

УДК 632.4:632.51

## ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА МИЦЕЛИЯ ФИТОПАТОГЕНОГО ГРИБА *STAGONOSPORA CIRSI* C-163 НА СОХРАННОСТЬ ЕГО МИКОГЕРБИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ПРИ ВЫСУШИВАНИИ

Н.А. Павлова, С.В. Сокорнова, А.О. Берестецкий

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

Фрагменты мицелия *Stagonospora cirsii* C-163 при невысокой инфекционной нагрузке могут вызывать заболевание пятнистости листьев многолетнего корнеотпрыскового сорного растения бодяк полевой. Ранее было показано, что максимальная агрессивность инфекционного материала достигается в экспоненциальной фазе роста при глубинной ферментации на сахарозо-соевой среде. В то же время жизнеспособность и агрессивность полученного таким образом вегетативного мицелия катастрофически падает при высушивании. Целью работы стала оценка влияния возраста мицелия фитопатогенного гриба *S. cirsii* C-163 на сохранность его микогербицидных свойств при высушивании. Сравнение жизнеспособности и вирулентности мицелия *S. cirsii* C-163, находящегося в различных фазах роста, после высушивания показало, что наименьшее воздействие на микогербицидные свойства отмечается у мицелия в начале стационарной фазы роста. Мы полагаем, что он может быть использован как основа при разработке препаративной формы в виде смачивающегося порошка. Такая форма обычно применяется при разработке биогербицидов, которые могут храниться.

**Ключевые слова:** *Stagonospora cirsii*, бодяк полевой, микогербицидные свойства, инфекционный материал, мицелий, стационарная фаза роста, высушивание, жизнеспособность, агрессивность.

Несмотря на большое количество известных потенциальных микогербицидов, на настоящий момент в мире зарегистрировано не более 20 препаратов, большинство из которых появились на рынке в последние 5 лет [Cordeau et al., 2016; Берестецкий, 2017]. Это связано прежде всего с тем, что эффективность микогербицидов находится в сильной зависимости от климатических условий, в том числе от относительной влажности воздуха и температуры [TeBeest, Templeton, 1985; Greaves et al., 1989; Сокорнова, 2014]. Кроме того, препараты на основе патогенных грибов сложно стабилизировать и зачастую они не подлежат долгому хранению [Берестецкий, Сокорнова, 2009]. Исторически микогербициды выпускаются двух типов: для непосредственного применения, сразу или через короткое время после получения (суспензии, пасты), и предназначенные для применения через какое-то время (смачивающиеся порошки, гранулы). При разработке микогербицидов, подлежащих хранению, в качестве инфекционного начала преимущественно используются конидии, так как они более устойчивы к высушиванию, чем вегетативный мицелий [Гасич, Берестецкий, 2007; Берестецкий, Сокорнова, 2009]. В то же время для фомидных микромицетов в ряде случаев заражение мицелием происходит быстрее и менее зависимо от температурно-влажностных условий в первые часы после заражения [Сокорнова и др., 2011]. Преимущества использования

мицелия в качестве инфекционного материала ранее были показаны в таких патосистемах как *Alternaria cassiae* Jurair & Khan / *Cassia obtusifolia* L. [Stowell et al., 1989], *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler / *Eupatorium adenophorum* Spreng. [Qiang et al., 2006], *Chondrostereum purpureum* (Pers. ex Fr.) Pouzar / *Prunus serotina* Erhr. [Scheepens & Hoogerbrugge 1989], *Phoma herbarum* Westend / *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers [Steward-Wade, Boland 2000], *Sphaceloma poinsettiae* Jenkins & Ruehle / *Euphorbia heterophylla* L. [de Lima Nechet et al., 2004]. Более того, фитопатоген *Stagonospora cirsii* C-163 (потенциальный микогербицид бодяка полевого) способен образовывать конидии только при периодическом освещении в ближнем УФ (350 нм) [Berestetskiy et al., 2005], что усложняет технологию получения инфекционного материала. По этим причинам для разработки препарата против бодяка полевого в качестве инфекционной основы был предложен мицелий гриба *S. cirsii* C-163 [Берестецкий и др., 2014]. Хорошо известно, что в процессе роста и старения изменяются биохимические характеристики вегетативного мицелия, поэтому мы предположили, что сохранность микогербицидных свойств мицелия при высушивании также будет зависеть от возраста инфекционного материала. Целью работы стала оценка влияния возраста мицелия фитопатогенного гриба *S. cirsii* C-163 на сохранность его микогербицидных свойств при высушивании.

### Материалы и методы

В работе использован штамм *S. cirsii* C-163 из рабочей коллекции лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР. Гриб хранили при 5 °С в пробирках на скошенном картофельно-глюкозном агаре (КГА). Для получения посевного материала гриб 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 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г/л,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5 г/л. Посев производили 2-мя блоками двухнедельной посевной культуры диаметром 5 мм. Культивирование

осуществляли на орбитальной качалке при 180 об/мин и температуре 24±2 °С. Агрессивность определяли на листовых высечках [Berestetskiy et al., 2007], выход биомассы и количество жизнеспособных единиц (КОЕ/г) оценивали общепринятыми микологическими методами [Методы..., 1982]. Высушивание биомассы в тонком слое осуществляли в термостате с циркуляцией воздуха (ТСО-200 СПУ) при температуре 33 °С в течение 5 ч.

Обработку данных проводили классическими статистическими методами [Доспехов, 1979].

### Результаты и обсуждение

При культивировании *S. cirsi* C-163 на среде СС в колбах на орбитальной качалке середина экспоненциальной фазы роста мицелия наступает на 3-и сутки, начало стационарной фазы роста приходится на 6-е, а поздняя стационарная фаза на 9-е сутки роста. Выход сырого мицелия в стационарной фазе роста составляет 131 г/л (табл. 1), что сопоставимо с выходом мицелия в условиях жидкофазной глубинной ферментации, используемого в качестве инфекционной основы различных потенциальных микогербицидов [Stowell et al. 1989; Qiang et al., 2006; Scheepens, Hoogerbrugge, 1989; Steward-Wade, Boland 2000; de Lima Nechet et al., 2004]. В тоже время сравнение значений КОЕ сырого мицелия показывает, что наиболее жизнеспособным является мицелий в экспоненциальной фазе роста (табл.1). Наиболее агрессивным в отношении бодяка полевого также является сырой мицелий в экспоненциальной фазе роста (табл. 1), что согласуется с ранее полученными данными [Berestetskiy et al., 2005; Сокорнова и др., 2011]. Таким образом, в качестве инфекционной основы для препарата не подлежащего хранению целесообразно использовать молодой мицелий *S. cirsi* C-163.

Высушивание различным образом влияет на микогербицидные свойства мицелия *S. cirsi* C-163 разного возраста. Сравнение КОЕ и патогенности суспензии на основе сухого мицелия достоверно показывает, что наилучшими микогербицидными свойствами обладает 6-суточный мицелий *S. cirsi* C-163 (табл.), а не 3-суточный, как в случае с сырым мицелием. Анализ количества жизнеспособных

единиц на грамм материала после сушки показал, что потери жизнеспособности мицелия в целом высоки. В тоже время зрелый мицелий, находящийся в начале стационарной фазы, в 2 раза более устойчив к температурному воздействию, чем молодой. С учетом того, что выход мицелия в начале стационарной фазы роста в 2 раза выше, чем в середине экспоненциальной фазы роста, использование такого мицелия для высушивания представляется технологически обоснованным. К недостаткам можно отнести более длительное время культивирования и более низкую агрессивность инфекционного материала по сравнению с мицелием в фазе активного роста (табл.).

Таким образом, при разработке различных по срокам хранения типов препаратов на основе мицелия *S. cirsi* C-163 целесообразно в качестве инфекционной основы использовать мицелий разного возраста. В случае препаратов, непосредственно применяемых после получения, это может быть молодой мицелий, находящийся в экспоненциальной фазе роста. Для препаратов, которые предполагается стабилизировать и хранить, необходимо использовать более зрелый мицелий, находящийся в стационарной фазе роста. В дальнейшем, на наш взгляд, необходимо выявить биохимические показатели (например, концентрация олигосахаров, полиолов, липидов в мицелии), коррелирующие с жизнеспособностью мицелия, что упростит процесс оптимизации условий культивирования и сушки.

Таблица. Характеристика вегетативного мицелия *S. cirsi* C-163

Сутки	Фаза роста мицелия	Характеристика сырого мицелия				Характеристика сухого мицелия	
		Выход, г/л	КОЕ/г, *10 <sup>4</sup>	Относительная влажность, %	Агрессивность (50 мг/мл), % <sup>1</sup>	КОЕ/г, *10 <sup>3</sup>	Агрессивность (7.5 мг/мл <sup>2</sup> ), % <sup>2</sup>
3	Середина экспоненциальной фазы	70.9	211.0	85.8	100	27.6	18
6	Начало стационарной фазы	130.9	201.9	86.0	82	52.2	26
9	Конец стационарной фазы	114.8	200.0	89.0	68	18.4	12
НСР <sub>0.05</sub>		15.8	5.9	1.9	12	1.2	12

<sup>1</sup>Площадь некроза относительно общей площади листового диска

<sup>2</sup>Инфекционная нагрузка увеличена с учетом потерь жизнеспособности при высушивании

Работа выполнена при поддержке гранта РФ №16-16-00085 «Разработка технологий получения и применения микогербицидов для борьбы с трудноискоренимыми сорными растениями».

### Библиографический список (References)

- Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. Получение и хранение биопестицидов на основе микромицетов / А.О. Берестецкий, С.В. Сокорнова // Микология и фитопатология. 2009. Том 43. Вып. 6. С. 473–489.
- Берестецкий А.О. Штамм гриба *Stagonospora cirsi* Davis 1.41, обладающий гербицидной активностью против бодяка полевого / Берестецкий А.О., Кашина С.А., Сокорнова С.В. // 2014. Патент РФ № 2515899.
- Берестецкий А.О. Перспективы разработки биологических и биорациональных биогербицидов / А.О. Берестецкий // Вестник защиты растений. 2017, N 1. С. 5–12.
- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Справочник / В.И. Билай // Киев: Наукова Думка, 1982. 550 с.
- Гасич, Е.Л., Берестецкий, А.О. Влияние длительного хранения на стабильность штаммов микромицетов, перспективных для биологической борьбы с *Cirsium arvense* / Е.Л. Гасич, А.О. Берестецкий // Микология и фитопатология. 2007. Том 41. Вып. 4. С. 342–347.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований [Текст] / Б.А. Доспехов // М.: Колос, 1979. 416 с.
- Сокорнова С.В. Процесс инфицирования бодяка полевого конидиями и мицелием фитопатогенного гриба *Stagonospora cirsi* / С.В. Сокорнова, А.В. Хиотти, А.О. Берестецкий // Вестник защиты растений. 2011, N 3. С. 57–60.
- Berestetskiy A.O. Can mycelial inoculum be an alternative to conidia in the case of *Stagonospora cirsi* J.J. Davis, a potential biocontrol agent of *Cirsium arvense*? / A.O. Berestetskiy, O.V. Kungurtseva, S.V. Sokornova // Current status and future prospects in bioherbicide research and product development: Joint Workshop International Bioherbicide Group and EWRS-Biocontrol Working Group; Bari, Italy, 19 June 2005. URL: [http://ibg.ba.cnr.it/Newsletter/VII\\_IBG\\_EWRS\\_Workshop\\_Bari2005.pdf](http://ibg.ba.cnr.it/Newsletter/VII_IBG_EWRS_Workshop_Bari2005.pdf). P. 7.
- Berestetskiy A.O. A laboratory technique for the evaluation of pathogenicity of *Septoria cirsi* for *Cirsium arvense* / A.O. Berestetskiy, A.F. Fyodorova, S. Kustova // XV Congress of European mycologists. SpB, Russia, September 16–21, 2007. Abstracts. – SPb.: TREEART LLC, 2007. P. 242.
- Cordeau, S. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management / S. Cordeau, M. Triolet, S. Wayman, C. Steinberg, J.P. Guillemain // Crop protection. 2016. Vol. 87. P. 44–49.
- De Lima Nechet K. *Sphaceloma poinsettiae* as a potential biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) / K. De Lima Nechet,

- R.W. Barreto, E.S.G. Mizubuti // *Biological Control*. 2004. Vol. 30. P. 556–565.
- Greaves M.P. Mycoherbicides: Opportunities for genetic manipulation / M.P. Greaves, J.A. Bailey, J.A. Hargreaves // *Pesticide science*. 1989. Vol. 26, N1. P. 93–101.
- 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.
- Scheepens PC, Hoogerbrugge A. 1989. Control of *Prunus serotina* in forests with the endemic fungus *Chondrostereum purpureum*. In: Delfosse ES, editor. *Proceedings of VII International Symposium on Biological Control of Weeds*. 1988. Rome, Italy. Istituto Sperimentale la Patologia Vegetale, Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Rome, pp. 545–551.
- Stewart-Wade S.M. Selected cultural and environmental parameters influence disease severity of dandelion caused by the potential bioherbicide fungi, *Phoma herbarum* and *Phoma exigua* / S.M. Stewart-Wade, G.J. Boland. *Biocontrol Science and Technology* 2004. Vol. 14. P. 561–569.
- Stowell LJ, Nette K, Heath B, Shutter R. 1989. Fermentation alternatives for commercial production of a mycoherbicide. In: Demain AL, Somkuti GA, Hunter-Cevera JC, Rossmore HW, editors. *Novel microbial products for medicine and agriculture*. Society for Industrial Microbiology. pp. 219–227.
- TeBeest, D.O. Mycoherbicides: Progress in the biological control of weeds / D.O. TeBeest, G.E. Templeton. *Plant disease*. 1985. Vol. 69, N 1. P. 6–10.

#### Translation of Russian References

- Berestetskiy A.O., Sokornova S.V. Production and stabilization of mycopesticides. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2009. V. 43. N 6. P. 473–489. (In Russian).
- 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).
- Berestetskiy A.O. Prospects for the development of biological and biorational bioherbicides. *Vestnik zashchity rastenii*. N 1. 2017. P. 5–12. (In Russian).
- Bilay V.I. Methods of experimental mycology. *Spravochnik*. Kiev. Naukova Dumka. 1982. 550 p. (In Russian).
- Dospikhov B.A. Method of field experiment with bases of statistical processing of results of researches. B.A. Dospikhov // Moskva.: Kolos, 1979. 416 s. (In Russian).
- Gasich, EL, Berestetskiy, A.O. The effect of long-term storage on the stability of strains of micromycetes, promising for biological control of *Cirsium arvense*. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2007. V. 41. N 4. P. 342–347. (In Russian).
- Sokornova S.V., Hutty A.V., Berestetskiy A.O. The process of infection of the tubercle field with conidia and mycelium of the phytopathogenic fungus *Stagonospora cirsii*. *Vestnik zashchity rastenij*. 2011, N 3. S. 57–60. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 4(94), p. 51–53

## THE INFLUENCE OF *STAGONOSPORA CIRSI* C163 MYCELIUM AGE ON THE FUNGUS MYCOHERBICIDAL PROPERTY AT DRYING

N.A. Pavlova, S.V. Sokornova, A.O. Berestetskiy

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

The pathogen *Stagonospora cirsii* C-163 can cause the leaf spot disease of the perennial weed *Cirsium arvense*. It is shown that the maximum aggressiveness of infectious material is achieved in the exponential phase of cultivation on the cultural medium containing 30 g/l sucrose, 14 g/l soybean meal and mineral salts (1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ). At the same time, the viability of the thus obtained vegetative mycelium catastrophically decreases at drying. The aim of the present study was to evaluate the effects of mycelium physiological age of *S. cirsii* strain 163 on its resistance to drying. It was shown that the mycelium is more resistant to dehydration in the stationary phase than in the exponential one. Moreover, the maximum yield of the *S. cirsii* C163 mycelium was produced, when it entered the stationary phase. It is supposed that the early stationary phase of *S. cirsii* C163 cultures can be used as a basis for a long-life bioherbicide against *Cirsium arvense*.

**Keywords:** *Stagonospora cirsii* C-163, mycelium, dehumidification, physiological state, early stationary phase.

#### 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. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: svokornova@vizr.spb.ru

\*Берестецкий Александр Олегович. Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, e-mail: aberestetskiy@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. Senior researcher, PhD in Biology, e-mail: svokornova@vizr.spb.ru

Berestetskiy Alexandr Olegovich. Head of Laboratory, PhD in Biology, e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

\* Ответственный за переписку

\* Responsible for correspondence