

## УСТОЙЧИВОСТЬ К ВЫСУШИВАНИЮ РАЗНОВОЗРАСТНОГО МИЦЕЛИЯ ШТАММОВ *STAGONOSPORA CIRSIII*

Н.А. Павлова, С.В. Сокоорнова

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Выбор штамма-продуцента – важный этап разработки технологии получения микогербицидов. Для разработки препаратов долгосрочного хранения оценивали микогербицидные свойства различных штаммов *Stagonospora cirsiii*, а именно влияние высушивания на жизнеспособность и патогенность мицелия. В работе использовали штаммы *Stagonospora cirsiii* С-163 и С-252, выделенные из некротических пятен на листьях бодяка полевого, и штаммы *S. cirsiii* О-15.35 и S-47, обнаруженные на осоте розовом. Штаммы при глубинном культивировании на оптимизированной по выходу глубинного вирулентного мицелия сахарозо-соевой питательной среде обладали различной скоростью роста, 10 г/сутки и 9 г/сутки для *S. cirsiii* С-163 и О-15.35, а также 5 г/сутки и 3 г/сутки для *S. cirsiii* С-252 и S-47, соответственно. Наименьшие потери жизнеспособности пропагул при высушивании наблюдались в начале стационарной стадии роста. Как в случае сырого, так и в случае высушенного мицелия наиболее патогенный инфекционный материал образовывался в середине экспоненциальной фазы роста штаммом *S. cirsiii* С-163 в отношении бодяка полевого и штаммом *S. cirsiii* С-О-15.35 в отношении осота розового. Данные штаммы могут служить основой для дальнейшей работы по разработке препаратов длительного хранения.

**Ключевые слова:** *Stagonospora cirsiii* штаммы С-163, С-252, О-15.35, S-47, микогербициды, бодяк полевой, осот розовый, жизнеспособность, патогенность, высушивание.

Поступила в редакцию: 30.10.2018

Принята к печати: 20.11.2018

Более 50 лет ведутся научные исследования, направленные на разработку способов биологической борьбы с сорными растениями на основе фитопатогенных грибов [Cordeau, 2016]. При оценке свойств потенциальных микогербицидов большое внимание уделяется повышению стабильности препаратов в полевых условиях и при хранении. Поэтому оценка устойчивости инфекционных единиц штаммов-продуцентов к различным стресс-факторам проводится уже на ранних стадиях разработки препарата [Bailey, 2014].

Показано, что мицелий *S. cirsiii* С-163 может служить основой микогербицида для борьбы с бодяком полевым

(*Cirsium arvense*) [Берестецкий и др., 2014]. Однако, как и в случае других микогербицидов, инфекционным началом которых служит мицелий, потери жизнеспособности мицелия *S. cirsiii* С-163 при высушивании велики [Павлова и др., 2018; Qiang et al., 2006]. Целью данной работы была оценка микогербицидных свойств, а именно выживаемости и патогенности мицелия разновозрастных штаммов С-163, С-252, О-15.35 и S-47 *S. cirsiii* при высушивании. Выбор штаммов обуславливался приуроченностью к различным растениям-хозяевам. Штамм *S. cirsiii* С-163 был выбран, как модельный, так как его микогербицидные свойства были изучены ранее (Берестецкий и др., 2014).

### Материалы и методы

В работе использованы штаммы С-163, С-252, О-15.35 и S-47 *S. cirsiii* из рабочей коллекции лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР. Штаммы С-163 и С-252 были выделены в чистую культуру из некротических пятен на листьях бодяка полевого, штаммы О-15.35 и S-47 получены из некротических пятен на листьях осота розового. Штаммы хранили при 5 °С в пробирках на скошенном картофельно-глюкозном агаре (КГА). Для получения посевного материала штаммы культивировали 2 недели на КГА при 24 °С в темноте. Мицелий выращивали в 250 мл колбах Эрленмейра, содержащих 50 мл сахарозо-соевой питательной среды (СС) следующего состава: сахароза – 30 г/л, соевая мука – 14.0 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1.0 г/л,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5 г/л. Посев производили 2-мя блоками посевной культуры диаметром 5 мм. Культивирование осуществляли в термостатируемой орбитальной качалке Innova 42 (Edison, NJ, USA) при 180 об/мин и температуре 24 °С. Высушивание биомассы в тонком слое осуществляли в термостате с циркуляцией воздуха (ТСО-200 СПУ, Россия) при температуре 33 °С в течение 5 ч.

Перед оценкой патогенности 200 мг высушенного мицелия помещали в 50 мл стерильной воды и ставили на 1 час на орби-

тальную качалку ELMi Shaker S.3.01 (Latvia) при 180 об/мин и температуре 24±2 °С, далее измельчали на бытовом блендере в течение 40 с (размер фрагментов мицелия около 180 мкм). Затем методом последовательных разведений получали суспензию в концентрациях 12.5, 25 и 50 мг/мл. Листовые высечки бодяка и осота размером 0.8 см в диаметре инокулировали водной суспензией (1 капля объемом 5 мкл) мицелия в различных концентрациях. Инкубировали во влажной камере (герметичном прозрачном пластиковом контейнере с увлажненной фильтровальной бумагой) при температуре 24 °С и периодическом 12-ч освещении. Через 48 ч после заражения проводили учет площади некрозов, образующихся на высечках из листовых дисков по отношению к общей площади [Сокоорнова, Берестецкий 2018]. Выход биомассы и количество жизнеспособных единиц (КОЕ/г) оценивали общепринятыми микологическими методами [Методы..., 1982]. Опыты проводили дважды не менее чем в 4-х повторностях.

Для оценки полученных результатов использовали метод множественного сравнения при уровне значимости 5% [Доспехов, 1985]. Статистические расчеты выполняли с помощью программного обеспечения MS Excel 2007.

### Результаты и обсуждение

Анализ динамики роста штаммов при глубинном культивировании на оптимизированной по выходу глубинного вирулентного мицелия сахарозо-соевой питательной среде, выявил два быстрорастущих С-163 и О-15.35 и два

медленнорастущих штамма S-47 и С-252. Скорость роста в экспоненциальной фазе составляла для С-163 и О-15.35 10 г/сутки и 9 г/сутки, а для S-47 и С-252 – 5 г/сутки и 3 г/сутки, соответственно. Для всех рассматриваемых

штаммов начало стационарной фазы наступало на 6 сутки (рис. 1). Максимальный выход сухого мицелия составлял у штамма *S. cirsi* C-163 – 20 г/л, а у штамма O-15.35 – 18 г/л. Таким образом, выход мицелия штамма O-15.35 на сахарозо-соевой питательной среде соизмерим с выходом мицелия модельного штамма *S. cirsi* C-163, потенциального микогербицида бодяка полевого.

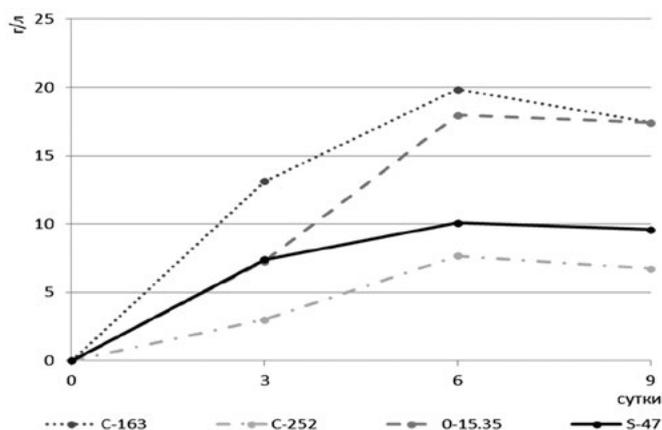


Рисунок 1. Динамика роста штаммов C-163, C-252, O-15.35, S-47 *S. cirsi* при глубинном культивировании на сахарозо-соевой питательной среде, НСР<sub>0.05</sub>=0.2

Для всех анализируемых штаммов высушивание различным образом влияло на микогербицидные свойства мицелия *S. cirsi* разного возраста. Тем не менее, количество жизнеспособных единиц на грамм материала после сушки для всех штаммов существенно уменьшалось. Анализ КОЕ высушенного мицелия достоверно показывает, что наилучшими микогербицидными свойствами обладает мицелий *S. cirsi*, находящийся в начале стационарной фазы роста (рис.2). Устойчивость к температурному воздействию такого мицелия для всех штаммов была в 1.2–2 раза выше, чем для мицелия в экспоненциальной фазе роста. Учитывая, что выход и жизнеспособность мицелия в начале стационарной фазы роста выше, чем в середине экспоненциальной и поздней стационарной фазах роста, применение мицелия штаммов *S. cirsi* в начале стационарной фазы роста считаем технологически обоснованным.

Патогенность высушенного мицелия также у всех исследованных штаммов была различной и зависела от возраста культуры (рис. 3). Наиболее патогенными были быстрорастущие на оптимизированной сахарозо-соевой среде штаммы: *S. cirsi* C-163 в отношении бодяка полевого и *S. cirsi* O-15.35 в отношении осота розового.

Сравнение инфекционной нагрузки, необходимой для 50% поражения листьев на 2-е сутки развития заболевания растения-хозяина, показало, что высушенный мицелий штаммов *S. cirsi* C-163 и *S. cirsi* O-15.35, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста, был достоверно более патогенный, чем высушенный мицелий других возрастов. Инфекционная нагрузка в этом случае составляла  $2.2 \pm 0.2 \cdot 10^4$  и  $1.8 \pm 0.2 \cdot 10^4$  КОЕ/г, соответственно (рис. 3). Ранее подобная тенденция была показана для сырого мицелия *S. cirsi* C-163, полученного в аналогичных условиях культивирования [Сокорнова, Берестецкий, 2018].

Сравнительный анализ биохимического состава мицелия разного возраста, на примере штаммов *S. cirsi*, на наш взгляд, сможет выявить новые факторы патогенеза этого узко специализированного патогена.

Проведенные исследования важны для решения проблемы устойчивости к высушиванию мицелия *S. cirsi*.

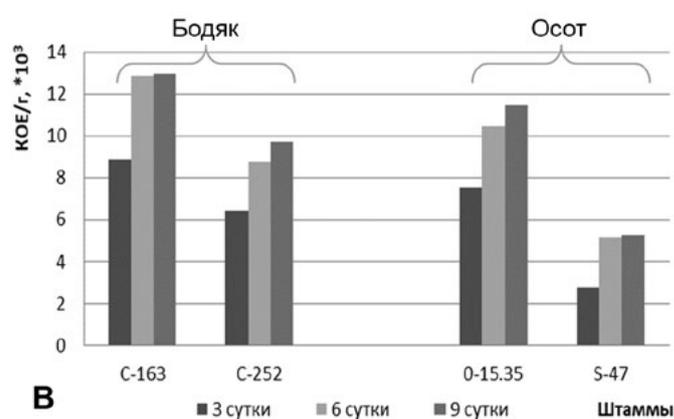
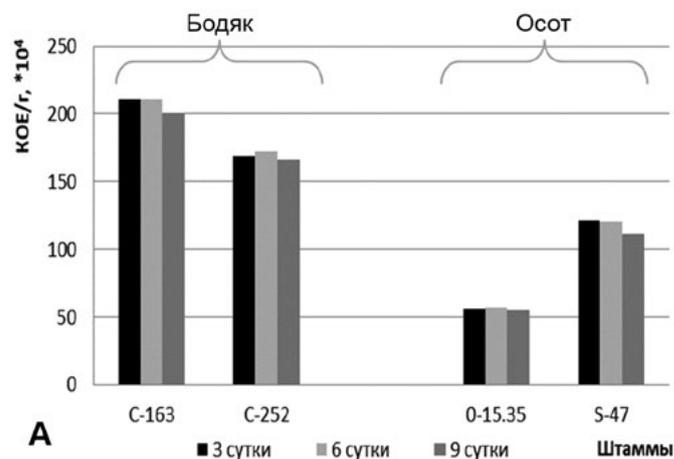


Рисунок 2. Количество жизнеспособных единиц до и после высушивания разновозрастного мицелия штаммов *S. cirsi*. А – сырой мицелий: влажность  $86.0 \pm 0.8\%$ , НСР<sub>0.05</sub>= $2.0 \cdot 10^4$ ; В – сухой мицелий НСР<sub>0.05</sub>= $2.3 \cdot 10^3$

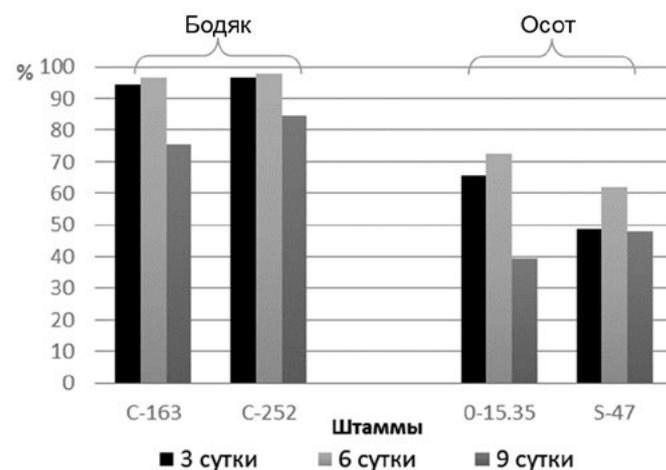


Рисунок 3. Патогенные свойства мицелия штаммов *S. cirsi* разного возраста. НСР<sub>0.05</sub>=12.0.

## Библиографический список (References)

- Берестецкий А.О. Штамм гриба *Stagonospora cirsii* Davis 1.41, обладающий гербицидной активностью против бодяка полевого / Берестецкий А.О., Кашина С.А., Сокорнова С.В. // 2014. Патент РФ № 2515899.
- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Справочник / В.И. Билай // Киев: Наукова Думка, 1982. 550 с.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований [Текст] / Б.А. Доспехов // М.: Колос, 1979. 416 с.
- Павлова Н.А., Сокорнова С.В., Берестецкий А.О. Влияние возраста мицелия фитопатогенного гриба *Stagonospora cirsii* C-163 на сохранность его микогербицидных свойств при высушивании / Н.А. Павлова, С.В. Сокорнова, А.О. Берестецкий // Вестник защиты растений. 2017, N4. С. 51–53.
- Сокорнова С.В., Берестецкий А.О. Получение вирулентного глубинного мицелия *Stagonospora cirsii* C-163- потенциального микогербицида для борьбы с бодяком полевым *Cirsium arvense* (L.) Scop. / С.В. Сокорнова, А.О. Берестецкий // Сельскохозяйственная биология. 2018. Том 53. N5. С. 1054–1061.
- Cordeau S. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management / S. Cordeau // Crop protection. 2016. Vol. 87. P. 44–49.
- Bailey K.L. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens / K.L. Bailey // In: Integrated pest management: current concepts and ecological perspective / D.P. Abrol (ed.). San Diego, Academic Press. 2014. P. 245.
- Qiang S. Mycelium of *Alternaria alternata* as a potential biological control agent for *Eupatorium adenophorum* / S. Qiang, Y. Zhu, B. A. Summerell, Y. Li // Biocontrol Science and Technology. Vol. 16, N 7. 2006. P. 653–668.

## Translation of Russian References

- Berestetskiy A.O., Kashina S.A., Sokornova S.V. Strain of fungus *Stagonospora cirsii* Davis 1.42 having herbicidal activity against *Canada thistle*. RU Patent N 2515899. (In Russian).
- Bilay V.I. Methods of experimental mycology. Handbook. Kiev. Naukova Dumka. 1982. 550 p. (In Russian).
- Dospikhov B.A. Method of field experiment with bases of statistical processing of results of researches. // Moscow: Kolos, 1979. 416 p. (In Russian).
- Pavlova N.A., Sokornova S.V., Berestetskiy A.O. Influence of age of mycelium of the phytopathogenic fungus *Stagonospora cirsii*-163 to the safety of his mycoherbicide properties when dried. // Vestnik zashchity rastenij. 2017, N 4. P. 51–53. (In Russian).
- Sokornova S.V., Berestetskiy A.O. Getting virulent submerged mycelium *Stagonospora cirsii*-163 – potential mycoherbicide to combat field Thistle *Cirsium arvense* (L.) Scop. // Selskohozyajstvennaya biologiya. 2018, V 53. N 5. P. 1054–1061. (In Russian).

Plant Protection News, 2018, 4(98), p. 67–69

EFFECT OF DRYING ON VIABILITY OF DIFFERENT AGES MYCELIUM OF *STAGONOSPORA CIRCII*

N.A. Pavlova, S.V. Sokornova

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

The choice of a producer strain is an important stage in the development of mycoherbicides technology. Developing storage formulations, the mycoherbicidal properties of various strains of *Stagonospora cirsii* were evaluated. The strains C-163 and C-252, isolated from necrotic spots of *Cirsium arvense*, and strains O-15.35 and S-47, found on *Sonchus arvensis* was used. The strains had a different growth rate of 10 g/day and 9 g/day for strains C-163 and O-15.35, as well as 5 g/day and 3 g/day for strains C-252 and S-47. The smallest loss of viability of propagules during drying is observed at the early stationary growth phase. The most pathogenic mycelium is *S. cirsii* C-163 and *S. cirsii* O-15.35. The most pathogenic dried mycelium of *S. cirsii* C-163 and *S. cirsii* O-15.35 is formed in the middle of the exponential phase. These strains can serve as the basis for further work on the development of long-term storage formulations.

**Keywords:** *Stagonospora cirsii*, mycoherbicides, *Sonchus arvensis*, *Cirsium arvense*, viability, pathogenicity, drying.

Received: 30.10.2018

Accepted: 20.11.2018

## Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация  
Павлова Наталья Александровна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: nat5356@yandex.ru  
\*Сокорнова Софья Валерьевна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: svokornova@vizr.spb.ru

## Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo Shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation  
Pavlova Natalya Aleksandrovna. Researcher, PhD in Biology, e-mail: nat5356@yandex.ru  
\*Sokornova Sonie V. Leading researcher, PhD in Biology, e-mail: svokornova@vizr.spb.ru

\* Ответственный за переписку

\* Corresponding author