

ПОЛУЧЕНИЕ СУХОЙ БИОМАССЫ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* ВКМ F-4876D И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ПРОТИВОГРИБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ФУЗАРИОЗА

Хатем Амжад – аспирант кафедры микробиологии и иммунобиологии института Агробиотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»/ E-mail: amjadhatemphd92@gmail.com

Карпова Наталья Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник группы биотехнологии физиологически активных веществ ФИЦ Биотехнологии РАН? E-mail: ashatanr@mail.ru

Джавахия Вахтанг Витальевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы биотехнологии физиологически активных веществ ФИЦ Биотехнологии РАН? E-mail: vahoru@mail.ru

Аннотация. Приведены данные по изучению противогрибного действия сухой биомассы гриба *Penicillium chrysogenum* ВКМ F-4876D как при индивидуальном применении, так и в комбинации с химическими фунгицидами. Полученные результаты могут послужить основой для разработки эффективного метода контроля за заболеваемостью, который может быть использован в интегрированной защите сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: сухая грибная биомасса, *P. chrysogenum*, фузариоз, пестициды, биофунгициды.

Среди возбудителей болезней сельскохозяйственных растений одна из ведущих ролей принадлежит грибам рода *Fusarium*. Известна способность большинства грибов продуцировать в процессе жизнедеятельности высокотоксичные метаболиты, которые, как правило, являются стойкими соединениями и длительное время сохраняются в продуктах питания и кормах на основе зернового сырья [3]. Несмотря на существующие преимущества, биологические средства борьбы с фитопатогенами уступают химическим. В связи с чем, полный отказ от современных фунгицидных препаратов, с практической точки зрения, невозможен [1]. Альтернативным способом контроля за заболеваемостью сельскохозяйственных растений могло бы стать комбинирование химических фунгицидов с биологически активными соединениями микробного или растительного происхождения, а также их искусственно синтезированными аналогами [2, 4]. Полученный в результате использования подобных комбинаций противогрибной эффект может быть или аддитивным, или синергетическим, что позволяет без потери эффективности значительно снизить рабочие концентрации фунгицидных препаратов до

уровней, при которых они были бы неэффективны при применении в одиночку [3].

Цель представленного исследования состояла в изучении способности сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876В подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов, как при индивидуальном применении, так и в комбинации с коммерчески используемыми фунгицидами - азоксистробином и флудиоксонилем. В качестве тест-культур были выбраны *Fusarium oxysporum* и *Fusarium graminearum*, известные своей способностью вызывать корневые гнили и фузариоза колоса.

Материалы и методы. Штамм *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D получен из рабочей коллекции лаборатории биотехнологии физиологически активных веществ ФИЦ Биотехнологии РАН. Штаммы *F. oxysporum* МР-14-6 и *F. graminearum* FG-33 были получены из Центра коллективного пользования «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сорто-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ЦКП ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ). *P. chrysogenum* поддерживали на среде следующего состава (г/л): агар - 20, глюкоза - 30, глицерин - 70, соевая мука - 10, мясной пептон - 10, NaNO_3 - 2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1, pH = 6,3-6,5. Для поддержания штаммов фитопатогенных микроорганизмов использовали агаризованную картофельную среду с декстрозой (КГА). Для получения посевного материала *P. chrysogenum* использовали жидкую вегетативную среду следующего состава (г/л): сахароза - 100, соевая мука - 20, триптон - 10, NaNO_3 - 2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1, (pH среды до стерилизации 5,7 - 6,0). Полученную среду разливали в 1 л качалочные колбы по 250 мл среды и стерилизовали при 120 °С в течение 30 мин. Затем, после охлаждения, колбы засеивали споровой суспензией *P. chrysogenum* и помещали на качалочную установку «Innova 44» при 220 об/мин (эксцентриситет 5 см) и 24 °С на 2 суток. Культивирование *P. chrysogenum* вели в ферментационной установке объемом 15 л и рабочим объемом не более 10 л. Приготовление и стерилизацию питательной среды осуществляли непосредственно в ферментере. Предварительно аппарат стерилизовали вместе с воздушными фильтрами при температуре $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. После стерилизации ферментационной установки готовили питательную среду следующего состава (г/л): сахароза - 100, соевая мука - 30, триптон - 10, NaNO_3 - 2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1, pH - 6,8 - 7,0. Количество посевного материала для засева аппарата составляло 10% об. Посевной материал подавался по посевной линии. Выращивание биомассы вели при 24 °С и перемешивании 500-600 об/мин. Через 4 суток роста биомассу инактивировали при температуре 80°С в течение 30 мин. Биомассу сливали в приемник, центрифугировали и сушили на лиофильной сушилке. Полученную сухую биомассу (БМ) использовали для определения противогрибной активности. Для получения агаризованной среды, содержащей БМ *P. chrysogenum*, стерильную водную суспензию БМ вносили в колбы со средой после стерилизации до получения конечной концентрации согласно условиям

эксперимента. Фунгицид добавляли в колбы со средой КГА или средой КГА, содержащей БМ, после стерилизации в виде раствора в стерильной воде до получения концентрации (мг/л) 0,1 – 5,0 мг/л в зависимости от фунгицида. Полученные среды тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри.

Для исследования противогрибной активности использовали метод радиального роста. Противогрибную активность вычисляли по формуле:

$$ПА = \left(1 - \frac{D_o}{D_k}\right) \times 100\%$$

где D_o - диаметр колонии в опытном варианте, мм

D_k - диаметр колонии в контрольном варианте, мм

Контролем служили чашки Петри с патогеном, выращенные на среде КГА. Противогрибной эффект регистрировали на 3, 7 и 14 сутки.

Результаты и обсуждение. Определено количество БМ, необходимое для подавления роста и развития фитопатогенов. Из представленных на рисунке 1 результатов можно заключить, что БМ ингибирует рост исследуемых фитопатогенов с разной степенью эффективности. Наиболее чувствительным в выбранной паре тест-объектов оказался *F. oxysporum*. При концентрации БМ 7,5-10,0 г/л наблюдалось практически полное подавление фитопатогена в течение всего периода наблюдения. *F. graminearum* оказался менее чувствительным к БМ в исследуемом диапазоне концентраций. Высокий (более 50%) противогрибной эффект наблюдался на 3 (80-88%) и 7 сутки (64-70%) опыта для концентраций биомассы – 7,5 и 10,0 г/л соответственно. Для исследования противогрибной активности химических фунгицидов и БМ была выбрана сублетальная доза последней, равная 5 г/л. Концентрация тестируемые фунгицидов - азоксистробина и флудиоксонила - составляла – 1,0 – 5,0 мг/л и 0,1 – 5,0 мг/л. Установлено, что противогрибная активность *F. oxysporum* и *F. graminearum* по отношению к азоксистробину в выбранном диапазоне концентраций (1,0 – 5,0 мг/л) незначительная. Но комбинирование БМ в количестве 5,0 г/л и фунгицида при концентрациях (0,5-2,5 мг/л) позволяет получить высокий (>50%) противогрибной эффект, сохраняющийся в течение всего периода наблюдений.

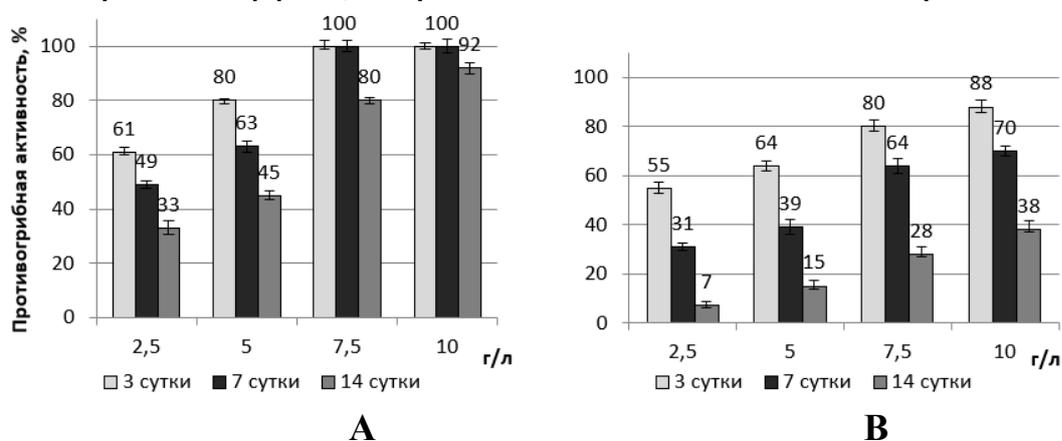


Рисунок 1 - Противогрибная активность (%) БМ *P. chrysogenum* по отношению к *F. oxysporum* (А) и *F. graminearum* (В).

Было определено, что при концентрации флудиоксонила 2,5 – 5,0 мг/л наблюдается значительное ингибирование роста и развития фитопатогенов. Для исследования были выбраны концентрации фунгицида равные 0,1 – 1 мг/л. В

результате было установлено, что комбинированное использование БМ (5 г/л) и флудиоксонила в исследуемых концентрациях привело к значительному (более 50%) ингибированию роста и развития фитопатогенов в опытах *in vitro*. Результаты проиллюстрированы на рисунке 2.

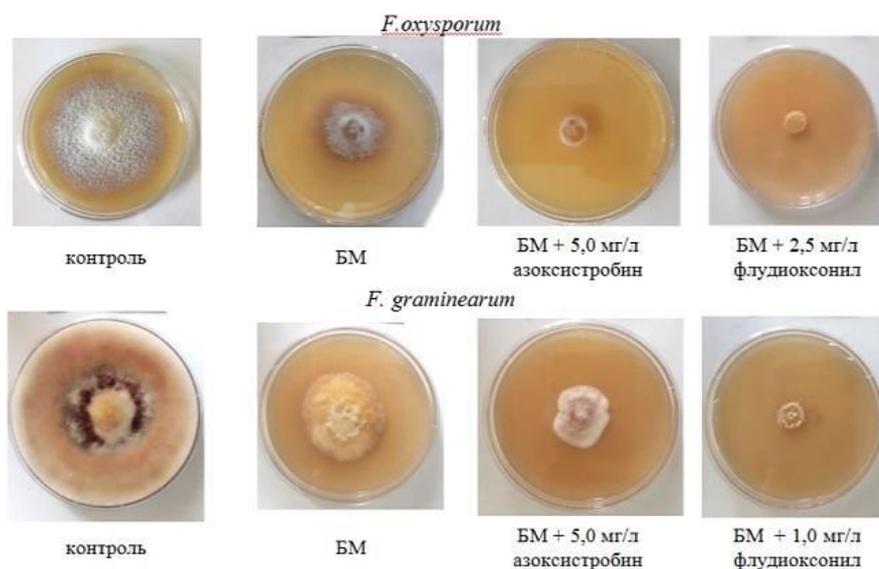


Рисунок 2 - Рост *F. oxysporum* и *F. graminearum* на среде КГА, содержащей 5,0 г/л БМ *P. chrysogenum* и тестируемый фунгицид на 7 сутки роста.

Заключение. В представленной работе в опытах *in vitro* продемонстрирована противогрибная активность БМ штамма *P. chrysogenum* F-4876D как при ее индивидуальном применении, так и в комбинации с фунгицидами – азоксистробинном и флудиоксонилом. Полученные данные демонстрируют возможность создания эффективного и экологически безопасного биопрепарата, который может быть использован в интегрированных системах защиты растений от фитопатогенов.

Библиографический список

1. Hahn M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study // J Chem Biol. - 2014. - V. 7. - Is. 4. - P.: 133–141.
2. Kim K., Lee Y., Ha A., Kim J.-I., Park A. R., Yu N. H., Son H., Choi G. J., Woong P. H., Lee C. W., Lee T., Lee Y.-W., Kim J.-C. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain JCK-12 // Front Plant Sci. – 2017. - V. 8. - P.: 2010.
3. Shcherbakova L.A. Fungicide resistance of plant pathogenic fungi and their chemosensitization as a tool to increase anti-disease effects of triazoles and strobilurines (review) // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 2019. - V. 54. - № 5. - P. 875-891.
4. Shcherbakova L., Rozhkova A., Osipov D., Zorov I., Mikityuk O., Statsyuk N., Sinitsyna O., Dzhavakhiya V., Sinitsyn A. Effective zearalenone degradation in model solutions and infected wheat grain using a novel heterologous lactonohydrolase secreted by recombinant *Penicillium canescens* // Toxins. – 2020. – V. 12. – P.: 475.