Сільськогосподарська мікробіологія. — 2016. — Вип. 24. — С. 18–23.
ISSN 1997-3004

УДК 631.466:579.22

# ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ГРИБА-АНТАГОНІСТА *CHAETOMIUM COCHLIODES*, БІОАГЕНТА МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ ХЕТОМІКА

**А. С. Йовенко**

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: a.s.yovenko@gmail.com

*Досліджено целюлозолітичну активність гриба-антагоніста Chaetomium cochliodes 3250. Показано, що C. cochliodes 3250 синтезує комплекс целюлаз — ферментів деградації клітинної стінки. Найвищі показники ендо-, екзоглюкозидазної та β-глюкозидазної активності гриб проявляє на 9-у добу культивування. Висока целюлазна активність обумовлює здатність гриба проникати в рослинні тканини. C. cochliodes 3250, інтродукований в кореневу зону рослин гречки посівної, утворює плодові тіла на поверхні кореневих волосків та проникає в клітини ризодерми.*

Ключові слова: *C. cochliodes 3250, целюлаза, ендоглюканаза, екзоглюканаза, β-глюкозидаза, рослинно-мікробна асоціація, мікориза.*

Формування тісних симбіотичних зв'язків між мікроорганізмами та рослинами є складним екологічним процесом [1]. Гриби-мікоризоутворювачі займають особливе місце серед великої кількості ризосферних організмів. За деякими оцінками, близько 250 тис. видів рослин, у т. ч. й культурних, здатні до утворення мікоризи. Характерними особливостями таких рослинно-мікробних взаємодій є формування специфічних структур, або ж проникнення гриба в тканини рослин, або і те й інше одночасно. Наявність мікоризи є нормальним станом для більшості рослин за будь-яких умов та являє собою взаємовигідне та взаємозалежне партнерство, утворене між коренями рослин і грибами [2]. Механізм утворення мікоризних симбіозів та функціональна інтеграція симбіонтів продовжує звертати увагу багатьох дослідників.

Відомо, що деякі мікроміцети здатні проникати до рослин шляхом гідролізу клітинної стінки. В інфекційних гіфах на ранніх стадіях симбіозу синтезуються ферменти деградації клітинної стінки (пектиназа, ендополігалактуроназа, целюлаза), що є необхідним для проникнення гриба в корінь [1]. При проникненні арбускулярно-везикулярних грибів у клітинну стінку рослин, безпосередньої участі таких ферментів, як целюлаза і ксилоглюканаза не відмічено, проте відомо, що активність цих гідролітичних ферментів зростає в мікоризованих коренях [3; 4]. Види роду *Rhizoctonia*, схожі з симбіонтами орхідних, утворюють целюлази і пектинази, що може супроводжувати колонізацію рослинних тканин [5]. Існують літературні дані щодо здатності розкладати пектин, целюлозу, целобіозу та геміцелюлозу (основні структурні компоненти рослинної клітинної стінки) і окисляти фенольні сполуки, грибом *Rhizoscyphusericae,* мікросимбіонтом ерікоїдної мікоризи [6]. Відомо, що більшість симбіонтів ектомікоризи мають обмежену здатність до використання лігніну і целюлози як субстрату для росту, значно слабшу ніж у дереворуйнівних грибів [7]. Проте здатність до розкладу целюлози та пектину може бути пов'язана з проникненням гриба в тканини кореня, де утворення ферментів локалізовано і обумовлює пом'якшення клітинної стінки при формуванні сітки Гартіга [8]. Низка видів ектомікоризних грибів для утворення плодових тіл потребує асоціації з кореневою системою рослин [2].

В останні роки показано, що сапротрофні ґрунтові гриби також здатні проникати в корені та викликати позитивні зміни в рос-



© А. С. Йовенко, 2016

линах. Гриби родів *Trichoderma*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Penicillium* здатні інфікувати рослини та утворювати ендофітні асоціації з коренями [9–11].

Відомі роботи, що вказують на здатність представників роду *Chaetomium* проявляти ендофітію щодо певних рослин. *C. globosum* проникає в тканини тропічних злакових і бобових трав [12; 13]. Раніше було показано, що *C. cochliodes* 3250 утворює ендофітні асоціації з рослинами пшениці ярої та сої [14; 15].

Метою нашої роботи було дослідити активність целюлозолітичного комплексу гриба-антагоніста *C. cochliodes* 3250 і його здатність проникати у тканини кореня гречки посівної.

***Матеріали та методи.*** Як об'єкт дослідження використовували природний штам сумчастого гриба *C. cochliodes* Palliser 3250, депонований у Всесоюзному науково-дослідному інституті сільськогосподарської мікробіології (нині — Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології Російської академії наук).

Попередню перевірку здатності *C. cochliodes* 3250 до синтезу целюлаз проводили якісним (чашковим) методом. Досліджуваний гриб вирощували в чашках Петрі впродовж 10 діб на середовищі Чапека, що містило натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ, 0,5 %) [16] та целобіозу (0,2 %) [17] як джерела карбону і субстрату для ферментів. Як індикатор целюлазного комплексу використовували конго червоний (0,5 %, вводили в агаризоване середовище). Целюлазну активність оцінювали за величиною відношення діаметра зон просвітлення ($d_{зони}$) і діаметра колонії ($d_{колонії}$).

На другому етапі визначали загальну целюлозолітичну активність *C. cochliodes* 3250 за активністю компонентів целюлазного комплексу. Для цього гриб поверхнево культивували впродовж 28 та 12 діб, відповідно, на модифікованому синтетичному середовищі Чапека (г/л: $(NH_4)_2HPO_4$ — 2,5; $K_2HPO_4$ — 1,0; $MgSO_4$ — 0,5; KCl — 0,5; $FeSO_4$ — 0,01). Як єдине джерело Карбону використовували смужку фільтрувального паперу (50 мг). Значення pH — 7,0.

Висів проводили суспензією спор (Т = $= 1 \cdot 10^6$ КУО), у кількості 5 % від об'єму живильного середовища. Посівний матеріал *C. cochliodes* 3250 отримували шляхом змиву конідій і фрагментів гіфів гриба зі скошеного сусло-агару. Титр визначали в камері Горяєва. Культивували поверхнево в пробірках з 5 мл поживного середовища за температури 26 °С.

Вимірювання загальної целюлозолітичної активності проводили на 7, 14, 21, 28-у добу культивування. При подальшому визначенні активності компонентів целюлозолітичного комплексу обліки здійснювали на 3, 6, 9 та 12-у добу культивування. Як контроль використовували живильне середовище Чапека без інокулюма гриба. По закінченню культивування біомасу відділяли фільтруванням через фарфорове сито, фільтрат культуральної рідини використовували для проведення аналізів.

Дослідження проводили в 3-разових біологічних та 3-разових аналітичних повтореннях.

За одиницю загальної целюлазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 60 хв. утворює 1 мг редукуючих цукрів. До ферментів целюлазного комплексу належать екзоглюканази (за одиницю екзоглюканазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 60 хв. утворює 1 мг редукуючих цукрів), ендоглюканаза та *β*-глюкозидаза (за одиницю ендоглюканазної та *β*-глюкозидазної активності приймали таку кількість ферментів, які за 30 хв. дії утворювали 1 мг редукуючих цукрів). Як субстрат використовували 50 мг авіцелу (мікрокристалічна целюлоза), 1 мл 0,5 %-го розчину Na-КМЦ та 1 мл 0,025 %-го розчину целобіози в 0,05 М натрій-цитратному буфері відповідно. Кількість редукуючих цукрів визначали методом Шомоді-Нельсона [18], при цьому досліджувану суміш інкубували при температурі 40 °С. Калібрувальну криву будували за стандартними розчинами глюкози.

Здатність *C. cochliodes* 3250 утворювати асоціації з рослинами гречки посівної сорту Антарія перевіряли у вегетаційному досліді. Рослини вирощували на стерильному субстраті (вермикуліт) упродовж 30 діб. Використовували пластикові посудини розміром 10,5×15,5 см, ємністю 2,0 л. Насіння гречки сорту Антарія висівали на глибину 2,0 см, у кожній посудині вирощували 25 рослин з подальшим проріджанням до 20. Проводили

передпосівну обробку насіння біопрепаратом Хетомік, 1 грам якого містив $1{,}8 \cdot 10^9$ сумкоспор *C. cochliodes* 3250, з розрахунку 40 тис. КУО на 1 насінину. Повторність досліду триразова.

Фарбування зрізів коренів рослин проводили за методом Кобеля [18]. Тимчасові мікропрепарати досліджували під мікроскопом МС 200(Т) («Micros», Австрія), фотографували з використанням цифрової кольорової камери DSC-S650 Sony.

Розрахунки та статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами. Використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховуючи середнє арифметичне і середнє квадратичне відхилення за рівня значущості менше 0,05. Аналіз проводили з використанням прикладних програм Microsoft Excel.

***Результати та їх обговорення.*** На першому етапі дослідження нами перевірено здатність *C. cochliodes* 3250 до синтезу ферментів целюлозолітичного комплексу за формуванням зон просвітлення навколо колоній на агаризованому мінеральному середовищі з використанням відповідних субстратів та барвника конго червоного (табл. 1).

*Таблиця 1.* ***Зони гідролізу субстратів грибом C. cochliodes 3250***

| Досліджуваний об'єкт | $d_{зони} / d_{колонії}$ (субстрат Na-КМЦ) | $d_{зони} / d_{колонії}$ (субстрат целобіоза) |
|---|---|---|
| *C. cochliodes* 3250 | 0,92 ± 0,04 | 1,03 ± 0,03 |

За результатами експрес методу виявлено, що *C. cochliodes* 3250 продукує целюлозолітичні ферменти, що дифундують в агар і гідролізують досліджувані субстрати. При цьому зона просвітлення за вирощування гриба на живильному середовищі з використанням целобіози як субстрату значно перевищує зону просвітлення за використання Na-КМЦ. Отримані дані свідчать про синтез грибом ферментів різних за способом дії на целюлозу.

Наступним етапом роботи було визначення оптимального часу культивування гриба за загальною целюлозолітичною активністю. Отримані дані представлено в таблиці 2.

*Таблиця 2.* ***Загальна целюлозолітична активність C. cochliodes 3250***

| Доба культивування | Контроль | *C. cochliodes* 3250 |
|---|---|---|
| 7 | 0,466 ± 0,003 | 0,320 ± 0,023 |
| 14 | 0,420 ± 0,021 | 0,294 ± 0,021 |
| 21 | 0,431 ± 0,024 | 0,409 ± 0,021 |
| 28 | 0,342 ± 0,025 | 0,250 ± 0,017 |

Найвищий показник загальної целюлозолітичної активності відмічено на 7-у добу культивування — 0,42 ± 0,02 од./мл. При подальшому культивуванні синтез гідролітичних ферментів грибом *C. cochliodes* 3250 поступово зменшувався. При цьому контрольні зразки також містили редукуючі цукри, проте в меншій кількості, що можна пояснити гідролізом фільтрувального паперу в процесі зберігання та стерилізації.

Різні види грибів, продуцентів целюлаз відрізняються за способом утворювати окремі компоненти целюлозолітичних комплексів. Деякі види можуть гідролізувати більш високо упорядковані форми, інші — лише водорозчинні похідні полімеру [19]. Серед бактерій та грибів виділяють особливий клас фітопатогенів, які реалізують свою целюлазну активність на перших етапах атаки рослин шляхом гідролізу клітинної стінки рослин.

При гідролізі клітинної стінки до глюкози активно синтезуються ендо- та екзоглюкозидази, які діють синергічно. Дані гідролітичної активності компонентів целюлозолітичної системи *C. cochliodes* 3250 представлено на рис. 1. Екзоглюканазна активність у культуральній рідині гриба становила 0,67 ± 0,03 од./мл на 9-у добу культивування. Наявність екзоглюкозидази в культуральній рідині гриба є свідченням того, що він здатний деградувати кристалічну форму целюлози [20]. Ендоглюканази забезпечують гідроліз аморфної целюлози до целобіози. С. *cochliodes* 3250 продукує ендоглюканази у кількості 0,52 ± 0,02 од./мл. Найвищий показник ендоглюканазної активності відмічено на 9-у добу. Фермент $\beta$-глюкозидаза, який завершує розщеплення целюлози і забезпечує гідроліз целобіози до глюкози [20], також виявлено в культуральній рідині гриба. Проте найвищий показник зафіксовано на 12-у добу культивування — кількість $\beta$-глюкози-

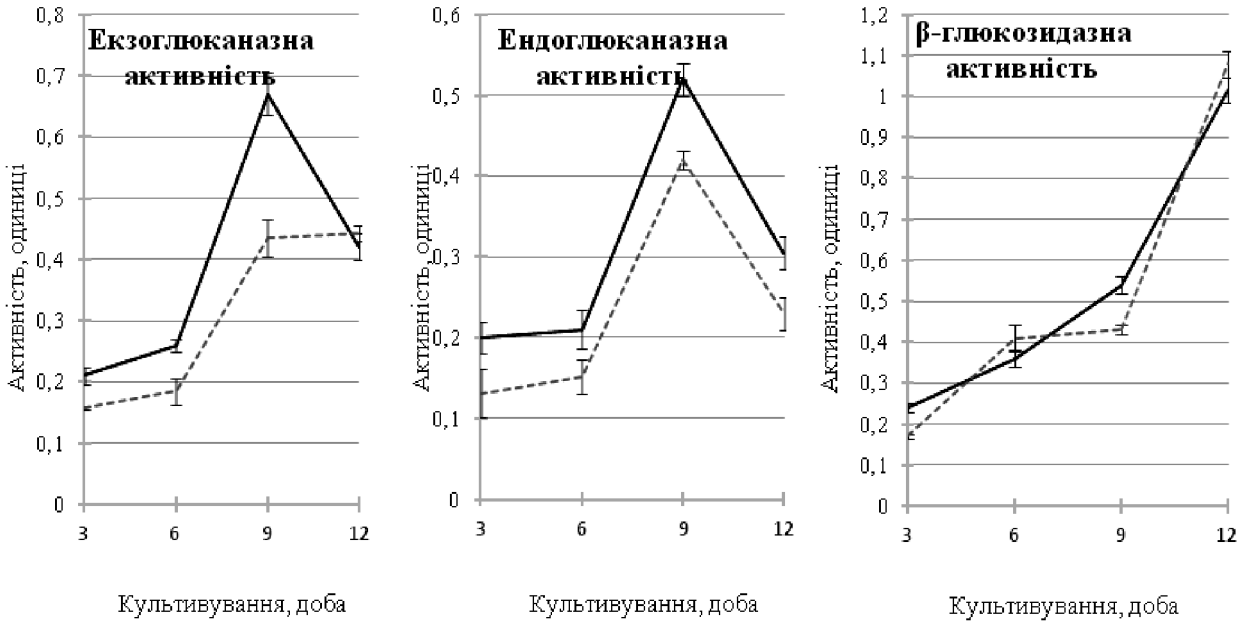


*Рис. 1. Динаміка активності компонентів целюлозолітичного комплексу гриба C. cochliodes 3250.*

дази в досліджуваній культуральній рідині складала 1,08 ± 0,03 од./мл.

Відмічена наявність редукуючих цукрів у контрольному варіанті може бути пов'язана з гідролізом фільтрувального паперу під час зберігання досліджуваних зразків.

Відомо, що індукція і локалізація целюлаз відбувається у верхівкових клітинах, або поблизу апікального кінця гіфи [19]. Висока целюлазна активність гриба обумовлює його здатність проникати в рослинні тканини. У вегетаційному досліді з гречкою посівною нами показано, що гриб *C. cochliodes* 3250 активно розвивається на коренях культури і утворює плодові тіла на кореневих волосках. Також виявлено проникнення гіф гриба в корені та кореневі волоски рослин гречки (рис. 2).

Таким чином, сапротрофний гриб *C. cochliodes* 3250 здатен до синтезу ферментів целюлазного комплексу (екзоглюканази, ендоглюканази, *β*-глюкозидази), що може забезпечити його проникнення в корені рослин. Показано, що *C. cochliodes* 3250 утворює плодові тіла на поверхні кореневих волосків та проникає в клітини ризодерми.

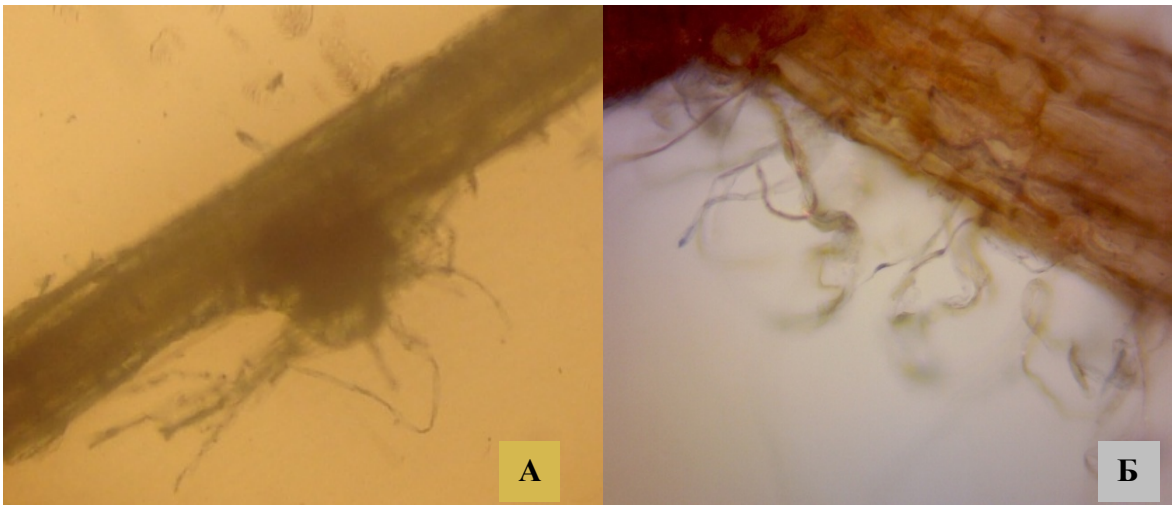


*Рис. 2. А — плодове тіло C. cochliodes 3250 на поверхні кореня гречки посівної (×100, світлова мікроскопія); Б — проникнення гіфів C. cochliodes 3250 в кореневі волоски (×200, світлова мікроскопія).*

1. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / [И. А. Тихоновича, Н. А. Прохорова]. — СПб. : Наука, 1998. — 194 с.

2. Смит С. Е. Микоризный симбиоз / С. Е. Смит, Д. Дж. Рид; пер. с англ. Е. Ю. Воронина. — М. : Товарищество научных изданий КМК, 2012. — 776 с.

3. Garcia-Garrido J. M. Cellulase activity in lettuce and onion plants colonized by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomusmosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe / J. M. Garcia-Garrido, I. Garcia-Romena and J. A. Ocampo // New Phitologist. — 1992. — Vol. 121, № 2. — P. 221–226.

4. Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots / [J. M. Garcia-Garrido, M. Tribac, A. Rejon-Palomareset et al.] // Journal of Experimental Botany. — 2000. — Vol. 51, № 349. — P. 1443–1448.

5. Perombelon M. Production of pectic enzymes by pathogenic and symbiotic *Rhizoctonia* strain / M. Perombelon and G. Hadley // New Phytologist. — 1965. — Vol. 64, № 1. — P. 144–151.

6. Leake J. R.Mycorrhizal fungi in terrestrial habitats / Leake J. R., Read D. J. / The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships. — Berlin : Springer, 1997. — P. 281–301.

7. Cairney J. W. G. Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis / J. W. G. Cairney, R. M. Burke // Mycological Research. — 1994. — Vol. 98, № 12. — P. 1345–1356.

8. Lindenberg G. Pectinolytic ability of some mycorrhizal and saprophytic Hymenomycetes / G. Lindenberg, M. Lindenberg // Archives of Micribiology. — 1997. — № 115. — P. 9–12.

9. Грибы, ассоциированные с корнями орхидей, в условиях оранжереи / [Е. А. Цавкелова, А. В. Александрова, Т. А. Чердынцева и др.] // Микол. и фитопатол. — 2003. — Т. 37, № 4. — С. 57–63.

10. Cevnik M. Filamentous fungi associated with the fine roots of *Erica herbacea* L. from the area influenced by the Žerjav lead smelter (Slovenia) / Mateja Čevnik, Maja Jurc & Dominik Vodnik // Pap. 4th EUROSILVA Workshop (GozdMartuljek, Sept. 9–12, 1999). — GozdMartuljek, 2000. — Vol. 40, № 4. —P. 61–64.

11. Bacterial endophytes in agricultural crops / A. Hallman, A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahafee, J. W. Kloepper // Can. J. Microbiol. — 1997. — Vol. 43, № 10. — C. 895–914.

12. Chaetoglobosin U, a cytochalasanalkaloidfromendophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019 / [Gang Ding, Yong C. Song, Jing R. Chen et al.] // J. Nat. Prod. — 2006. — Vol. 69, № 2. — C. 302–304.

13. El-Zayat S. A. Preliminary studies on laccase production by *Chaetomium globosum* an endophytic fungus in *Glinuslotoides* / S. A. El-Zayat. // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Science. — 2008. — Vol. 3, № 1. — C. 86–90.

14. Копылов Е. П. Почвенные сапрофитные грибы—природне регуляторы роста, развития и устойчивость растений к возбудителям болезней / Е. П. Копылов. — Palmarium academic publishing, AV Akademikerverlag GmbH&Co.KG, 2013. — 104 с.

15. Копилов Є. П. Ефективність симбіотичної взаємодії гриба *Chaetomium cochliodes* Palliser з рослинами сої / Є. П. Копилов, С. П. Надкерничний // Физиология и биохимия культурных растений. — 2008. — Т. 40, № 3. — С. 260–267.

16. Поиск грибных продуцентов целлюлолитических ферментов / И. В. Мороз, Р. В. Михайлова, Е. В. Шахнович, А. Г. Лобанок // Труды БГУ, Биотехнология. — 2013. — № 8. — С. 221–223.

17. Скрининг штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью / А. И. Осадчая, Л. А. Сафронова, Л. В. Авдеева, В. М. Иляш // Мікробіол. журн. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 41–48.

18. Методы экспериментальной микологии : Справочник / под ред. В. И. Билай. — К. : Наук. думка, 1982. — 549 с.

19. Билай В. И. Трансформация целлюлозы грибами / В. И. Билай, Т. И. Билай, Е. Г. Мусич. — К. : Наук.думка, 1982. — 296 с.

20. Борзова Н. В. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості / Н. В. Борзова, Л. Д. Варбанець // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 23–41.

## ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБА-АНТАГОНИСТА *CHAETOMIUM COCHLIODES*, БИОАГЕНТА МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТАХЕТОМИКА

**А. С. Йовенко**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Изучена целлюлозолитическая активность гриба-антагониста Chaetomium cochliodes 3250. Показано, что C. cochliodes 3250 синтезирует комплекс целлюлаз — ферментов деградации клеточной стенки. Самые высокие показатели эндо-, экзоглюкозидазной и β-глюкозидазной активности гриб проявляет на 9-е сутки культивирования. Высокая целюлазная активность обусловливает способность гриба проникать в растительные ткани. C. cochliodes 3250, интродуцированый в корневую зону гречихи посевной, образует плодовые тела на поверхности корневых волосков и проникает в клетки ризодермы.*

Ключевые слова: *C. cochliodes 3250, целлюлаза, ендоглюканаза, екзоглюканаза, β-глюкозидаза, растительно-микробная ассоциация, микориза.*

## CELLULOLYTIC ACTIVITY OF ANTAGONIST MOULD *CHAETOMIUM COCHLIODES*, BIO-AGENT OF MICROBIAL PREPARATION HETOMIK

**A. S. Yovenko**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*Cellulolytic activity of antagonist mould Chaetomium cochliodes 3250 has been investigated. It was shown that C. cochliodes 3250 synthesizes complex of cellulases — degradation enzymes of cell wall. The highest parameters of endo, exoglucosidase and β-glucosidase activity of mould are shown at Day 9 of cultivation. High cellulase activity causes the ability of mould to penetrate plant tissues. C. cochliodes 3250, which was introduced in the root zone of buckwheat seeds, forms fruiting bodies on the surface of root fibrils and penetrates cells of rhizodermis.*

Key words: *C. cochliodes 3250, cellulase, endoglucanase, exoglucanase, β-glucosidase, plant-microbial associations, mycorrhiza.*