



УДК 632.4.01/.08
DOI 10.25230/conf12-2023-119-124

**ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФОМОЗА РАПСА *LEPTOSPHERIA MACULANS*
И *PLENODOMUS BIGLOBOSUS* НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ**

Кузнецова А.А.¹, Дудченко И.П.¹, Костин Н.К.^{1,2}

¹ ФГБУ «ВНИИКР», ² ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева
kuznec@bk.ru

Одно из распространенных заболеваний семейства крестоцветных (*Cruciferae* Juss.) в нашей стране – фомоз рапса, возбудителями которого являются *Leptosphaeria maculans* Ces. & De Not. и *Plenodomus biglobosus* (Shoemaker & H. Brun) Gruyter, Aveskamp & Verkley. Рапс – это экспортная культура, растительный материал которой в основном поставляется в Китай. Согласно фитосанитарным требованиям Китая во ввозимой подкарантинной продукции рапса из России должен отсутствовать возбудитель *L. maculans*. Виды *L. maculans* и *P. biglobosus* сходны по внешним симптомам проявления заболевания и при визуальном осмотре трудноотличимы друг от друга. В данной работе изучены и описаны культурально-морфологические признаки *L. maculans* и *P. biglobosus* с использованием разных питательных сред. В результате определена оптимальная питательная среда 2 % КГА для наилучшего роста и развития спороношения *L. maculans*. На основе среды 2 % КГА приведены диагностически



значимые отличия двух видов *L. maculans* и *P. biglobosus*, необходимые для точной идентификации в области практических фитосанитарных исследований.

Ключевые слова: фомоз рапса, *Leptosphaeria maculans*, *Plenodomus biglobosus*, идентификация, морфология, питательные среды.

Введение. Вид *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not. впервые описан ученым Tode еще в 1791 году, который отмечал высокую патогенность гриба на растениях капусты. Однако *L. maculans* до начала XXI века считался видом, состоящим из двух групп изолятов, которые микологами назывались по-разному. Так, в 1990 г. ученые Johnson и Lewis предложили назвать их группами «А» и «В» [1]. В 1991 г. ученые Koch et al выдвинули гипотезу, что выделенные группы вида *L. maculans* относятся к разным видам [2]. В 2001 году ученые R.A. Shoemaker и H. Brun описали различия групп изолятов по морфологическому строению псевдотециев, на основании полученных исследований выделили изоляты группы «В» как самостоятельный вид – *Plenodomus biglobosus* (Shoemaker & H. Brun) Gruyter, Aveskamp & Verkley (голотип DAOM 226287) [3,4,5]. Таким образом, на данный момент существуют два независимых друг от друга вида, вызывающие заболевание фомоза рапса – *L. maculans* и *P. biglobosus*.

Фомоз рапса, вызываемый *L. maculans* и *P. biglobosus*, представляет собой серьезное заболевание масличного рапса. Сильные эпифитотии возникают как на озимых, так и на яровых посевах рапса во многих странах мира. Вид *L. maculans*, а именно его несовершенная стадия *P. lingam*, в России распространена практически повсеместно [4]. Заболевание фомоза имеет экономическое значение в основных регионах возделывания рапса. На поздних стадиях развития заболевания снижаются количественные и качественные показатели урожайности семян и зеленой массы до 50 % и более [6].

Два близкородственных вида *L. maculans* и *P. biglobosus* различаются между собой по патогенным свойствам к растениям-хозяевам. Вид *L. maculans* обладает большей патогенностью, чем *P. biglobosus*, поражая нижние части растений и вызывая гибель проростков на молодых посадках рапса – «черную ножку», а также поражения основания стебля в виде некрозов – рак корневой шейки [7]. Вид *P. biglobosus* считается менее патогенным, повреждая верхние части стебля и листья. Гриб проникает в сердцевину стебля и вызывает побурение внутренней части, при этом зачастую не приводя к внешним симптомам [8]. Однако при старении на поверхности стеблей оба вида развивают многочисленные пикниды [9]. Виды *L. maculans* и *P. biglobosus* имеют очень сходные симптомы поражения на растениях рапса, поэтому визуальная идентификация затруднительна.

В настоящее время приоритетным направлением в России является развитие агропромышленного комплекса, который включает экспорт сельскохозяйственной продукции в другие страны, в том числе в страны Восточной Азии. Китай выставляет свои фитосанитарные требования для ввоза экспортной продукции рапса на отсутствие возбудителя фомоза рапса *L. maculans*. Главными задачами специалистов, проводящих фитосанитарную экспертизу, является быстрое выявление и точная идентификация *L. maculans* при досмотре растительной и семенной продукции образцов растений рапса.

Таким образом, цель работы заключалась в подробном изучении культурально-морфологических особенностей целевого вида *L. maculans* и сходного вида *P. biglobosus*, с описанием отличительных признаков друг от друга на определённой питательной среде.

Материалы и методы. Первоначально исследование заключалось в подборе оптимальной питательной среды для вида *L. maculans* с целью получения быстрого роста, развитого воздушного мицелия и пикнид с пикноспорами за минимальное время. Параллельно для сравнения культурально-морфологических характеристик проводили опыт с близкородственным видом *P. biglobosus*, встречающимся на растениях рапса.



Тестируемые изоляты двух видов *L. maculans* и *P. biglobosus* сеяли в трех повторностях на чашки Петри (d 90 мм) на пять различных по составу питательных сред: 2 % картофельно-глюкозный агар (КГА); 2 % солодовый агар (МА); среда Чапека (Cha); агар из кусочков моркови (СА); овощной агар из 8 соков (V8).

В дальнейшем культивировали при температуре 25 °С в термостате Panasonic MIR 250 с чередованием света и темноты (12ч/12ч). Оценку роста и культурально-морфологических признаков проводили на 7-е, 14-е, 21-е сутки.

В опыте оценивали окраску, строение, форму воздушного мицелия, края колонии; учитывали скорость роста, время развития пикнид и созревание пикноспор; присутствие или отсутствие пигмента в субстрате, выделяемого грибами. Завершающим этапом являлась сравнительная характеристика двух видов на оптимальной питательной среде.

Оценку колоний осуществляли с помощью стереомикроскопов Stemi-2000 CS и SteReo Discovery V20. Пикниды и пикноспоры исследовались с помощью микроскопа Olympus Bx43F с применением программного обеспечения Olympus cell Sens Standard 2.3.

Результаты исследований. В результате первичного осмотра на 7-е сутки рост и развитие *L. maculans* и *P. biglobosus* на всех питательных средах отличались между собой.

На начальном этапе на питательной среде СА у колоний двух видов отмечался быстрый рост (в среднем $43 \pm 0,2$ мм) и активно развивался воздушный мицелий. Но на среде КГА виды наиболее отличались между собой по характеру роста, окраске, структуре воздушного мицелия и края колонии. Скорость роста на данной среде была приблизительно одинакова у обоих изолятов (у *P. biglobosus* $\varnothing 37 \pm 0,3$ мм, у *L. maculans* $\varnothing 40 \pm 0,3$ мм). Минимальный рост и скудное развитие воздушного мицелия у обоих изолятов отмечены на среде V8. На средах МА и Cha изоляты проявляли себя как среднерастущие.

На 14-е сутки у обоих видов характер роста колоний и развитие воздушного мицелия более выражено изменились на всех тестируемых средах. На среде КГА вид *L. maculans* имел неопушенный мицелий, бежево-серого цвета с выраженным лопастным краем, с реверсом темно-серого цвета с бежевым краем, без пигментации среды, с небольшим формированием темных пикнид.

Вид *P. biglobosus* характеризовался бежево-коричневой окраской, слабо опушенным мицелием, зональным строением со светло-бежевым ровным краем, с пигментированным реверсом оранжево-лимонного цвета, с формированием многочисленных пикнид в центре колонии. Скорость роста колонии *P. biglobosus* на среде КГА достигала $\varnothing 65 \pm 0,1$ мм, а скорость роста колонии *L. maculans* замедлилась и составляла $\varnothing 45 \pm 0,3$ мм.

На среде МА изоляты слабо отличались по развитию воздушного мицелия, не образовывали пикнид и характеризовались невысокой скоростью роста, в среднем $\varnothing 41 \pm 0,1$ мм. На среде Cha изоляты слабо развивались, образовывали незональную поверхность, слабоопушенный воздушный мицелий, без образования морфологических структур, отличались по форме мицелия и образованию пигмента. На среде СА мицелий формировался опушенным по всей поверхности, без конкретных культурально-морфологических различий, но оба изолята на данной среде имели наиболее сильный рост, в среднем $80 \pm 0,5$ мм. На среде V8 воздушный мицелий грибов не развивался.

На 21-е сутки окончательно было установлено, что *L. maculans* и *P. biglobosus* наиболее отличались друг от друга по определенным культурально-морфологическим признакам на среде КГА. Вид *L. maculans* имел слабоопушенный воздушный мицелий бежево-серого цвета, характеризовался ростом в виде отдельных тяжей мицелия с лопастным краем колонии, с образованием полупогруженных и погруженных, одиночных или скученных, темных пикнид в центре колонии размером в среднем до 0,2 см в диаметре, без развитого спороношения. Скорость развития колонии составляла $65 \text{ мм} \pm 0,3$ мм. Реверзум темно-коричневый, с бежевым краем, без пигментации субстрата.



Вид *P. biglobosus* характеризовался бежево-коричневым мицелием, с рыжими вкраплениями, средне опушенный, зональной поверхностью с многочисленными развитыми поверхностными или полупогруженными, одиночными, темными пикнидами размером в среднем до 0,1 см в диаметре, с развитым спороношением. При осмотре мицелий достигал края чашки. Реверзум имел темно-коричневую окраску с оранжево-лимонной пигментацией.

На среде МА мицелий имел у обоих изолятов складчатую поверхность, с единичными пикнидами без развитого спороношения, характер роста мицелия незначительно отличался, а также скорость роста значительно уступала среде КГА и достигала на 21-е сутки в среднем $52 \pm 0,2$ мм. На СА воздушный мицелий изолятов не имел характерных отличий, хотя рост мицелия был выше, чем на других средах. На среде Cha колония *L. maculans* отличалась *P. biglobosus* формой и строением воздушного мицелия, а также отсутствием пигмента в субстрате, но в течение своего развития скудно образовывала пикниды. На среде V8 у тестируемых изолятов отсутствовал культуральный рост и не образовывались морфологические структуры.

Изображения колоний чашек с культуральным ростом и развитием *L. maculans* и *P. biglobosus* на различных питательных средах на 21-е сутки представлены в таблице 1.

Таблица 1. Культуральный рост и развитие изолятов грибов *L. maculans* и *P. biglobosus* на различных питательных средах (21-е сутки)

Питательная среда	Название изолята гриба			
	<i>L. maculans</i> – наружная поверхность чашки	<i>L. maculans</i> – обратная поверхность чашки	<i>P. biglobosus</i> – наружная поверхность чашки	<i>P. biglobosus</i> – обратная поверхность чашки
КГА				
МА				
Cha				
СА				
V8				

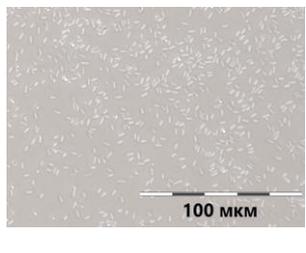
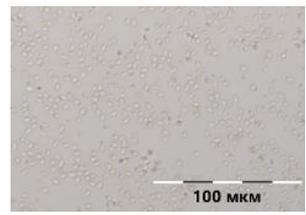


В дальнейшем на основе среды КГА проведено культурально-морфологическое сравнение двух видов *L. maculans* и *P. biglobosus*.

На среде КГА вид *L. maculans* характеризовался более медленным ростом, чем *P. biglobosus*, достигая края чашки только к 28 дню. Рост воздушного мицелия часто имел мицелиальный с лопастным краем колонии, характеризовался волокнистой структурой, изначально цвет мицелия - светло-бежевый, в дальнейшем темнел и становился бежево-серый; реверзум колонии меланизированный, но в субстрате пигментация отсутствовала. Пикниды темного цвета, вытянутые, полупогруженные и погруженные, одиночные или скученные, появлялись на 10-й день культивирования. Пикноспоры преимущественно овальные, одиночно встречались вытянутые или слегка изогнутые, размером в ширину меньше, чем у *P. biglobosus* (в среднем 3,92 x 1,69 мкм).

Вид *P. biglobosus* характеризовался более быстрым ростом по сравнению с *L. maculans*, достигая края чашки к 16-м суткам. Изначально имел кремовую окраску, в дальнейшем приобретал бежево-коричневый цвет мицелия, характеризовался зональной поверхностью с ровным краем колонии; реверзум имеет выраженный оранжево-лимонный пигмент. Пикниды темного цвета, шаровидные, полупогруженные или поверхностные, появлялись на 6-й день культивирования. Пикноспоры овальные или шаровидные, округлые с обеих сторон или с одной, размеры в ширину больше, чем у *L. maculans* (в среднем 3,94 x 2,66 мкм) (табл. 2).

Таблица 2. Культурально-морфологические признаки изолятов грибов *L. maculans* и *P. biglobosus* на 2 % КГА

Название изолята	Наружная поверхность чашки	Обратная поверхность чашки	Наружная поверхность с образованием пикнид гриба	Пикноспоры изолятов (40x)
<i>L. maculans</i>				
<i>P. biglobosus</i>				

Заключение. В результате проведенных опытов было показано, что оптимальной средой для быстрого культурального роста и получения морфологически значимых структур (пикнид и пикноспор) для возбудителя фомоза рапса *L. maculans* является среда 2 % КГА.

Данная среда является информативной по культурально-морфологическим признакам для отличия *L. maculans* и *P. biglobosus* друг от друга. Отмечено, что основными признаками различия являются строение и окраска воздушного мицелия, скорость роста колоний, форма и строение пикнид и пикноспор, а также окрашивание среды в оранжево-лимонный цвет при культивировании вида *P. biglobosus*.

В результате работы, полученные данные, могут быть использованы для диагностики патогенов в рамках проведения фитосанитарных исследований по предотвращению



проникновения возбудителя фомоза рапса *L. maculans* на территорию стран-импортеров с подкарантинной продукцией.

Литература

1. Johnson R.D., Lewis B.G. DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans* // Physiological and Molecular Plant Pathology. 1990. Vol. 37. № 6. P. 417–424.
2. Koch E. et al. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1991. Vol. 4. № 4. P. 341–349.
3. Shoemaker R.A., Brun H. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans* // Canadian Journal of Botany. 2001. Vol. 79. № 4. P. 412–419.
4. Гасич Е.Л. Фомоз рапса (обзор литературы) // Вестник защиты растений. 2004. № 1. С. 11–24.
5. Williams R.H., Fitt B.D.L. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape // Plant Pathology. 1999. Vol. 48. № 2. P. 161–175.
6. Пересыпкин В.Ф. и др. Болезни технических культур // М.: Агропромиздат. 1986. Т. 9.
7. West J.S. et al. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe // Plant pathology. 2001. Vol. 50. № 1. P. 10–27.
8. Johnson R.D., Lewis B.G. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans* // Plant Pathology. 1994. Vol. 43. № 2. P. 269–277.
9. Zhang X. et al. *Leptosphaeria* spp., phoma stem canker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China // Plant Pathology. 2014. Vol. 63. № 3. P. 598–612.

STUDY OF CULTURAL AND MORPHOLOGICAL TRAITS OF *LEPTOSPHERIA MACULANS* AND *PLENODOMUS BIGLOBOSUS* PHOMA ROT PATHOGENS ON DIFFERENT NUTRIENT MEDIA

Kuznetsova A.A.¹, Dudchenko I.P.¹, Kostin N.K.^{1,2}

¹All-Russian Plant Quarantine Center, ²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy

One of the widespread diseases of the cruciferous family (*Cruciferae* Juss.) in our country is rapeseed Phoma rot, the pathogens of which are *Leptosphaeria maculans* Ces. & De Not. and *Plenodomus biglobosus* (Shoemaker & H. Brun) Gruyter, Aveskamp & Verkley. Rapeseed is an export crop whose plant material is mainly shipped to China. According to phytosanitary requirements of China, the imported quarantined products of rapeseed from Russia must be free from *L. maculans* pathogen. *L. maculans* and *P. biglobosus* species are similar in their external symptoms and are difficult to distinguish from each other upon visual inspection. In this work we studied and described the cultural and morphological traits of *L. maculans* and *P. biglobosus* using different nutrient media. As a result, we determined that the 2 % potato dextrose agar medium is the optimal nutrient medium for the best growth and development of *L. maculans* sporulation. On the basis of the 2 % potato dextrose agar medium, the diagnostically relevant differences between the two species of *L. maculans* and *P. biglobosus* are listed for accurate identification in practical phytosanitary research.

Key words: rapeseed Phoma rot, *Leptosphaeria maculans*, *Plenodomus biglobosus*, identification, morphology, nutrient media.