

УДК: 582.288:576.8.095.3

## ТРОФИЧЕСКИЕ ПОТРЕБНОСТИ ГРИБА *FUSARIUM SP.* (AF-967)

Д. Д. ДОРОФЕЕВ\*, Г. Д. ДЕВЯТКИНА, Е. Н. ДРТЕМЕНКО

(Кафедра фитопатологии)

**Изучали трофические потребности гриба *Fusarium sp.* (AF-967), который в лабораторных и полевых условиях проявлял антагонистическую активность в отношении возбудителей корневых гнилей пшеницы, ячменя, кормовой свеклы и других культур. Разработаны питательные среды для массового получения конидий (биопрепарата) и мицелия гриба в условиях глубинного культивирования.**

В 1995 г. на кафедре фитопатологии ТСХА был выделен новый гриб из рода *Fusarium*, получивший название *Fusarium sp.* (AF-967) [1]. Этот гриб *in vitro* проявлял антагонистическую активность в отношении некоторых возбудителей корневых гнилей. Эффективность гриба была показана в лабораторных и полевых опытах на пшенице, ячмене, люпине, огурцах и кормовой свекле [4, 6, 9].

Во всех исследованиях в качестве биоагента были использованы споры *F. sp.* (AF-967), которые получали

на агаризованных средах. Однако этот способ культивирования гриба исключает возможность массового получения спор и проверки антипатогенной активности различных метаболитов гриба. В связи с этим в задачу наших исследований входило изучение трофических потребностей гриба *Fusarium sp.* (AF-967) в условиях глубинного культивирования и разработка на их основе питательных сред, обеспечивающих массовое\* получение спор и быстрое накопление биомассы гриба.

\* ВНИИ фитопатологии.

Для получения конидий и мицелия гриба в глубинной культуре жидкий инокулюм выращивали на среде Райстрика в течение 24 ч на ротационной качалке при 220 об/мин и 26°C. Инокулюм вносили в различные среды или их модификации в количестве 7—10% к объему среды и культивировали при указанных выше условиях. Через 2, 4 и 8 сут. культивирования мицелий отделяли от культуральной жидкости через капроновый фильтр, промывали дистиллированной водой и отжимали. Сухую массу определяли после высушивания мицелия до постоянного веса при температуре 105°C. Концентрацию конидий в фильтрате культуральной жидкости определяли при помощи камеры Горяева.

Трофические потребности грибов существенно различаются не только у представителей различных родов и видов, но и внутри одного вида — у штаммов и изолятов [3, 7]. Вегетативный рост и спороношение одного и того же штамма эффективно регулируются источниками питания. В связи с этим на первом этапе исследований для глубинного культивирования гриба *F. sp.* (AF-967) нами были отобраны питательные среды Чапека, Миро, Парка, Билай и Райстрика, которые характеризуются наиболее контрастным составом источников углерода, азота и минеральных компонентов [2, 8, 10].

Как показали полученные результаты (табл. 1), наиболее интенсивный вегетативный рост (максимум биомас-

Т а б л и ц а 1

**Динамика образования конидий и биомассы гриба  
*Fusarium sp.* (AF-967) на различных питательных средах**

Среда	Конидии (млрд/л), сутки			Биомасса (г/л), сутки		
	2	4	8	2	4	8
Чапека	22,9	24,0	39,0	5,502	5,869	3,116
Миро	1,5	1,6	2,5	4,875	5,205	5,933
Парка	2,1	3,4	6,5	1,065	0,535	0,000
Билай	3,4	3,4	29,3	4,044	5,797	8,601
Райстрика	10,2	20,1	41,8	11,716	9,058	5,955

сы на 2-е сутки) был отмечен на среде Райстрика, которая отличается от других использованных сред высокими концентрациями питательных элементов. Кроме того, на этой среде получена максимальная концентрация спор (фаза интенсивного лизиса мицелия — 8-е сутки культивирования). Однако наиболее ранняя и интенсивная споруляция была отмечена на среде Чапека (на 2-4-е сутки культивирования). По накоплению биомассы среда Чапека на этом этапе уступала только среде Райстрика (см. табл. 1).

Исходя из этих показателей для оптимизации уровня спороношения и выхода биомассы в качестве основы была выбрана среда Чапека, а для получения инокулюма во всех опытах использовали среду Райстрика. Так как

в любой питательной среде наиболее значительную роль играют источники углерода и азота, для выявления их влияния на рост и спороношение *F. sp.* (AF-967) проводили последовательную замену сахарозы и  $\text{NaN}_3$ , в среде Чапека, на эквимольные количества других веществ. В качестве источников углерода использовали вещества, относящиеся к различным химическим группам: моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды и полиспирты (табл. 2).

Анализ полученных данных показал, что максимальный вегетативный рост гриба обеспечивала сахароза, в то время как для спороношения наиболее эффективной была фруктоза (см. табл. 2). Оптимальный срок культивирования в обоих случаях составил 4 суток. Наибольшую

Т а б л и ц а 2

**Влияние источников углерода на динамику спороношения и роста гриба *Fusarium sp.* (AF-967)**

Источник	Конидии (% к контролю), сутки			Биомасса (% к контролю), сутки		
	2	4	8	2	4	8
Сахароза*	100	100	100	100	100	100
Глюкоза	141,4	137,2	138,1	115,9	75,0	63,3
Фруктоза	212,8	228,2	285,7	95,7	ад,9	5,9
Мальтоза	105,7	153,8	285,1	84,6	70,0	33,4
Рафиноза	207,1	147,4	257,1	80,3	62,2	10,9
Маннит	140,0	164,0	338,1	67,3	68,8	51,6

\* Среда Чапека (контроль).

сбалансированность по накоплению мицелия и спор обеспечивали мальтоза, рафиноза и маннит.

Влияние источников азота на рост и спороношение *F. sp.* (AF-967) изучали путем полной или частичной замены

$\text{NaNO}_3$  на другие формы неорганического или органического азота (табл. 3). Кроме того, была проведена оценка суммарного влияния органического и минерального азота на рост и спороношение гриба.

Т а б л и ц а 3

**Влияние источников азота на динамику спороношения и роста гриба *Fusarium sp.* (AF-967)**

Источник азота	Конидии (% к контролю), сутки			Биомасса (% к контролю), сутки		
	2	4	8	2	4	8
$\text{NaNO}_3^*$	100	100	100	100	100	100
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,4	18,4	38,3	64,1	127,7	149,3
Дрожжевой экстракт	56,4	63,1	58,3	154,0	139,6	141,8
Гидролизат казеина	48,7	50,5	32,2	141,0	146,7	142,3
Пептон	98,4	108,7	93,9	341,2	401,2	863,2
Соевая мука	267,7	383,5	233,0	296,4	404,4	691,2
Дрожжевой автолизат	119,5	139,8	78,3	403,6	447,4	779,3
$\text{NaNO}_3$ + пептон	161,4	139,8	173,0	171,0	159,1	270,7

\* Среда Чапека (контроль).

Как показали результаты опытов, для вегетативного роста гриба предпочтительнее органические формы азота в виде дрожжевого автолизата, пептона или соевой муки, тогда как значительное повышение споруляции отмечено только в варианте с соевой мукой (табл. 3). Комбинированный источник азота ( $\text{NaNO}_3$  + пептон) также стимулировал рост мицелия и

споруляцию, но уступал по этим показателям соевой муке.

Дальнейшую оптимизацию сред культивирования гриба по источникам азота и углерода проводили на фоне соевой муки, обеспечивающей как высокий уровень спороношения, так и активный рост мицелия (табл. 3). В этих исследованиях, кроме мальтозы, рафинозы и маннита,

в качестве источников углерода были использованы богатое мальтозой пивное сусло и меласса, характеризующаяся высоким уровнем сахарозы [5].

Результаты показали, что пивное сусло и меласса наиболее благоприятны для спороношения гриба и значительно превосходят по данному параметру чистые препараты сахаров (табл. 4). Максимальное количество биомассы накапливалось на мелассе на 2-4-е сутки культивирования, хотя через 8 суток основная масса мицелия лизировала. В других вариантах гриб находился в стадии активного роста до конца эксперимента. Однако в этих опытах результаты по динамике роста гриба весьма условны, так как в мицелии содежитсся значительная примесь соевой муки, кото-

рую очень сложно отделить от биомассы гриба. Поэтому для накопления мицелия *F. sp.* (AF-967) в качестве источника азота и углерода целесообразнее использовать соответственно пептон и мелассу. Оптимизацию их количественного соотношения проводили по схеме, в которой максимальные концентрации компонентов соответствовали концентрации углерода и азота в среде Чапека. Учет количества биомассы и интенсивности спороношения проведен в 2-суточной культуре. Оптимальными для роста мицелия оказались: максимальная концентрация мелассы (60 г/л) и минимальная пептона (0,8 г/л). Максимальную споруляцию гриба обеспечивала средняя концентрация мелассы 40 г/л и минимальная пептона 0,8 г/л (табл. 5).

Т а б л и ц а 4

Динамика спороношения и роста гриба *Fusarium sp.* (AF-967) на средах, содержащих искусственные источники углерода\*

Источник углерода	Конидии (% к контролю), сутки			Биомасса (% к контролю)**, сутки		
	2	4	8	2	4	8
Фруктоза (контроль)	100	100	100	100	100	100
Мальтоза	154,4	151,0	158,8	99,4	115,0	98,6
Маннит	120,4	131,0	94,3	74,3	76,7	55,8
Пивное сусло	212,6	210,0	172,7	131,5	131,4	103,3
Меласса	200	136,1	123,7	343,8	228,4	19,8

\* На фоне соевой муки (источник азота).

\*\* В биомассе значительная примесь соевой муки.

Т а б л и ц а 5

**Влияние соотношений  
концентраций источников  
азота и углерода на  
спороношение и рост гриба  
*Fusarium sp.* (AF-967)**

Концен- трация пептона, г/л	Концентрация мелассы, г/л		
	60	40	20

*Конидии, млрд/л* (г)

2,3	9,2	9,9	7,3
1,5	10,0	10,8	8,5
(18)	7,3	19,0	13,3

*Биомасса, г/л\*\**

2,2	7,01	5,34	3,42
1,5	6,09	4,79	2,81
0,8	7,74	3,93	2,25

\* НСР<sub>3</sub>, 2,803.

\* НСР<sub>15</sub> 1,090.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработаны питательные среды для наработки спор и мицелия *Fusarium sp.* (AF-967), позволяющие учитывать особенности трофических потребностей гриба.

### Выводы

1. Изучено влияние источников азота и углерода на рост и спороношение гриба *F. sp.* (AF-967).

2. Разработана среда для наработки мицелия гриба, содержащая мелассу (60 г/л), пептон (0,8 г/л) и минимальную основу среды Чапека.

Определен оптимальный срок культивирования *F. sp.* (AF-967) для получения биомассы, составивший 2 суток.

3. Для получения спор гриба *F. sp.* (AF-967) рекомендована среда, состоящая из пивного суслу (150 мл/л при 20% содержании сахаров), соевой муки (4,7 г/л) и минеральной основы среды Чапека. Оптимальный срок культивирования гриба составил 4 суток.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Афанди М. А., Шкалик В. А., Шильникова В. К., Сизова Т. П. Гриб-антагонист в ризосфере яровой пшеницы. — Защита и карантин растений, 1995, № 3, с. 19. —
2. Булай В. И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова Думка, 1973. —
3. Булай В. И. Основы общей микологии. Киев: Вища школа, 1974. —
4. Зубейру А. М. Биологические и технологические особенности гриба *Fusarium sp.* (AF-967) — антагониста возбудителей корневых гнилей некоторых сельскохозяйственных культур. Автореф. канд. дис. М.: МСХА, 1997. —
5. Липиньш Г. К., Дунце М. Э. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. Рига: Зинатне, 1986. —
6. Мусеева А. П. Обоснование

применения биологических средств в защите полевых культур от болезней. Автореф. канд. дис. М.: МСХА, 1999. — 7. Мюллер Э., Леффлер В. Микология. М.: Мир, 1995. — 8. Райлло А. И. Грибы рода фузариум. М.: Сельхозгиз, 1950. — 9. Хашем М. Биологические основы защиты яровой пшеницы от фузариоза колоса. Автореф. канд. дис. М.: МСХА, 2000. — 10. Dhingra O. D., Sinclair J. B. Basic plant pathology methods. 1986.

*Статья поступила  
13 декабря 2000 г.*

## SUMMARY

Trophic requirements of fungus *Fusarium* sp. (AF-967) which in laboratory and field conditions showed antagonistic activity to agents of root rot of wheat, barley, fodder beet and other crops were investigated. Nutrient media have been developed for mass production of conidia (biopreparation) and mycelium of the fungus under conditions of deep cultivation.