч.), который в отличие от других разделов, предусматривает изучение объектов и явлений опытным путем. Предметом исследований студентов в данном разделе спецпрактикума являются микроскопические грибы, вызывающие болезни растений, и поэтому представляющие собой большой практический интерес. Согласно плану работы студенты должны научиться планировать и проводить биологические эксперименты, получить, обработать и проанализировать экспериментальные данные.

Начало развития экспериментальной микологии относится к концу XIX века. Этому предшествовал длительный и примечательный выдающимися открытиями период изучения цитологии, экологии грибов, их онтогенеза и циклов развития, период создания основ научной фитопатологии. В результате микология из описательной науки, занимающейся изучением только морфологии и систематики, превратилась в экспериментальную, изучающую роль грибов в природе и практической деятельности человека.

Современная экспериментальная микология характеризуется сочетанием классических и новых методов исследования организмов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Огромнейшие возможности изучения и регуляции процессов жизнедеятельности грибов открывает техника культивирования микроорганизмов, базирующаяся на современных биохимических и физико-химических методах исследования грибов. Культивирование облигатных фитопатогенных грибов (ржавчинных, головневых, мучнисторосяных и др.), в частности, позволило выяснить тонкие механизмы заболеваний и защитных реакций растения-хозяина. Изучение биосинтетической способности грибов привело к выделению сложных по химической природе и специфических по биологическим свойствам метаболитов. Широкое применение в практике нашли различные ферменты грибов, активные по отношению к большинству известных субстратов.

Одним из основных вопросов в области изучения биологически активных метаболитов грибов является выявление условий их максималь-

ного биосинтеза, разработка методов получения препаратов из них с целью всестороннего изучения свойств.

Большинство видов микроскопических грибов в значительно меньшей степени, чем бактерии, требовательны к наличию в среде сложных органических веществ – белков, аминокислот, витаминов. Перспективно изучение возможности использования грибов для превращения трудно усваиваемых субстратов, биосинтеза биологически активных веществ в экстремальных условиях.

До последнего времени уделялось чрезвычайно мало внимания изучению физиологических свойств и морфологии грибов, условий вегетативного роста и образования репродуктивных органов в связи с их биосинтетической активностью. Тем не менее, идентификация специфических метаболитов (гормонов), обуславливающих дифференциацию мицелия в связи с образованием репродуктивных органов, играет весьма важную роль в регулировании жизнедеятельности грибов.

При изучении этих и многих других вопросов исследователь неизменно сталкивается с методами выделения грибов из определенных субстратов, их культивированием, определением жизнеспособности, роста и биосинтетической активности и др.

Основоположником отечественной экспериментальной микологии является Н. А. Наумов. Созданное им руководство «Методы микологических и фитопатологических исследований» (1937 г.) относится к библиографической редкости.

К моменту отработки раздела спецпрактикума «Экспериментальное изучение микроскопических грибов» студенты-биологи уже имеют должную теоретическую и практическую подготовку по базовым курсам «Альгология и микология», «Морфология растений», «Физиология растений», «Микробиология». Имеющиеся у студентов знания и навыки являются основой в приобретении и закреплении новых. Самостоятельной постановке эксперимента предшествует детальное теоретическое и практическое пояснение материала преподавателем.

Каждый студент решает одинаковую задачу на примере разных видов грибов, что позволяет в конце эксперимента обобщить полученные данные для целого ряда фитопатогенов, различающихся конкретными свойствами.

Поставленные задачи предусматривают углубленное самостоятельное изучение студентами научной литературы, организацию рабочего места, правильное планирование рабочего времени. Это обязывает сту-

дентов согласно их конкретному эксперименту осуществлять наблюдения и контроль опыта по конкретному графику, который может не совпадать с расписанием учебных занятий. На протяжении эксперимента роль преподавателя сводится к консультации студентов по возникающим в ходе опыта вопросам.

Контроль за работой студентов осуществляется в форме проверки и обсуждения оформленных отчетов о проведенных исследованиях. Обычно предпоследнее занятие по указанному разделу спецпрактикума отводится на пояснение и консультацию студентов по вопросам составления отчета, сведению данных опыта в таблицы, графики, диаграммы, плана анализа полученных результатов, требованиям к оформлению научной работы подобного рода.

Итоговое занятие по указанному разделу посвящается публичному выступлению каждого студента-исследователя по материалам отчета о проделанной работе. При этом обобщаются данные, полученные всеми студентами, формулируются выводы, касающиеся закономерностей роста и развития целой группы микроскопических грибов. Публичная презентация материала обязывает студента самостоятельно продумать наглядности, необходимые для полного восприятия информации слушателями, позволяет сравнить полученные данные и завязать научную дискуссию, обобщить материал всех студентов-исследователей, что чрезвычайно важно при работе в научном коллективе.

Подобная организация работы на спецпрактикуме является хорошей базой для последующих самостоятельных научных изысканий, при подготовке отчетов о летних учебных и производственных практиках, подготовке курсовых и дипломных работ, а также в освоении курсов «Микология», «Фитопатология», «Иммунитет растений».

Для проведения экспериментальных микологических исследований в рамках спецпрактикума необходимо иметь следующее оборудование и материалы:

- автоклав;
- термостаты;
- сушильный шкаф;
- весы для взвешивания компонентов среды;
- бактерицидную лампу;
- спиртовку или газовую горелку;
- набор колб термостойких объемом 0,5 л, 1 л и флаконов по 0,5 л для стерилизации сред;

- мерный цилиндр или стакан;
- стеклянную воронку;
- шпатель;
- марлю для фильтрации сред;
- водяную баню;
- чашки Петри;
- пробирки с ватно-марлевыми пробками;
- фильтровальную бумагу;
- стеклограф или тушь;
- иглы и бактериальные петли для пересева грибов;
- скальпель, пинцет, пипетки;
- пробочное сверло;
- счетные камеры Горяева (или аналогичные им);
- штативы для пробирок;
- стекла или пластиковые диски;
- микроскопы.

В зависимости от того, какие грибы используются в эксперименте и каковы его задачи, необходимы разные субстраты для приготовления питательных сред.

ЗАНЯТИЕ 1

Тема: Общие правила, методы выделения в чистую культуру и культивирование грибов

Цель: Ознакомиться с общими правилами и методами культивирования грибов, подготовить объекты к выделению грибов в чистую культуру.

Оборудование: Микроскоп, пенал с набором инструментов, спиртовки, чашки Петри, бумажные фильтры, спирт, вата.

Материал: Органы растений, пораженные различными грибами.

В зависимости от целей и методов исследования культивирование микроскопических грибов включает ряд этапов:

1 – подготовка образцов естественных субстратов (почвы, пораженных органов растений или растительных остатков, зерна и т. д.), из которых предполагается сделать высев на обычные (агар Чапека) и элективные (избирательные) среды, обеспечивающие преимущественное развитие одного вида или группы родственных видов среды; определение наличия грибов.

2 – выделение и получение чистых культур грибов на агаризованных питательных средах.

3 – пересев чистых культур на дифференциально-диагностические среды для последующего определения их видовой принадлежности.

Культивирование микроскопических грибов с целью накопления биомассы или определенных продуктов метаболизма предполагает:

- 1) наличие чистой культуры;
- 2) подготовку стандартного посевного материала;
- 3) определение условий, необходимых для роста грибов и проявления их биосинтетической активности;

Метод чистых культур

Грибы выделяют в чистую культуру и наблюдают за ними *in vitro*. Наличие **чистых культур** дает возможность определить характер роста и спорообразования у грибов, особенности морфогенеза, выявить плодовые тела и виды спороношения, установить отношение грибов к факторам среды (температуре, влажности, источникам света, кислотности среды, радиации, компонентам субстрата); определить биосинтетическую активность продуктов метаболизма (ферментов, регуляторов роста, витаминов) грибов; выявить отношение грибов к фунгицидам, лекарственным препаратам; провести сравнительную характеристику изолятов ви-

дов грибов; провести популяционные исследования; выяснить взаимоотношения грибов друг с другом, охарактеризовать степень паразитизма, родство между грибами и т.д.

Выделение фитопатогенных грибов

Прежде чем получить чистую культуру изучаемого гриба, необходимо иметь споры или мицелий, свободные от заражения сапротрофной микробиотой. Одним из наиболее простых методов получения мицелия или органов спороношения является стимулирование роста грибов и спороношения в условиях повышенной влажности – применение **влажных камер**. Для их изготовления обычно используют чашки Петри. Перед закладкой объекта во влажную камеру его промывают в проточной воде или в нескольких водах. Выбор концентрации дезинфектанта и времени экспозиции зависит от целей исследования и характера исследуемого материала. Стерилизуют объект, используя 3 %-ную перекись водорода, 2 %-ный раствор марганцево-кислого калия, 70 %-ный этиловый спирт. Объект выдерживают в растворе в течение 1-5 мин и многократно промывают стерильной водой. Для грубых частей растений используют обжиг в пламени.

Необходимую для проведения микологического эксперимента посуду моют с моющими средствами, заворачивают в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 180-200 °С. Инструмент стерилизуют спиртом и прокалывают на огне.

В стерильные чашки Петри кладут 2-3 фильтра, увлажненные стерильной или проточной водой (реже жидкой питательной средой). После поверхностной дезинфекции исследуемый материал помещают в чашку Петри и ставят в термостат при соответствующей температуре (обычно 20-25 °С). Фрагменты исследуемых пораженных объектов раскладывают так, чтобы они не соприкасались друг с другом.

Выделение фитопатогенных микромицетов проводят из различных пораженных органов растений.

Выделение из корней

Свежевыкопанные корни многократно промывают проточной, затем стерильной водой, отжимают в нескольких слоях стерильной фильтровальной бумаги, отрезками длиной 1-3 см или целиком (у проростков) укладывают на кружки стерильной фильтровальной бумаги в чашках Петри и помещают в термостат при температуре 26 °С. Толстые корни

разрезают вдоль или нарезают небольшие поперечные отрезки. Наблюдение за ростом грибов и их выделение производят через 24-48 ч и в последующие дни роста.

Выделение из клубней, луковиц, корнеплодов, плодов

Для выделения патогенных грибов из клубней, луковиц, корнеплодов и плодов необходимы предварительный отмыв исследуемого материала от частиц почвы и поверхностная стерилизация. Срезают стерильно небольшой кусочек на границе пораженной и здоровой ткани и помещают его во влажную камеру или на агаризованную среду.

Выделение из стеблей и листьев

Грибы можно выделить не только из свежего материала, но и из гербарных образцов. Необходимо немедленно зафиксировать гербарный материал высушиванием, а также предохранять от заражения посторонней микобиотой. Листья, стебли или их части помещают в стерильный пакет из фильтровальной бумаги и высушивают в нем. После высушивания листьев пакет помещают во второй пакет, также стерильный, но из более плотной бумаги. В таком виде хранят до исследования. Перед выделением гриба материал помещают во влажную камеру.

При поражении листьев или лепестков химической обработки не ведут, а промывают несколько раз водой и увеличивают число повторностей пораженного материала.

Выделение из зерна хлебных злаков и семян

Семена дезинфицируют, если предполагают наличие внутреннего заражения. Если определяют внешнюю заспоренность, то дезинфекцию не проводят. Зерна или семена после поверхностной дезинфекции укладывают на фильтровальную бумагу через 0,5-1 см; из одной исследуемой партии зерна берут 100-1000 зерен.

Выделение грибов из почвы

1. Метод «контактных стекол» (метод Росси-Холодного) – метод выделения микроорганизмов непосредственно из места их расположения в почве. Стерильные предметные стекла прижимают к почве. Через несколько дней стекла встряхивают для освобождения от крупных комочков почвы и помещают на поверхность агаровой среды, в которую добавлен антибиотик, стороной, соприкасавшейся с почвой. Выросшие

грибы просматривают при малом увеличении микроскопа и после определенного периода инкубации колонии переносят на свежую среду.

2. Метод разведения почвенной суспензии. Чаще всего для этих целей применяют разведение 1:10 (10 г почвы на 100 мл воды), 1:100, 1:1000. Суспензии с большим разведением высевают на агар.

После появления спороношения или признаков развития мицелия его пересевают на агаризованную питательную среду непосредственно в пробирку на скошенный агар или предварительно на агаризованную среду, разлитую в чашки Петри. Для освобождения от бактерий, посеvy исследуемых грибов и первичное выделение культур производят на средах с рН 4,0 с добавлением в среду для посева антибиотиков с широким спектром антибактериального действия (канамицин и др.) в концентрации 1-2 г/л питательной среды.

Облигатных паразитов выращивают на живых растениях или специальных средах.

Для дальнейшей работы очень важно провести расчистку культуры. Это осуществляется штриховой разводкой (1), разведением в стерильной воде (2) или среде (3).

1. Небольшое количество спороношения гриба снимают петлей и наносят штрихом на поверхность агара в чашки Петри. По мере продления штриха споры все более разделяются до тех пор, пока в итоге не получают индивидуальные колонии, возникшие из нескольких или единичных спор.

2. Готовят разведения путем помещения инокулюма спор в пробирку со стерильной водой (10 мл), затем стерильной пипеткой переносят определенное количество суспензии (например, 1 мл) в пробирку с 9 мл стерильной воды. Свежая стерильная пипетка используется, чтобы смешать жидкость и перенести 1 мл ее в очередную пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Разведение продолжают по мере потребности. Из последнего разведения 1 мл суспензии спор добавляют к расплавленному агару, охлажденному до 45 °С.

3. Используют пять пробирок с соответствующей средой, расплавленной и охлажденной до 45 °С. Затем в одну из пробирок вносят небольшое количество спор; пробирку вращают между ладонями и содержимое выливают в чашку Петри. Опорожненную пробирку заполняют средой из другой пробирки, вращают между ладонями и выливают во вторую чашку. Процедуру повторяют с оставшимися тремя пробирками.

Получение моноспоровых культур

При проведении теоретических исследований или анализе популяции какой-либо географической формы, выявлении продуцентов и др. возникает необходимость получения культуры из одной споры – **моноспоровую культуру**. Моноспоровую культуру многих грибов получают следующими способами:

1. Готовят суспензию спор на стерильном предметном стекле в стерильной воде путем погружения обожженной петли в спорулирующую культуру. Эту суспензию спор наносят штрихом вдоль намеченной линии в чашке Петри на очень тонкую пластинку агаризованной среды, приготовленной на кипяченой воде, и выдерживают при + 24 °С. Через 15-16 часов обычно наблюдают начало прорастания и готовность спор для выделения.

При работе с биноклем чашку Петри перемещают вдоль линии отметки и выбирают подходящие одиночные проросшие споры. Затем вырезают агаризованную среду площадью около 2 мм² вокруг споры. Этот квадрат и зону непосредственно вокруг него проверяют при малом увеличении микроскопа, чтобы гарантировать наличие только одной споры.

Агаровый блок с проросшей спорой затем переносят при помощи стерильной иглы под биноклем в чашку с агаром или пробирку.

2. Питательную среду разливают тонким слоем в стерильные чашки Петри, затем берут пробирку со стерильной водой, в нее вносят небольшое количество спор исследуемого гриба и тщательно взбалтывают в воде. После этого металлической петлей берут 4-5 капель споровой суспензии и переносят на предметное стекло. Под микроскопом подсчитывают количество спор в каждой капле. Если капля заключает n спор, то в пробирку добавляют стерильную воду, чтобы объем ее увеличился в $n + 1$ раз.

При этом можно полагать, что в одной капле будет в среднем по одной споре. После этого из пробирки с разбавленной суспензией спор берут 3-4 капли и переносят в чашки Петри на агаризованную среду. Капли должны располагаться друг от друга на сравнительно большом расстоянии. Под микроскопом проверяют количество спор, попавшее в каждую из этих капель. Просмотр проводят с нижней стороны чашки, которую для этого осторожно переворачивают. При этом выбирают те капли, в которых содержится по одной споре и отмечают их на стекле маркером. Полученные колонии отсевают в пробирки на скошенную агаризованную среду.

Иногда каплю суспензии, содержащую одну спору, помещают на стерильное стекло в чашку Петри и добавляют в нее кусочек агаризованной среды; после обрастания его мицелием гриба культуру переносят в пробирку или чашку Петри.

Возможно использование и других методов получения моноспоровых культур, которые указаны в специальной литературе [4, 6, 8].

Поддержание и хранение чистых культур

После выделения культур и своевременной их очистки от посторонних организмов следует поддерживать чистые культуры в жизнеспособном состоянии. Простейший способ поддержания – пересев их через определенное время в пробирки на косяки свежей агаризованной среды. Периодичность пересевов зависит от вида гриба и определяется временем его выживаемости. При пересевах переносят, главным образом, споры, а у неспорообразующих форм – мицелий из краевой зоны колонии. Следует учитывать, что длительное выращивание грибов на искусственных средах может привести к изменению свойств культуры, в частности, к потере патогенности, снижению агрессивности и вирулентности.

Для хранения выбирают лучшие из имеющихся культур. Культуры сохраняют при комнатной температуре или в холодильнике при температуре 4 °С. Пересевы (если культура хранится в холодильнике) делают реже.

При хранении в пробирках обжигают снаружи пробки и оборачивают пергаментной бумагой (фольгой, полиэтиленом и т.д.).

Периодичность пересева зависит от вида гриба. Грибы родов *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, пересевают через 3 месяца, рода *Phytophthora* – каждые 3 недели.

Все культуры должны быть подписаны с указанием даты пересева. Хранить их нужно в разных местах в нескольких повторностях. Культуры необходимо периодически просматривать (во избежание попадания клещиков).

Для длительного хранения грибов лучше использовать бедные сахарами крахмальные и целлюлозные среды.

Сохранять культуры грибов можно также под минеральным маслом, в лиофилизованном состоянии (после удаления воды из замороженных суспензий под вакуумом) и в жидком азоте в ампулах.

Все культуры должны быть пронумерованы и зарегистрированы в специальных журналах, карточках, в которых записывают номер и на-

звание культуры, где и откуда она выделена, дату выделения, способ выделения, название сред, примененных при пересевах, результаты наблюдений за ростом патогена в чистой культуре и отмеченные при этом особенности.

Задание:

- 1. Подготовить и простерилизовать чашки Петри и пробирки.**
- 2. Установить вид патогена на пораженном органе растения, используя определители.**
- 3. Прозеинфицировать и поместить пораженные части растения во «влажную камеру».**

ЗАНЯТИЕ 2

Тема: Питательные среды и правила их приготовления

Цель: Ознакомиться с типами и назначением питательных сред, приготовить необходимые для дальнейшей работы среды.

Оборудование: Микроскоп, пенал с набором инструментов, весы, воронки, колбы 1 л, флаконы, марля.

Реактивы: Агар-агар, овсяные хлопья, картофель, глюкоза, минеральные соли для среды Чапека.

Для получения чистых культур грибов (факультативных сапротрофов и факультативных паразитов), поддержания их жизнеспособности в целях дальнейшего изучения применяют различные питательные среды. По консистенции различают жидкие и плотные питательные среды. Выбор того или иного типа питательного субстрата зависит от потребностей грибного организма и целей проводимого эксперимента.

Плотные среды готовят, добавляя к растворам солей и отварам агар (2-2,5%) или желатин (10-15 %), а, в случае необходимости, увлажняют поверхность твердых предметов (опилки и т.д.) растворами питательных веществ.

Плотные среды используют для выделения грибов из естественных субстратов, получения культур из отдельных спор (моноспоровые изоляты), определения репродуктивной способности и особенностей спорообразования, дифференциации грибов по характеру роста на плотных средах, изучения влияния факторов среды и различных веществ на рост грибов.

Сыпучие среды (зерно, отруби) используют для приготовления больших количеств спорового посевного материала.

Приготавливая среды, надо иметь в виду следующие обстоятельства:

1) грибы обычно растут лучше на среде, богатой углеводами, но выращивание их на таких средах длительное время может редуцировать споруляцию;

2) большинство грибов предпочитает слабокислую реакцию (рН 6,0-6,5);

3) углеводы и белки в кислых и щелочных растворах разрушаются при нагревании, поэтому они должны быть умеренно стерилизованы или добавлены отдельно;

4) агар растворяют в половинной норме воды в течение 1-2 ч, а питательные вещества – в оставшейся воде, после чего компоненты смешивают;

5) агаризованная среда не затвердевает, если рН смещено в кислую или в щелочную сторону;

6) пептон, в основном, может быть исключен из состава сред, предназначенных для грибов;

7) водопроводную воду следует предпочесть дистиллированной, поскольку первая содержит полезные микроэлементы; для грибов рода *Phytophthora* лучше использовать дистиллированную воду;

8) для сред, в состав которых входит растительный материал, из него предварительно делают вытяжку при низких (картофельный агар) или высоких (картофельно-декстрозный агар) температурах.

Жидкие питательные среды применяют для качественного и количественного изучения потребностей грибов в питательных веществах в процессах роста и синтеза метаболитов. В таких средах определяют влияние рН среды, микроэлементов, стимуляторов, ингибиторов и других веществ на биосинтетическую активность гриба.

Для подкисления сред употребляют соляную, серную, лимонную, молочную, фосфорную кислоты, для подщелачивания – NaOH или KOH.

Для усиления роста грибов и повышения их биосинтетической активности в питательные среды вводят микроэлементы. Железо, цинк, марганец и др. применяют в растворенном виде.

В качестве факторов роста используют тиамин, биотин, реже инозин, пиридоксин и др. Готовят исходные растворы этих соединений в 20% -ном спирте, стерилизуют кипячением на водяной бане и хранят в холодильнике. Исходные растворы тиамина и пиридоксина должны содержать 100 мкг/мл; биотина – 5 мкг/мл.

Среди жидких сред наиболее распространенной и употребимой является среда Чапека (табл. 1) с рН 7,0. Можно заменять сахарозу глюкозой, NaNO_3 – NH_4Cl , доводить рН до 6,6 и ниже, употреблять водопро-

водную воду. Компоненты среды последовательно растворяют в воде, вносят агар-агар и расплавляют его. Затем добавляют сахарозу, устанавливают pH = 7,0. Среду разливают в посуду и стерилизуют 30 мин при температуре 117 °С (или 20 мин при 121 °С).

Таблица 1

Состав питательных сред для выращивания фитопатогенных грибов

Название питательной среды	Состав компонентов на 1 л воды, г	Группа культивируемых грибов
1	2	3
Агаризованная среда («голодный агар»)	Агар (15-20)	Большинство видов (для получения спороношения)
Зерновой агар	Кукуруза (30), агар (20)	Phytophthora, Pythium
Картофельно-глюкозный агар	Картофель (200), глюкоза (100), агар (20)	Venturia, Monilia, Botrytis
Картофельно-сахарозный агар	1000 мл картофельного экстракта (1800 г картофеля на 4500 мл воды), сахароза (40), агар (40)	Fusarium
Картофельно-декстрозный агар	Картофель (200), декстроза (20-50), агар (20)	Головневые
Картофельный агар	Картофель (200), агар (20)	Fusarium, Phytophthora
Мальц-пептонный агар	Солодовый экстракт или мальц-экстракт (20), пептон (10), лимонная кислота (0,5), агар (20)	Фитопатогенные и почвенные грибы, паразиты семян
Минеральный раствор Петри	Нитрат кальция (0,40), сульфат магния (0,15), фосфат кислого калия (0,15), хлорид калия (0,06)	Phytophthora (для получения спорангиев)
Овсяный агар	Овес (100) или овсяные хлопья (150), агар (20)	Clasterosporium, Fusarium
Синтетический агар Чапека	Сульфат магния (0,5), безводный фосфат калия (1,0), хлорид калия (0,5), сульфат железа (0,01), нитрат натрия (2,0), декстроза (30), агар (20), вода дистиллированная	Почвенные патогены и разрушители древесины, большинство видов грибов
Среда Барнеса	Фосфорнокислый калий (1), аммоний азотнокислый (10), азотнокислый калий (1), глюкоза (1), агар (20)	Сумчатые (для получения плодовых тел)
Сусло-агар	Неохмеленное 7 %-ное пивное сусло (1000) вместо воды и агар (20)	Большинство фитопатогенов

Правила приготовления и стерилизации питательных сред

Предварительно приготовленный картофельный (200 г картофеля режут ломтиками и варят в 1 л воды до готовности) или овсяный (150 г овсяных хлопьев варят в 1 л воды) отвар вливают в мерную посуду, фильтруют, добавляют агар и доводят объем до 1 л. Устанавливают нужное значение рН. Для стерилизации среду разливают в колбы, флаконы, пробирки не более, чем наполовину. Пробки (ватно-марлевые) закрывают плотной бумагой и помещают в автоклав.

Существуют несколько способов стерилизации:

1) стерилизация насыщенным паром под давлением (табл. 2);

Таблица 2

Соотношение температуры насыщенного пара и давления при стерилизации питательных сред

Давление, атм		Температура, °С
Нормальное	Добавочное	
1,0	–	100
1,0	0,5	112
1,0	1,0	121
1,0	1,5	128
1,0	2,0	134

2) стерилизация сред фильтрованием через мелкопористые фильтры. Применяются бактериологические фильтры Зейтца, мембранные фильтры. Фильтрующая способность их определяется размерами пор и степенью пористости. Метод необходим в тех случаях, когда среды не выдерживают нагревания (например, среды, содержащие белки);

3) химическая стерилизация. Среду выдерживают 7 ч с 0,1 %-ной перекисью водорода при температуре 45 °С;

4) стерилизация с помощью антибиотиков. Этим методом пользуются в тех случаях, когда стремятся освободиться от одних групп микроорганизмов при сохранении других и для уменьшения обсемененности материала;

5) стерилизация током высокой частоты, ультразвуком, ИК-лучами.

Задание:

1. Приготовить среду Чапека, картофельно-глюкозный, овсяный агар.
2. Разлить охлажденную до 45 °С среду в чашки Петри (по 12 чашек каждой среды) и пробирки (по 10 пробирок соответственно).
3. Высеять споры или мицелий грибов, выросших на пораженных объектах во «влажных камерах» на чашки Петри и поместить на агар стерильные пораженные ткани растений.
4. Выделить из предоставленного пораженного материала гриб *Phytophthora infestans* на ломтиках картофеля.

ЗАНЯТИЕ 3

Тема: Изучение культуральных и морфологических признаков, используемых в систематике грибов пор. *Moniliales* (*Hymenomycetales*).

Цель: Научиться описывать морфологические структуры грибов пор. *Moniliales* (*Hymenomycetales*) и измерять объекты при микроскопировании.

Оборудование: Микроскоп, бинокляр, пенал с набором инструментов.

Материал: Чистые культуры грибов на средах либо пораженные органы и ткани растений с хорошо развитым спороношением.

I. КОНИДИЕНОСЦЫ (по Литвинову, 1969)

1. Характер расположения

Расположение поодиночке, свободно отстоящие друг от друга или объединенные в группы, но не сросшиеся (не спаянные) между собой.

Расположение группами, сросшиеся (спаянные) между собой в пучки – коремии.

Расположенные тесным слоем на подушковидных стромах, состоящих из рыхло сплетенных гиф мицелия (спороложа или спородохии), большей частью короткие.

2. Степень дифференциации

Отчетливо обособленные (дифференцированные), заметно отличающиеся от вегетативных гиф мицелия.

Мало или почти не отличающиеся от вегетативных гиф мицелия.

3. Тип ветвления

Неразветвленные (простые).

Разветвленные (моноподиально, симподиально, дихотомически, мутовчато, кистевидно и т.п.).

Моноподиальным называется такое ветвление, при котором боковые ветви отходят от главной центральной оси конидиеносца.

Симподиальное ветвление – это ветвление, при котором центральная ось конидиеносца прекращает свой рост, а боковая ветвь ее служит как бы продолжением центральной оси; от этой боковой ветви отходит боковая ветвь следующего порядка, тоже как бы продолжающая центральную ось, и т.д.. Таким образом, главная ось конидиеносца состоит из ветвей различных порядков.

Дихотомическим называется такое ветвление, при котором конидиеносец в точке роста разветвляется вилкообразно, обычно несколько раз, последовательно.

4. Окраска

Бесцветные, светло-, ярко- или темноокрашенные (оболочка и содержимое).

5. Разные принципы в строении и расположении конидиеносца

Положение (приподнимающиеся, прямостоячие, ниспадающие, стелющиеся).

Размеры (высота и толщина).

Форма и характер окончания (вершинка).

Поверхность оболочки (гладкая, шероховатая и др.).

Способ отхождения (от субстратных или воздушных гиф мицелия).

II. КОНИДИИ

1. Строение и окраска

Одноклеточные, двуклеточные или многоклеточные; с поперечными и продольными перегородками (муральные); наличие придатков.

Бесцветные, светло-, ярко- или темноокрашенные; окраска в массе.

2. Способ образования

Путем расчленения (распадения) недифференцированной или слабо обособленной гифы мицелия на отдельные клетки – конидии (споры).

Путем возникновения на более обособленных (дифференцированных) ответвлениях грибницы (т.е. конидиеносцах).

Акропетально или базипетально.

Экзогенно или псевдоэндогенно.

3. Расположение

Непосредственно на конидиеносце.

На фиалидах, стеригмах, зубчиках, выступах или веточках.

На интеркалярных расширенных клетках.

На вершине (апикально), с боков (плеврогенно).

Одиночные, в цепочках (параллельных, переплетающихся или соединенных в колонку) или собранные (скупенные) в головки или гроздья и т.п.

4. Форма и структура оболочки (эписпория)

Цилиндрические, шаровидные, овальные, эллипсоидные, яйцевидные, продолговатые, грушевидные, булабовидные, обратно-булабовидные, серповидные, нитевидные, спиральнозагнутые, звездчатые и т.п.

Гладкая, шероховатая, шиповатая, бородавчатая, щетинистая и т.п.

III. КОЛОНИИ (дернинки, дерновинки)

1. Характер строения, окраска и другие признаки

Строение: войлочные, бархатистые, шерстистые, пушистые, ватообразные, паутинистые, клочковатые.

Бархатистость колонии определяется плотно растущими спороносящими веточками, отходящими непосредственно от субстратного мицелия; пушистость – обильно развитым воздушным мицелием; шерстистость – большим количеством тяжелой; шероховатость возникает в результате обильного образования коремий.

Поверхность: ровная, бугристая, складчатая, зональная.

Окраска наружной (верхней) поверхности колонии и ее изменения с возрастом культуры.

Окраска обратной (нижней) стороны колонии (реверзума).
Форма.
Характер края (цвет, ширина и контур).
Скорость роста (размеры колонии в динамике).
Строение центральной части колонии: кратерообразная, куполообразная, плоская, наличие хохолка и т.д.
Наличие эксудата, его цвет.

2. Мицелий и его производные

Расположение, окраска, строение: воздушный, стелющийся по поверхности, погруженный в субстрат.
Размеры.
Окраска воздушного и субстратного мицелия.
Строение оболочки.
Степень ветвления, образование петель, анастомозов, склероциев, шнуров.
Диффузия пигмента в среду.

3. Споры вегетативного размножения (по Н.А. Наумову, 1952)

Хламидоспоры – отдельные участки гиф, обособившиеся от соседних частей мицелия и образовавшие вокруг себя утолщенную оболочку.

Оидии – короткие округлые или удлинённые членики отдельных веточек грибницы, быстро разъединяющиеся друг с другом.

Геммы – те же оидии, но с более плотной и обычно окрашенной оболочкой.

Бластоспоры – округлые клетки, размножающиеся почкованием (т.е. образованием небольшого вершинного, реже бокового бугорка, который дорастает до величины материнской клетки, а затем, потеряв с ней связь, становится независимым).

Артроспоры – четковидно возникающие споры, образующиеся путем нарастания основной клетки, расположенной на воздушной грибнице, и отходящей от нее в воздух, где они быстро распадаются.

Измерение объектов при микроскопировании

При измерениях с помощью микроскопа необходимы следующие измерительные приборы: окуляр-микрометром, объект-микрометром и счетной камерой.

Перед тем, как приступить к измерению при определенном увеличении микроскопа, необходимо установить значение одного деления окуляр-микрометра в микронах.

Для этого берут объект-микрометр, представляющий собой предметное стекло, в середине которого выгравирована шкала длиной в 1 мм, разделенная на 100 равных частей, каждая из которых соответствует 10 м. Потом фокусируют микроскоп и добиваются предельно четкой видимости делений окуляр- и объект-микрометров. Далее при помощи препаратаводителя устанавливают объект-микрометр так, чтобы шкалы микрометров предельно точно совпадали. Отсчитывают, скольким делениям окуляр-микрометра соответствует определенное число делений объект-микрометра. Снова сдвигают объект-микрометр и снова так же устанавливают, производя такой же отсчет. Все полученные данные записывают в 2 колонки. Стараются отметить возможно большее количество совпадения делений и измеряют их 5-10 раз, в зависимости от однородности получаемых данных. Потом для каждого измерения производят расчет следующим образом: умножают первое число (количество делений объект-микрометра, a) на 10 м (поскольку каждое деление объект-микрометра равно 10 м) и делят его на второе (количество делений окуляр-микрометра (b)). Таким образом получают величину одного деления окуляр-микрометра. Из каждой пары цифр берут результат и потом находят среднее (м (микрон) 1 микрон = 1 микрометр).

$$A = \frac{ax10}{b} \quad (1)$$

где A – величина одного деления окуляр-микрометра, мкм;

a – количество делений объект-микрометра;

b – количество делений окуляр-микрометра;

10 мкм – цена одного деления объект-микрометра.

Для каждого окуляра и объектива вычисляют цену деления в данном конкретном случае. Для удобства работы обычно заготавливают таблицу, в которой приведены значения деления окуляр-микрометра для всех возможных оптических комбинаций, а также результаты умножения этой единицы на ряд последовательных чисел до 20 и более. Таблицу обычно помещают на внутренней части дверцы футляра микроскопа.

Задание:

1. Установить цену деления окуляр-микрометра.
2. Описать морфологические структуры и культуральные свойства изучаемых микромицетов по приведенному плану.

ЗАНЯТИЕ 4

Тема: Изучение вегетативных и репродуктивных функций грибов.

Цель: Ознакомиться с особенностями роста и развития грибов под влиянием различных факторов среды и условий культивирования.

Для роста грибов необходимые следующие факторы:

- источники питания (натуральные и искусственные);
- неорганические соединения, содержащие Na, K, Ca, Mg, S, Fe, P, C, H, N;
- микроэлементы: Mn, B, Co, Mo, Zn;
- стимуляторы роста;
- условия оптимальных температур, кислотности, влажности, освещенности, степени аэрации и др.

Грибы, являющиеся облигатными паразитами, факультативными сапротрофами, культивируются на живых растениях или их частях (ржавчинные, мучнисторосяные, пероноспорные).

Естественные питательные субстраты неопределенного состава, искусственные субстраты определенного состава содержат необходимые элементы в усвояемой форме. Используют кусочки овощей, плодов, мелко нарезанные ветви и стебли растений, зерно в натуральном виде или в виде экстрактов, настоев или отваров (пивное сусло, дрожжевая вода, кукурузный, картофельный экстракты), добавляемые к искусственным питательным средам.

Питательные вещества усваиваются микроорганизмами только при определенной *кислотности* питательной среды, так как проницаемость оболочки клеток зависит от этого фактора. Большинство грибов развивается при pH 4,5-6,0. Реакция среды в процессе роста культуры грибов может значительно изменяться. Каждая стадия развития гриба (прорастание спор, рост мицелия, спорообразование) требует определенных значений pH. Грибы одних родов вызывают подщелачивание среды (*Fusarium*), другие – подкисляют среду (*Phytophthora*).

Температура выращивания. Минимальная температура для развития грибов – 0-5 °С, оптимальная температура отличается в зависимости от

вида. Например, для грибов р. *Fusarium* – 28-30 °С, *Phytophthora infestans* – 15-20 °С, *Botrytis cinerea* – 24-25 °С.

Освещенность. При недостаточном освещении наблюдается задержка спорообразования. При УФ-освещении прекращается рост и ферментативная активность грибов. Прямые солнечные лучи отрицательно влияют на рост грибов и их активность при длительном хранении.

Измерение линейного роста колоний

Для определения линейного роста измеряют диаметр колонии (от места посева до конца зоны роста мицелия), растущих на плотной среде, обычно в чашках Петри с одинаковым слоем среды, через определенные промежутки времени. В некоторых случаях измерение производят в специальных пробирках с застывшим горизонтальным слоем плотной среды равномерной толщины.

Исследуемый гриб высевают в центр поверхности плотной питательной среды по возможности немногочисленным инокулюмом всегда одной плотности, особенно при изучении влияния условий культивирования на рост колоний.

Диаметр колонии измеряют в двух взаимноперпендикулярных направлениях в двух-трех повторностях через определенные промежутки времени (каждые 24 ч). Количество измерений зависит от скорости роста гриба, оно больше у быстрорастущих видов. Результаты измерений изображают графически в равномерной или логарифмической шкале.

Линейный рост гриба определяют на благоприятной среде при изучении влияния различных факторов среды.

Радиальная скорость роста колонии вычисляется по формуле:

$$K_r = \frac{r - r_0}{t} \quad (2)$$

где K_r – радиальная скорость роста колонии, мм/ч;
 r – радиус колонии в данный момент времени, мм;
 r_0 – радиус колонии в начальный момент времени, мм;
 t – время от момента посева до того момента, когда радиус колонии достигнет r , час.

Определение интенсивности плодоношения и спорообразования грибов

Интенсивность плодоношения (спорообразования) грибов характеризует их репродуктивную способность, играет важную роль в распространении и реализации их жизненной стратегии. У фитопатогенных грибов интенсивное спорообразование обуславливает высокий инфекционный потенциал возбудителей заболеваний.

Интенсивность спорообразования (т.е. увеличение числа спор) при росте гриба на плотной среде определяют с помощью счетной камеры или в нескольких полях зрения микроскопа по количеству спор в определенном объеме взвеси.

Счетная камера представляет собой толстое предметное стекло, на котором вышлифована пластинка, поверхность которой обычно на 0,1 мм ниже поверхности всего стекла. На такой пластинке выгравирована система взаимоперпендикулярных линий, расстояние между которыми равно 50 мк. Квадраты, образуемые пересечением таких линий, имеют сторону, равную также 50 мк, или же, что одно и то же, 1/20 мм. Объем такой «жидкой призмы» равен 1/4000 мм³ (1/20 × 0,1 × 1/20 мм³). Необходимо помнить, что 1 мм³ в 4000, а 1 см³ – 4000000 раз больше объема одной призмы. Если жидкость представляет собой взвесь спор, то исходя из вычисленных единиц объема, можно подсчитать, сколько находится спор или конидий в любой единице жидкости, а потом и во всей жидкости, если ее объем установлен. Иногда для этих целей пользуются камерами Горяева, Тома, Фукс-Розенталя, Нейбауера, сеткой Предтеченского и т.д. В камере Тома и сетке Предтеченского очерченная на пластинке площадь равна 1 мм². На каждой камере имеется ее цифровое значение, и на это необходимо обращать внимание.

Практически количество конидий или отдельных клеток вычисляют по формуле:

$$X = a \times v \times 4000, \quad (3)$$

где X – количество искомым клеток в 1 мм³;

a – количество клеток в определенном объеме камеры;

v – количество сосчитанных квадратов.

Если подсчет ведется на 1 см³, то умножают на 4000000. Подсчет проводят или в каждом квадрате, или же в квадратах, расположенных по диагонали. Если подсчет ведут в очень разбавленных смесях, то за единицу поверхности берут не только один квадрат, а всю камеру. Для большей точности подсчитывают конидии не в одной, а в нескольких ка-

плях исследуемой взвеси. Результаты обрабатывают статистически. Для того, чтобы определить количество спор (конидий), которые гриб образует на единицу площади спороносящей поверхности, с помощью пробочного сверла или скальпеля вырезают определенный участок ткани растения и смывают с него споры 1 мл воды.

$$I = \frac{LxN}{SxV} \quad (4)$$

где I – интенсивность спорообразования, шт / см²;
 N – среднее количество спор в малом квадрате счетной камеры, шт;
 S – площадь вырезанной спороносящей поверхности, см²;
 L – объем воды, которой смыты споры, мл;
 V – объем малого квадрата камеры, мл.

При поверхностном или погруженном культивировании в жидкой питательной среде интенсивность спорообразования определяют по количеству конидий в определенном объеме культуральной жидкости. Пробу культуры, помещенную в жидкую среду, встряхивают на аппарате в течение 15-30 мин и центрифугируют. Время осаждения спор зависит от вида гриба и определяется экспериментально. Из определенной навески осадка спор готовят взвесь и в счетной камере подсчитывают число спор в единице объема.

Интенсивность спорообразования определяют по количеству пустул, клейстотециев, перитециев, апотециев, ложе, пикнид – на 1 см² пораженной ткани. Определяют в 3-х предварительно ограниченных местах на 10-ти очажно пораженных органах (например, клейстотеции возбудителей мучнистой росы в 3 точках листа на 10 листьях) количество плодовых тел на единицу поверхности по формуле:

$$N = \frac{\sum n}{\sum s} \quad (5)$$

где N – количество пустул, клейстотециев, перитециев, апотециев, ложе, пикнид на 1 см², шт / см²;

Σ n – общее количество пустул, клейстотециев, перитециев, апотециев, ложе, пикнид, шт;

Σs – общая площадь, на которой проведен учет, см² .

Для гифальных грибов интенсивность спорообразования определяют по количеству спор на 1 см^2 спороносящей поверхности.

Определение жизнеспособности патогена

При определении количества жизнеспособных спор, образовавшихся на поверхности пораженных органов, а также анализе популяции патогена пользуются методом рассева определенного объема суспензии инокулюма определенного объема суспензии инокулюма на агаровой среде. Таковую среду готовят из экстракта поражаемых тканей растения-хозяина.

Для приготовления суспензии на 25 мл стерильной воды берут 10 проб и 10 типично пораженных органов общей площадью в 1 см^2 . Вырезанные кусочки пораженных тканей помещают в колбу со стерильной водой и тщательно встряхивают. Полученную суспензию сливают в чистую колбу, откуда берут по 0,1 мл для рассева на агаризованную среду, разлитую в чашки Петри. Суспензию наносят на поверхность среды стерильной пипеткой в виде капель и равномерно распределяют с помощью простерилизованного шпателя.

В качестве шпателя используют согнутую стеклянную палочку или пипетку с предварительно запаянным концом. Их стерилизуют сухим жаром и используют только один раз. Возможно и многократное использование шпателя со стерилизацией после каждого рассева в кипящей воде или над пламенем.

Перед посевом определяют количество спор, находящихся в одной капле приготовленной суспензии. Для этого при малом увеличении микроскопа подсчитывают число спор в 10 каплях и рассчитывают среднее арифметическое. Желательно, чтобы споры распределялись в суспензии равномерно и в каждой капле их количество было примерно одинаково. Если это условие не соблюдается, суспензию следует дополнительно перемешать. Среднее число спор в капле от 25 до 50 следует считать оптимальным, поскольку при высокой плотности посева создаются трудности в подсчете колоний. Уменьшение количества спор в одной капле достигается добавлением в суспензию пропорционального количества стерильной воды.

После рассева чашки Петри инкубируют при оптимальной для данного вида гриба температуре. Колонии подсчитывают как только они станут хорошо видны невооруженным глазом; наблюдения ведут на 10 чашках.

Довольно часто суспензии грибов, взятых из природного материала, оказываются сильно загрязненными эпифитной микрофлорой. Поэтому весьма затруднителен подсчет развившихся колоний на твердых питательных средах. В этом случае жизнеспособные споры учитывают по энергии их прорастания в 2-3 каплях стерильной воды с кусочками восприимчивой ткани растения-хозяина. Кусочек размером 2-3 мм в диаметре вырезают препаровальной иглой. Капли помещают во влажные камеры, приготовленные из колец Ван Тигема. Для этого необходимы простерилизованные кольца, предметные и покровные стекла. Кольца прикрепляют к предметным стеклам вазелином, которым смазывают также и их верхнюю часть; на дно кольца помещают каплю стерильной воды. Затем на нижнюю сторону покровного стекла наносят каплю суспензии, в которую кладут кусочек ткани, вырезанной из тщательно промытого в воде восприимчивого органа, питающего гриб растения. После этого стекло прижимают к кольцу. Наблюдения проводят при оптимальной температуре для прорастания спор изучаемого патогена через 6 или 9 ч после закладки опыта. Проросшими считают те споры, ростковые гифы которых превышают их длину. Преимущество этого метода заключается в том, что имеется возможность вести наблюдения под большим увеличением микроскопа.

При отсутствии колец Ван Тигема или необходимости проведения быстрого анализа жизнеспособности спор, когда их размеры позволяют проводить подсчеты при малом увеличении микроскопа, их проращивают в каплях на предметных стеклах. Последние помещают на небольших подставках во влажные камеры, приготовленные в чашках Петри по обычному способу. Точность подсчета общего числа проросших спор определяют по описанной ранее методике.

Задание:

1. Изучить динамику роста фитопатогенных микромицетов на различных питательных средах.

Цель опыта: Выяснить влияние разных по составу питательных агаризованных сред на развитие гриба (вегетативные и генеративные функции).

Оборудование: Микроскоп, бинокляр, пенал с набором инструментов.

Материал и условия проведения эксперимента. В качестве фитопатогенных грибов могут быть предложены следующие микромицеты, а также источники их выделения:

– грибы из родов **Phytophthora** (пораженные плоды, стебли, листья томата; клубни картофеля);

- **Alternaria** (плоды, стебли, листья томата; листья моркови; плоды и листья капусты; листья циннии; плоды перца сладкого и др.);
- **Monilia** (плоды яблонь, груш, боярышника и др.);
- **Cladosporium** (листья томата, плоды огурца);
- **Cercospora** (листья свеклы, липы);
- **Botrytis** (плоды томата, перца, баклажана; листья и стебли огурца; плоды малины, земляники и др.);
- **Sclerotinia (Whetzelinia)** (стебли петунии, циннии, томата, огурца, перца, кабачка и др.);
- **Fusarium** (плоды черешни, стебли томата, колосья ржи, стебли люпина, клубни картофеля);
- **Colletotrichum** (стебли и листья люпина; плоды томата, дыни).

Среды: картофельно-сахарозная агаризованная среда, овсяная агаризованная среда, среда Чапека.

t = + 20 °C (в аудитории);

Повторность опыта – 3- 5-ти кратная.

Методика.

Исследуемый гриб высевают в центр чашки Петри с застывшей средой по возможности немногочисленным инокулюмом всегда одной плотности и инкубируют.

Диаметр выросшей колонии измеряют линейкой в двух взаимноперпендикулярных направлениях в пяти повторностях через определенные промежутки времени (каждые 24 ч). Количество измерений зависит от скорости роста. Интенсивность линейного роста колоний учитывают через 4, 6, 8 сут. Параллельно отмечают изменение окраски среды, мицелия. Описывают характер края, поверхность, цвет колонии, отмечают начало спорообразования, склероциеобразование и т.д.

Площадь колонии вычисляют по формуле: $S = \pi \times r^2$.

Радиальную скорость роста колонии определяют по формуле (2); интенсивность спорообразования – с использованием камеры Горяева и формул (3) или (4).

Результаты измерений обрабатывают статистически и приводят в виде таблиц (3,4), графиков, диаграмм.

Таблица 3

Радиальная скорость роста (мм/час) фитопатогенных микромицетов на различных питательных средах

Вид патогена	Картофельно-сахарозный агар				Овсяно-сахарозный агар			
	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$				$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$			
	1 повт.	2 повт.	3 повт.	4 повт.	1 повт.	2 повт.	3 повт.	4 повт.

Таблица 4

Интенсивность спорообразования (штук / см²) фитопатогенных микромицетов на различных питательных средах

Вид патогена	Картофельно-сахарозный агар				Овсяно-сахарозный агар			
	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$				$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$			
	1 повт.	2 повт.	3 повт.	4 повт.	1 повт.	2 повт.	3 повт.	4 повт.

2. Изучить влияние температуры на развитие фитопатогенных микромицетов.

Цель опыта: Выяснить влияние разных температур на рост и развитие гриба (вегетативные и генеративные функции).

Оборудование: Микроскоп, бинокляр, пенал с набором инструментов.

Материал и условия проведения эксперимента. Среда – картофельно-сахарозная агаризованная; температурные условия:

$t_1 = + 4 \text{ }^\circ\text{C}$ (в холодильнике); $t_2 = + 10 \text{ }^\circ\text{C}$ (в термостате); $t_3 = + 20 \text{ }^\circ\text{C}$ (в аудитории);

$t_4 = + 35 \text{ }^\circ\text{C}$ (в термостате). Повторность опыта – 3-х кратная.

Методика.

Изучаемый гриб высевают в центр чашки Петри на среду по возможности немногочисленным инокулюмом всегда одной плотности и инкубируют.

Диаметр выросшей колонии измеряют линейкой в двух взаимноперпендикулярных направлениях в пяти повторностях через определенные промежутки времени (каждые 24 ч). Количество измерений зависит от скорости роста. Интенсивность линейного роста колоний учитывают через 4, 6, 8 сут. Параллельно учитывают изменение окраски среды, мицелия. Описывают характер края, поверхность, цвет колонии, отмечают начало спорообразования, склероциеобразование и т.д.

Площадь колонии вычисляют по формуле: $S = \pi \times r^2$.

Радиальную скорость роста колонии определяют по формуле (2), интенсивность спорообразования – с использованием камеры Горяева и формул (3) или (4).

Результаты измерений обрабатывают статистически и приводят в виде таблиц (5,6).

Таблица 5

Влияние температуры на рост фитопатогенных микромицетов

Вид патогена	Радиальная скорость роста колоний, мм/ч			
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄

Таблица 6

Влияние температуры на интенсивность спорообразования фитопатогенных микромицетов

Вид патогена	Интенсивность спорообразования, штук / см ²			
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄

ЗАНЯТИЕ 5

Тема: Взаимоотношения фитопатогенных грибов с почвенными грибами рода *Trichoderma*

Цель: Ознакомиться с типами взаимоотношений фитопатогенных грибов с почвенными грибами рода *Trichoderma*.

Одним из типов взаимоотношений в мире живых организмов вообще и микроорганизмов в частности является антагонизм. Проявления микробного антагонизма разнообразны и включают различные типы воздействия одного организма на другой: влияние неспецифических продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, которые приводят субстрат в состояние, непригодное для развития других микроорганизмов; выделение некоторыми микроорганизмами в среду специфических веществ – антибиотиков, которые препятствуют росту и развитию определенных видов организмов; паразитизм – существование одного микроорганизма за счет другого.

Учитывая, что явление антагонизма – продукт длительной коэволюции микроорганизмов, поиск антагонистов конкретным видам патогенов следует вести в среде их совместного обитания: в почве, на поверхности надземных органов растений.

Многие исследователи, изучавшие микробное население почв, отмечают одним из первых в ряду почвенных микроорганизмов-антагонистов грибы рода *Trichoderma*. В настоящее время накоплен об-

ширный экспериментальный материал по систематике, морфогенезу и споруляции, продукции метаболитов, механизмам воздействия штаммов *Trichoderma* на фитопатогены, свидетельствующий о высокой потенциальной активности антагонистов из этого рода почвенных грибов. Производимые ими антибиотики, а также гидролитические ферменты обладают антифунгальным и антибактериальным действиями, причем некоторые из них, по-видимому, активны, будучи летучими. Всего известно более 40 видов (не считая модификаций) биологически активных веществ, относящихся к нескольким группам: октакетиды, производные метаболизма аминокислот (триховиридин, дермадин, изонитрин), пептиды (пептаиболы: трихополин и др., циклоспорины), терпеноиды (триходермин, триходермол, диацетоксисцирпенол). Под воздействием антибиотических веществ фитопатогены развиваются замедленно или вовсе не растут, снижается спорообразование, гифы искривляются, утончаются, деформируются. Кроме того, у грибов рода *Trichoderma* обнаружено несколько активных гидролаз (протеиназа, манназа, ламинариназа, хитиназа). Грибы рода *Trichoderma* проявляют в отношении ряда патогенов биотрофные свойства, проникая внутрь гиф фитопатогена с помощью тонких гиф и гаусториеподобных образований.

Взаимоотношения между грибами рода *Trichoderma* и фитопатогенами можно сгруппировать в пять характерных типов:

I – индифферентные (безразличные) взаимоотношения (нарастание колонии гриба рода *Trichoderma* на поверхность колонии фитопатогена с сохранением скорости роста обоих грибов;

II – фунгистатический алиментарный (односторонний) антагонизм (нарастание колонии гриба рода *Trichoderma* на поверхность колонии фитопатогена, который в этом случае прекращает активный рост);

III – территориальный антагонизм (обрастание колонии патогена грибом рода *Trichoderma*, обычно патоген отстает в росте);

IV – антибиотический антагонизм (замедление роста колонии патогена на расстоянии от колонии гриба рода *Trichoderma*, образование зоны, в которой рост патогена не наблюдается вследствие выделения антибиотических веществ грибом рода *Trichoderma*);

V – взаимный антагонизм (нарастание колонии гриба рода *Trichoderma* на поверхность колонии фитопатогена с обоюдным ингибированием скорости роста).

Быстрота роста грибов рода *Trichoderma*, способность их развиваться при относительно низкой температуре и широкий спектр антибиоти-

ческого действия на представителей почвенной биоты в естественных условиях компенсируют сравнительно низкий титр их антибиотической активности и обеспечивают её конкурентоспособность в ризосфере растений.

Модельные эксперименты *in vitro* по выяснению взаимоотношений между грибами рода *Trichoderma* и фитопатогенами, определению антагонистической активности грибов рода *Trichoderma* являются прологом в процессе разработки биологических средств защиты растений от болезней.

Многие активные в отношении фитопатогенов штаммы грибов рода *Trichoderma* уже являются основой биопрепаратов по защите растений от патогенных организмов. Так, «Триходермин-БЛ», биопрепарат на основе антагонистически активных к патогенам штаммов гриба *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz, используется для защиты овощных и зерновых культур от болезней (черная ножка, бактериозы, корневые гнили, белая гниль, фузариозное и вертициллезное увядание).

Задание:

1. Выявить *in vitro* типы взаимоотношений фитопатогенных грибов и грибов рода *Trichoderma*.

Цель опыта: Определить тип взаимоотношений *in vitro* фитопатогенных грибов и грибов рода *Trichoderma*.

Оборудование: Микроскоп, бинокляр, пенал с набором инструментов.

Материал и условия эксперимента: Изоляты фитопатогенных грибов и грибов рода *Trichoderma*. Картофельно-глюкозная агаризованная среда (рН 5,5-7) (глюкоза может быть заменена сахарозой), t=20-25 °С.

Методика.

В эксперименте используется метод встречных колоний.

По дну чашки Петри провести черту, разделяющую чашку на две равные части. Залить агаризованную среду по 20 мл на чашку. В центр одной половины на расстоянии 2 см от черты поместить, засеяв грибопатоген, на таком же расстоянии в центр другой – грибок рода *Trichoderma*. В контроле патоген и грибы рода *Trichoderma* культивируются изолированно друг от друга.

Учет результатов эксперимента необходимо проводить ежедневно, измеряя радиус колонии фитопатогена и гриба рода *Trichoderma* в направлении, перпендикулярном черте, делящей чашку на две равные половины. Целесообразно описывать морфологию колоний грибов, отмечать, изменяется ли окраска колоний и субстрата. Для описания окраски

удобно использовать шкалу цветов А.С. Бондарцева (1953). На 5-е и 10-е сут. необходимо рассчитать показатель ингибирования (Р) фитопатогена грибом рода *Trichoderma* и показатель ингибирования гриба рода *Trichoderma* фитопатогеном:

$$P = ((K-A) \times 100)/K, \quad (6)$$

где Р – показатель ингибирования, %,
К – рост гриба в контроле, мм,
А – рост гриба в опыте, мм.

В качестве показателя «рост гриба» можно использовать радиус колонии гриба в направлении, перпендикулярном черте, делящей чашку на две равные половины.

Для описания внешнего вида колонии фитопатогена на 10-е сут. можно использовать следующую шкалу:

А – патоген угнетен в сильной степени, мицелий редкий, прижатый к субстрату; Б – патоген угнетен слабо; В – патоген не угнетен.

Значком «+» рядом с буквой можно условно указать нарастание гриба рода *Trichoderma* на колонию фитопатогена, а значком «++» – отметить появление на колонии патогена очагов спороношения гриба рода *Trichoderma*.

На 10-е сут. необходимо определить тип взаимоотношений фитопатогена и гриба рода *Trichoderma*, а также оценить в баллах степень нарастания гриба рода *Trichoderma* на колонии фитопатогенов:

0 – нет нарастания колонии гриба рода *Trichoderma* на колонию патогена,

1 – гриб рода *Trichoderma* занимает до 25 % площади колонии патогена;

2 – гриб рода *Trichoderma* занимает 25-50 % площади колонии патогена;

3 – гриб рода *Trichoderma* занимает 51-75 % площади колонии патогена;

4 – гриб рода *Trichoderma* занимает 76-100 % площади колонии патогена.

Для установления типа взаимоотношений исследуемых грибов нужно произвести микроскопирование зоны совместного роста колоний патогена и гриба рода *Trichoderma*.

Результаты эксперимента необходимо обработать статистически и представить в виде таблиц 7-10.

Таблица 7

Радиус колонии (мм) исследуемых грибов

Вид, штамм гриба	Время измерения, сут.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Таблица 8

Показатель ингибирования (%) фитопатогена грибом рода *Trichoderma*

Вид, штамм гриба	Время расчета, сут.	
	5	10

Таблица 9

Показатель ингибирования (%) гриба рода *Trichoderma* фитопатогеном

Вид, штамм гриба	Время расчета, сут.	
	5	10

Таблица 10

Антагонистическая активность грибов рода *Trichoderma*

Штамм гриба рода <i>Trichoderma</i>	Внешний вид колонии патогена	Степень нарастания колонии гриба рода <i>Trichoderma</i> , балл

ЗАНЯТИЕ 6

Тема: Антагонисты фитопатогенов среди эпифитных и ризосферных бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*

Цель: Ознакомиться с особенностями антагонистического влияния эпифитных и ризосферных бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* на фитопатогенные микромицеты.

Бактерии также могут воздействовать на фитопатогенные грибы, подавляя их развитие. Поэтому бактериальным штаммам-антагонистам

отводится важная роль в биологическом контроле патогенных микроорганизмов в агрофитоценозах. Преимущество использования бактерий-антагонистов заключается в их способности продуцировать высокоактивные антимикробные вещества, в том числе сидерофоры, антибиотики, ферменты, угнетающие рост и развитие патогенной биоты.

Среди микроорганизмов бактериальной природы весьма перспективными в качестве антагонистов фитопатогенных грибов считаются флюоресцирующие псевдомонады (род *Pseudomonas*). Многие ризосферные бактерии из рода *Pseudomonas* способны синтезировать и выделять в среду желто-зеленые пигменты, называемые пиовердинами, выполняющие в клетках функции сидерофоров. Данные вещества способны связывать ионы трехвалентного железа и облегчать транспорт их в клетку в условиях железодефицита, делая комплекс пигмент- Fe^{3+} недоступным для других организмов. Ионы железа, участвуя в окислительно-восстановительных реакциях, являются необходимыми в таких процессах, как дыхание, фотосинтез, фиксация молекулярного азота, и без них невозможно существование бактериальной клетки. Доступность железа и способность различных микроорганизмов конкурировать за него, являются факторами, контролирующими численность и состав группировок микроорганизмов. Благодаря этому флюоресцирующие пигменты ризосферных бактерий проявляют одновременно антибактериальную, антифунгальную и антинематодную активность.

Кроме продуцирования сидерофоров, супрессивное действие флюоресцирующих псевдомонад связано также с биосинтезом антибиотиков и конкуренцией за источники углерода. В целом флюоресцирующие псевдомонады весьма перспективны в качестве почвенных антагонистов фитопатогенных грибов. Они обладают рядом свойств, которые облегчают их использование: почва является для них естественной средой обитания, они способны усваивать разнообразные органические субстраты, легко приживаются в ризосфере различных растений и быстро увеличивают свою численность. Так, бактерии *Pseudomonas putida* КМБУ 4308, синтезирующие желто-зеленый флюоресцирующий пигмент пиовердин P_m , непатогенные для растений и животных, не фитотоксичные, хорошо размножающиеся в почве и ризосфере растений, явились основой биологического препарата защиты растений «Бактофил». «Бактофил» показал высокую эффективность защиты огурца и томата от болезней в защищенном грунте.

В настоящее время известно много видов бактерий, принадлежащих роду *Bacillus*, подавляющих рост патогенных грибов. Среди них – *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. mesenterius*, *B. mycoides*.

Среди различных видов бактерий рода *Bacillus* известными антагонистами патогенов являются бактерии *B. subtilis*. Спектр антибиотической активности бактерий *Bacillus subtilis* формируется за счет синтеза экзоферментов и антибиотиков. В основе их антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов лежит синтез клетками разнообразных антибиотиков пептидной природы: бацилломицин, итурины, микобациллин, микосубтилин, ризоктицины, фенгимицин, субспорин. Пептидные антибиотики, синтезируемые *B. subtilis*, ингибируют синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты, образование клеточной стенки, функционирование мембран. Эти свойства раскрывают большие возможности для исследований в плане создания на основе бактерий данного вида эффективных биопрепаратов.

Некоторые штаммы *B. subtilis* уже используются для защиты растений от болезней, в том числе и в период хранения продукции. Так, штамм *B. subtilis* ВНИИСХМ № 131 применяется для получения препарата «Фитоспорин», используемого для защиты яблок и винограда от гнилей при хранении. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* КМБУ 30043, антагонистически активный в отношении многих фитопатогенных бактерий и грибов, лег в основу биологического препарата защиты растений «Бактоген». Бактерии *B. subtilis* КМБУ 30043 синтезируют антибиотик ароматической природы с аминогликозидным компонентом, ингибирующий развитие фитопатогенов. Бактерии *B. subtilis* КМБУ 30043 являются непатогенными для растений и животных, не фитотоксичны, хорошо размножаются как в почве, так и в филлосфере растений. «Бактоген» показал высокую антагонистическую активность в отношении ряда фитопатогенных грибов в условиях защищенного грунта.

Задание:

1. Изучить влияние бактерий из родов *Bacillus* и *Pseudomonas* на рост и спорообразование фитопатогенных микромицетов.

Цель опыта: Изучить характер влияния бактерий из родов *Pseudomonas* и *Bacillus* на рост и спорообразование фитопатогенных микромицетов.

Оборудование: Микроскоп, бинокляр, пенал с набором инструментов, термостат.

Материал и условия проведения эксперимента: Изоляты фитопатогенных грибов, изоляты бактерий из родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Картофельно-глюкозная агаризованная среда (рН=7-7,2) (глюкоза может быть заменена сахарозой), t=20-22 °С.

Методика.

Бактерии исследуемых штаммов засеять кольцом ($r = 20$ мм) на подсушенную агаризованную среду в чашки Петри и инкубировать при температуре $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч.

В центр сформировавшегося бактериального кольца поместить мицелий фитопатогена и культивировать при комнатной температуре в течение 10 сут. В контрольных чашках фитопатоген выращивается изолированно от бактерий. Необходимо ежедневно учитывать диаметр колоний фитопатогена, описывать морфологию его колоний, отмечать изменение окраски колоний и субстрата. На 5-е и 10-е сут. нужно рассчитать показатель ингибирования (P, %) фитопатогена бактериями, а на 10-е сут. – интенсивность спорообразования фитопатогена.

Результаты эксперимента необходимо обработать статистически и представить в виде таблиц (11-13), графиков, диаграмм.

Таблица 11

Диаметр колонии фитопатогена (мм) в присутствии бактерий

Вид, штамм бактерий	Время измерения, сут.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Таблица 12

Показатель ингибирования (%) фитопатогена бактериями

Вид, штамм бактерий	Время расчета, сут.	
	5	10

Таблица 13

Интенсивность спорообразования (шт / cm^2) фитопатогена в присутствии бактерий

Вид, штамм бактерий	Место измерения интенсивности спорообразования		
	Центр колонии	Вблизи кольца бактерий	Край колонии

В конце раздела спецпрактикума «Экспериментальное изучение фитопатогенных микромицетов» студенты должны представить отчет, содержащий следующие разделы: введение, материал и методика, результаты и их обсуждение, выводы, список использованных источников.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабушкина И.Н.* Взаимоотношения почвенных микроскопических грибов с *Verticillium dahliae* Kleb. // Микология и фитопатология. Т.8. Вып. 5. 1974. С. 395-401.
2. *Бондарцев А.С.* Трутовые грибы Европейской части СССР и Кавказа. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1953. 1106 с.
3. *Гринько Н.Н., Успенская Г.Д.* Взаимоотношение организмов филлопланы огурца с *Ascochyta ciceris* Fautr. et Roum. // Микология и фитопатология. Т. 21. Вып. 6. 1987. С. 553-558.
4. *Литвинов М.А.* Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 124 с.
5. *Максимова Н.П., Поликсенова В.Д., Лысак В.В.* Антифунгальная активность биопрепаратов на основе природных ризосферных и эпифитных бактериальных штаммов // Эколого-экономические основы усовершенствования интегрированных систем защиты растений от вредителей, болезней и сорняков: Тез. докл. науч.-производ. конф., посвященной 25-летию БЕЛНИИЗР, Минск-Прилуки, 14-16 февраля 1996 г. / М-во сельск. хоз-ва и прод. Респ. Беларусь. Акад. аграр. наук Респ. Беларусь. Белорус. науч.-исслед. ин-т защиты растений. В 2 ч. Минск, 1996. Ч. 1. С. 147-149.
6. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов /Сост. М.К. Хохряков. Л.: ВИЗР, 1979. – 78 с.
7. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / Пер. с нем. К.В. Попковой, В.А. Шмыгли. М.: Агропромиздат, 1987. 224 с.
8. Методы экспериментальной микологии / Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
9. *Рудаков О.Л.* Микрофильные грибы, их биология и практическое значение. М.: Наука, 1981. 160 с.
10. *Сейкетов Г.Ш.* Грибы рода *Trichoderma* и их использование в практике. – Алма-Ата: Наука, 1982. 248 с.
11. Сравнение гиперпаразитической и антибиотической активности изолятов рода *Trichoderma* Pers.: Fr. и *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster по отношению к патогенам, вызывающим корневые гнили гороха / Л.Л. Великанов, Е.Ю. Сухоносенко, С.И. Николаева, И.А. Завелишко // Микология и фитопатология. Т. 28. Вып. 6. 1994. С. 52-56.
12. *Семенов С.М.* Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник. М.: Агропромиздат, 1990. 240 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ЗАНЯТИЕ 1.	7
ЗАНЯТИЕ 2.....	13
ЗАНЯТИЕ 3.....	17
ЗАНЯТИЕ 4.....	22
ЗАНЯТИЕ 5.....	30
ЗАНЯТИЕ 6.....	34
ЛИТЕРАТУРА.....	39

Учебное издание

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к занятиям спецпрактикума по разделу
«Микология. Методы экспериментального изучения
микроскопических грибов»
для студентов 4 курса дневного отделения специальности
«G 31 01 01 — Биология»

Авторы – составители:
Поликсенова Валентина Дмитриевна,
Храмцов Александр Константинович,
Пискун Светлана Георгиевна

В авторской редакции

Технический редактор
Корректор

Ответственный за выпуск *В.Д. Поликсенова*

Подписано в печать . Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. . Тираж 50 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.
Лицензия ЛВ № 315 от 14.07.98.
220050, Минск, проспект Франциска Скорины, 4.

Отпечатано на копировально-множительной технике
Белорусского государственного университета.
220064, Минск, ул. Курчатова, 10.