

Є.П. Копилов, Г.В. Цехмістер

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНІСТЬ ГРИБА *ACREMONIUM* SP. 502, ВИДІЛЕНОГО З УРАЖЕНИХ РОСЛИН ОГІРКІВ

Метою роботи було дослідження целюлазної активності штаму гриба *Acremonium* sp. 502 в залежності від рН середовища, як одного із визначальних факторів проникнення його в рослини. **Методи.** Штам гриба *Acremonium* sp. 502, виділений з хворих рослин огірків, культивували на середовищі суцільний агар. Швидкість росту визначали за розміром діаметру колонії. Для визначення целюлазної, екзоглюканазної, ендоглюканазної та глюкозидазної активності використовували фільтрувальний папір, мікрокристалічну целюлозу, карбоксиметил-целюлозу, целобіозу відповідно. Кількість редуруючих цукрів визначали методом Шомоді-Нельсона. **Результати.** Досліджено динаміку целюлазної активності гриба *Acremonium* sp. 502, виділеного з уражених рослин огірків, за різних значень рН поживного середовища. Максимальні значення ферментативної активності були зафіксовані через 6 тижнів культивування гриба за рН середовища 8,5. При цьому загальна целюлазна активність складала 1,95 од/мл, екзоглюканазна – 3,23, ендоглюканазна – 2,85 і β -глюкозидазна – 2,39 од/мл. **Висновки.** Встановлено, що *Acremonium* sp. 502 здатний до синтезу ендо-, екзоглюканази та β -глюкозидази. Найвищу целюлозолітичну активність гриб виявляв через 6 тижнів культивування з показником рН середовища – 8,5. Можна припустити, що утворення целюлазних ферментів грибом *Acremonium* sp. 502 необхідно для його проникнення в рослину з подальшим розвитком захворювання.

Ключові слова: загальна целюлазна, екзоглюканазна, ендоглюканазна і β -глюкозидазна активності, *Acremonium* sp.

Мікроорганізми-продуценти целюлазних ферментних комплексів відіграють важливу роль в біодеструкції рослинних решток. Не менш важливою є роль целюлаз в патогенезі рослин. Відомо, що деякі бактерії та гриби, виділені з уражених рослин реалізують свою целюлазну активність на перших етапах інфікування рослин шляхом гідролізу клітинної стінки [10]. Для розщеплення кристалічної целюлози вони продукують низку целюлозолітичних ферментів (ендо-, екзоглюканази та β -глюкозидази). З фітопатогенних грибів ізольовані целюлазні ферменти які сприяють проникненню в тканини рослини-хазяїна і дозволяють грибам використовувати тканини рослин як джерело вуглецю [12]. Існує думка, що утворення целюлазних ферментів у *Fusarium oxysporum* Schltdl. відіграє певну роль в патогенезі захворювання [13].



Для кожного мікроорганізму наявні оптимальні межі рН, які визначають ступінь активності ферменту. Так, у збудника захворювання квасолі *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) deBary оптимум рН целюлазної активності становить 3,0 [15], а очищений препарат целюлази *F. oxysporum* Schltdl., який викликає в'янення томатів, характеризувався високим ступенем активності і вже через 20 годин викликав майже необоротне в'янення, при цьому целюлази гриба проявляють активність за рН від 2,0 до 9,0 з оптимумом 6,0 [14].

Представники роду *Acremonium* є сапротрофами, але за певних умов можуть змінювати тип живлення на біотрофний. Відомо, що *Acremoniums clerotigenum* Gams при підвищеному вмісті солей у ґрунті може рости в судинах рослин огірків. Гриби роду *Acremonium* були виділені з хворих рослин динь та кавунів в Іспанії [11], Італії [9] та США [7, 8]. Літературні дані щодо виділення представників роду *Acremonium* з хворих рослин на території України відсутні.

Зважаючи на вищезазначене, метою нашої роботи було дослідження целюлазної активності штама гриба *Acremonium* sp. 502 в залежності від рН середовища, як одного із визначальних факторів проникнення його в рослини.

Матеріали і методи

В роботі був використаний штамп гриба *Acremonium* sp. 502, виділений С.П. Надкерничним з хворих рослин огірків, які вирощувались в умовах закритого ґрунту. Опис культурально-морфологічних особливостей гриба наведено нами раніше [5]. Культуру гриба підтримували на суусловому агарі (4–5% сухих речовин).

Ріст гриба визначали за розміром колонії. [1, 6]. Гриб культивували на середовищі суусловий агар (4–5% сухих речовин) у діапазоні рН 3,5–12,0 за температури 26 ± 2 °С без світла, в чашках Петрі. Діаметр колонії визначали в трьох напрямках щодобово, протягом 10 діб. На основі отриманих даних визначали радіальну швидкість росту.

Для вивчення целюлазної активності *Acremonium* sp. 502 поверхнево культивували в пробірках з 5 мл синтетичного середовища Чапека (г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2,5, K_2HPO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,5, KCl – 0,5, FeSO_4 – 0,01) зі значеннями рН – 5,5, 7,0 та 8,5, де єдиним джерелом карбону була смужка фільтрувального паперу (Фільтрак) масою 50 мг. Посівний матеріал *Acremonium* sp. 502 отримували шляхом змиву конідій і фрагментів гіфів гриба з середовища суусловий агар (4–5% сухих речовин). Для визначення титру приготовленої суспензії використовували камеру Горяєва і проводили висів на щільне поживне середовище суусловий агар (4–5% сухих речовин) за методом ґрунтових розведень Ваксмана. Висів проводили суспензією спор ($T = 1 \times 10^6$ КУО), в кількості 5% від об'єму поживного середовища. Термін культивування складав 56 діб за 26 ± 2 °С.

Целюлазну активність визначали згідно [1, 2] протягом 8 тижнів культивування (строк дослідження обумовлений появою симптомів захворювання на рослинах). Культуральну рідину отримували шляхом фільтрування міцелію гриба через скляний фільтр. Повторність дослідів триразова.



Для визначення загальної целюлазної активності до 50 мг фільтрувального паперу (Фільтрак) додавали один мл культуральної рідини, один мл 0,05 М натрій-цитратного буфера та інкубували протягом однієї години за 40 °С. За одиницю загальної целюлазної активності приймали таку кількість фермента, яка за 60 хв утворює один мг редукуючих цукрів [1, 2].

Екзоглюканазну активність визначали на мікрокристалічній целюлозі (Авіцел “Евалар”). Для цього до 50 мг мікрокристалічної целюлози додавали один мл культуральної рідини, один мл 0,05 М натрій-цитратного буфера та інкубували протягом однієї години за 40 °С. За одиницю екзоглюканазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 60 хв утворює один мг редукуючих цукрів [1, 2].

Ендоглюканазну активність визначали дією ферментів на карбоксиметилцелюлозу (КМЦ): один мл 0,5%-го розчину Na-КМЦ в 0,05 М натрій-цитратному буфері та один мл фільтрату культуральної рідини інкубували протягом 30 хв за 40 °С. За одиницю ендоглюканазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 30 хв дії утворює один мг редукуючих цукрів [1, 2].

Для визначення β-глюкозидазної (целобіазної) активності до одного мл 0,025%-го розчину целобіози (“Merck”) в 0,05 М натрій-цитратному буфері додавали 1 мл фільтрату культуральної рідини та інкубували протягом 30 хв за 40 °С. За одиницю β-глюкозидазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 30 хв дії утворює один мг редукуючих цукрів [1].

Кількість редукуючих цукрів визначали методом Шомоді-Нельсона [1]. Для цього до 2 мл дослідного розчину додавали по 1 мл реактиву Шомоді та інкубували протягом 15 хв за 100 °С. Потім суміш швидко охолоджували на льодяній бані та додавали один мл реактиву Нельсона. Об’єм доводили дистильованою водою до 25 мл. Розчин ретельно перемішували. Контролем слугували зразки, де замість культуральної рідини додавали один мл поживного середовища.

Визначення редукуючих цукрів проводили на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 560 нм.

Розрахунки та статистичне опрацювання результатів проводили з використанням прикладних програм Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

Культуру гриба зберігали в пробірках на середовищі сушений агар (4–5% сухих речовин) за температури 4–6 °С. Суттєвих змін морфолого-культуральних характеристик гриба при зберіганні не виявлено. При вивченні впливу рН середовища на ріст гриба було встановлено, що *Acremonium* sp. 502 на поживному середовищі сушений агар розвивається в діапазоні рН від 3,5 до 12,0, оптимальна реакція середовища для росту гриба – слабо лужна (рН 8,5). Діаметр колонії на 10-ту добу при цьому становив 24,75 мм. Швидкість лінійного росту варіювала від 0,05 при рН – 3,5 до 0,10 мм/год при рН – 8,5. Втім, навіть нижній і верхній показники рН не були критичними для гриба, оскільки ріст міцелію не зупинявся [5].



Залежність загальної целюлазної активності від рН середовища представлена на рис. 1. Максимальна целюлазна активність була зафіксована через 6 тижнів культивування (за рН середовища 8,5) і становила $1,95 \pm 0,11$ од/мл. При вирощуванні *Acremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 цей показник був значно нижчим. Необхідно зазначити, що у контрольних зразках, в яких замість культуральної рідини додавали один мл поживного середовища, також фіксували незначну целюлазну активність ($0,43 \pm 0,05$ од/мл) внаслідок руйнації фільтрувального паперу під впливом реакції поживного середовища.

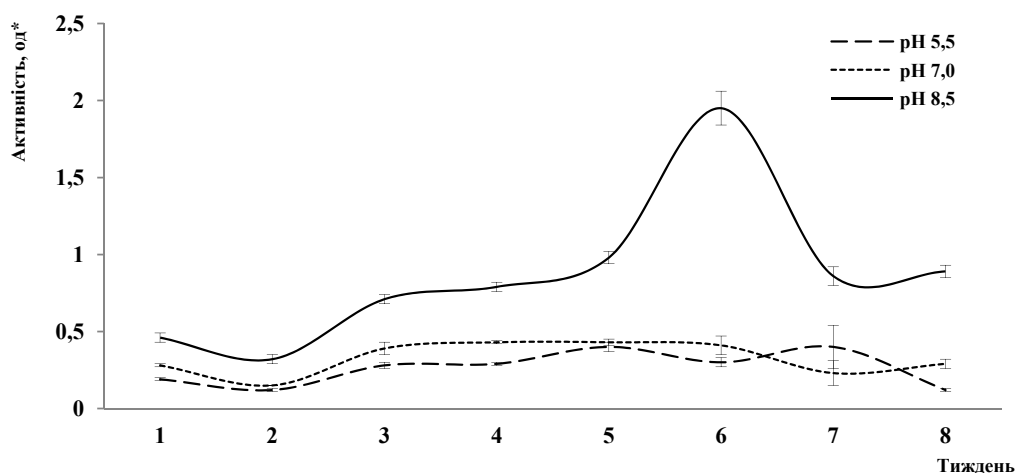


Рис. 1. Загальна целюлазна активність гриба *Acremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 1. General cellulase activity of *Acremonium* sp. 502 at different pH values

На початковому етапі гідролізу целюлози до глюкози беруть участь ендо- та екзоглюкозидази, які діють синергічно. Наявність екзоглюкозидази в культуральній рідині гриба є свідченням того, що він здатний деградувати кристалічну форму целюлози. Більшість грибів екзоглюкозидазною активністю не володіють і здатні гідролізувати тільки аморфні форми целюлози [3]. Одержані нами дані свідчать, що найвища екзоглюкозидазна активність *Acremonium* sp. 502 реєструвалась через 6 тижнів культивування і становила $3,23 \pm 0,02$ од/мл (рис. 2). При вирощуванні *Acremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 цей показник був значно нижчим.

Ендоглюкозидази забезпечують гідроліз аморфної целюлози до целобіози. Найвища кількість редуруючих цукрів була виявлена через 6 тижнів культивування, при цьому ендоглюкозидазна активність становила $2,85 \pm 0,21$ од/мл. При вирощуванні *Acremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 цей показник був значно нижчим (рис. 3).

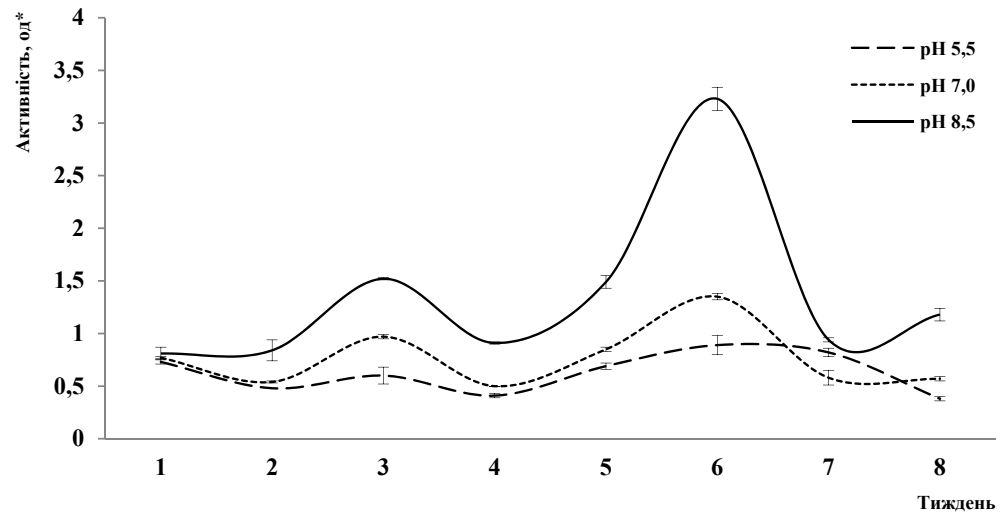


Рис. 2. Екзоглюканазна активність гриба *Accremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 2. Exoglucanase activity of *Accremonium* sp. 502 at different pH values

Фермент β -глюкозидаза завершує розщеплення целюлози і забезпечує гідроліз целобіози до глюкози. Залежність β -глюкозидазної активності *Accremonium* sp. 502 від рН середовища представлена на рис. 4. Найвищий показник був зафіксований на середовищі з рН – 8,5 через 6 тижнів культивування і становив $2,39 \pm 0,10$ од/мл. При вирощуванні *Accremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 β -глюкозидазна активність була на рівні контролю.

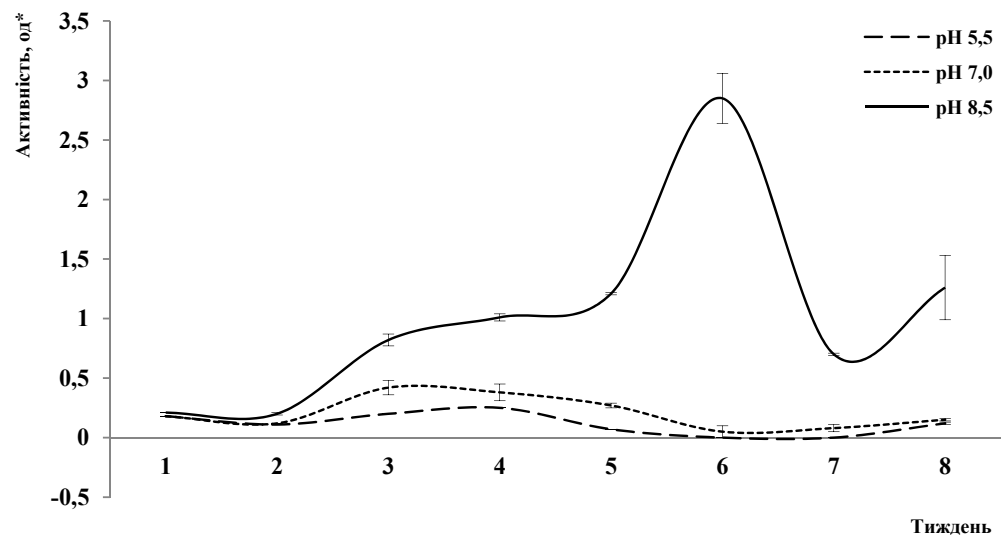


Рис. 3. Ендоглюканазна активність гриба *Accremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 3. Endoglucanase activity of *Accremonium* sp. 502 at different pH values



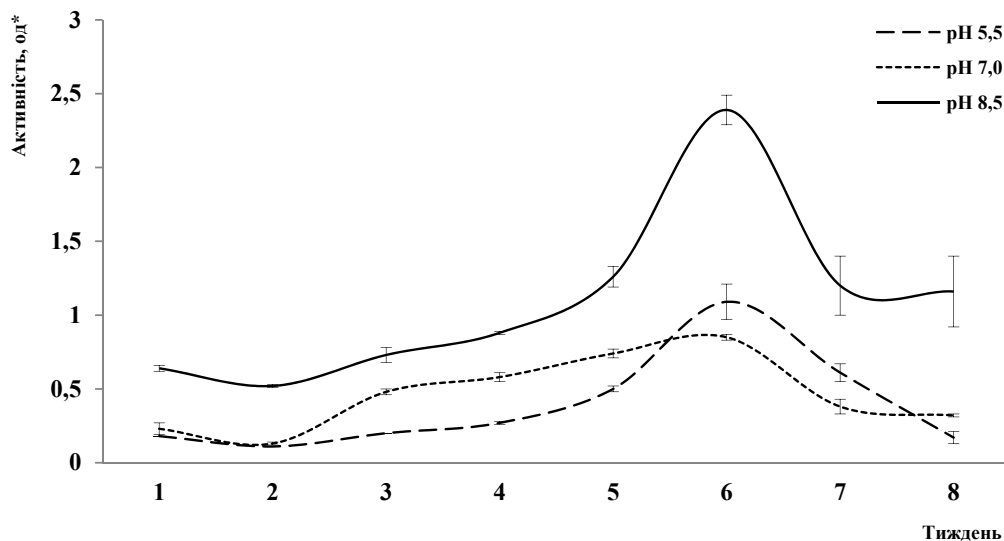


Рис. 4. β -глюкозидазна активність гриба *Acremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 4. β -glucosidase activity of *Acremonium* sp. 502 at different pH values

Таким чином, встановлено, що *Acremonium* sp. 502 здатний до синтезу ендо-, екзоглюканаз та β -глюкозидази. Найвищу целюлозолітичну активність гриб виявляв через 6 тижнів культивування з рН середовища – 8,5. При цьому загальна целюлозолітична активність складала 1,95 од/мл, екзоглюканазна активність – 3,23, ендоглюканазна – 2,85 та β -глюкозидазна активність – 2,39 од/мл. Слід відмітити, що крива синтезу целюлазних ферментів має хвилеподібний характер, що є свідченням використання грибом редуруючих цукрів як джерела вуглецю, тому незначне підвищення целюлазної активності фіксували також і через 3 тижні культивування.

Раніше нами було показано, що розвиток симптомів захворювання огірків спостерігається, починаючи з фази справжніх листків, тобто через 5–7 тижнів після появи сходів. Симптоми хвороби проявляються у пожовтінні прожилків та країв листової пластинки з подальшим побурінням, з'являються жовтуваті краплі на поверхні листка з подальшим їх відмиранням [4]. Зважаючи на вищевикладене, можна припустити, що утворення целюлазних ферментів грибом *Acremonium* sp. 502 необхідно для його проникнення в рослину що призводить до розвитку захворювання.

Е.П. Копылов, А.В. Цехмістер

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН Украины,
ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина

ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБА *ACREMONIUM SP. 502*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОРАЖЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОГУРЦОВ

Реферат

*Целью работы было изучить целлюлазную активность штамма гриба *Acremonium sp. 502* в зависимости от pH среды, как одного из определяющих факторов его проникновения в растения. **Методы.** Штамм гриба *Acremonium sp. 502*, выделенный из больных растений огурцов, культивировали на среде сусловый агар. Скорость роста гриба определяли по диаметру колоний. Для определения целлюлазной и экзоглюканазной активности использовали фильтровальную бумагу, микроскопическую целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, целобиозу соответственно. Количество редуцирующих сахаров определяли методом Шомоди-Нельсона. **Результаты.** Исследована динамика целлюлазной активности гриба *Acremonium sp. 502*, выделенного из пораженных растений огурцов, при различных значениях pH питательной среды. Максимальные значения ферментативной активности были зафиксированы через 6 недель культивирования гриба при pH среды 8,5. При этом общая целлюлазная активность составляла 1,95 ед/мл, экзоглюканазная – 3,23, эндоглюканазная – 2,85 и β -глюкозидазная – 2,39 ед/мл, что свидетельствует в пользу ферментативного механизма проникновения гриба внутрь тканей растений с последующим развитием заболевания. **Выводы.** Установлено, что *Acremonium sp. 502* способен к синтезу эндо-, экзоглюканазы и β -глюкозидазы. Наибольшую целлюлозолитическую активность гриб проявлял через 6 недель культивирования с показателем pH среды – 8,5. Можно предположить, что образование целлюлазных ферментов грибом *Acremonium sp. 502* необходимо для его проникновения в растение с последующим развитием заболевания.*

Ключевые слова: общая целлюлазная, экзоглюканазная, эндоглюканазная и β -глюкозидазная активности, *Acremonium sp.*

E.P. Kopylov, G.V. Tsehmister

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS,
97, Shevchenko st., Chernihiv, Ukraine

CELLULOLYTIC ACTIVITY OF STRAIN OF THE FUNGUS *ACREMONIUM SP. 502* PICKED UP FROM AFFECTED CUCUMBER PLANTS

Summary

*The aim of the work was to study the cellulase activity of the strain *Acremonium sp. 502* depending on medium pH, as a determinant of its penetration into the plant. **Methods.** The strain *Acremonium sp. 502* was cultivated on wort agar. The optimal pH was detected by growth diameter of the mold colony. We used filter paper, microcrystalline*



cellulose, carboxymethyl cellulose and cellobiose to fix cellulase, exoglucanase, endoglucanase and β -glucosidase activity. The amount of reducing sugars was determined by Somogyi-Nelson method. **Results.** It was investigated the dynamics of cellulase activity at different pH values of culture medium of the mold *Acremonium* sp. 502 isolated from stroked cucumber plants. Maximal enzyme activity values were detected after 6 weeks of mold cultivating at pH 8.5. Herewith the general cellulase activity was 1.95 u/ml, exoglucanase – 3.23, endoglucanase – 2.85, and β -glucosidase – 2.39 u/ml, which evidences in favor of the enzymatic mechanism of mold penetration into the plant tissues and the subsequent development of the disease. **Conclusions.** It was established that *Acremonium* sp. 502 is capable to synthesize exo-, endoglucanase and β -glucosidase. The most cellulolytic activity was detected after 6 weeks of mold cultivating at pH 8.5. It can be assumed that formation of cellulase enzymes with the mold is necessary for its penetrating in plant followed by the development of the disease.

Key words: the main cellulase, exoglucanase, endoglucanase and β -glucosidase activity, *Acremonium* sp.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Київ.: Наук. думка, 1982. – 549 с. [5]
2. Пат. 2029784 Российская Федерация, МПК⁶ C12P21/00, C12N9/14, C12N1/14; C12R1:66. Штамм гриба *Aspergillus species* – продуцент белка и целлюлаз / Назаренко А.В., Соколов В.Н., Соколова Л.Н., Гинак А.И.; заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургский технологический институт им. Ленсовета. № 5031953/13, заявл. 12.03.1992; опубл. 27.02.1995.
3. Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 23–41.
4. Цехмістер Г.В. Акремоніозне в'янення огірків // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві (Чернігів, 26–27 листопада 2013 р): Збірник тез ІХ наукової конференції молодих вчених. – Чернігів: ІСМАПВ НААН, 2013. – С. 35–37.
5. Цехмістер Г.В. Вивчення культурально-морфологічних особливостей фітопатогенного гриба *Acremonium* sp. 502 // С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: Сівер-Друк, 2014. – Вип. 20. – С. 49–53.
6. Шендрік К.М. Вплив екологічних факторів на розвиток збудників кореневих гнилей сої / Захист і карантин рослин. – 2007. – № 53. – С. 189–194.
7. Aegerter B.J. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California // Plant Disease. – 2000. – Vol. 84, № 3. – P. 224–230.
8. Bruton B.D. Disease reaction among selected *Cucurbitaceae* to an *Acremonium cucurbitacearum* isolate from Texas // Hortscience. – 2000. – Vol. 35, № 4. – P. 677–680.
9. Chilosi G. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy // OEPP/EPPO Bulletin. – 2008. – Vol. 38. – P. 147.



10. *Ebel J.* Oligoglucoside elicitor mediated activation of plant defense // *Bioessays*. – 1998. – 20, N 7. – P. 569–576.
11. *Iglesias A.* Pathogenicity of fungi associated with melon vine decline and selection strategies for breeding resistant cultivars // *Annals of Applied Biology*. – 2000. – V. 137. – P. 141–151.
12. *McDougall J.M.* Purification and characterization of the (1→3)- β -glucanases from *Acremonium* sp. IMI 383068 // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – Vol. 230. – P. 259–264.
13. *Modafar C.El.* Relationship between Cell Wall Susceptibility to Cellulases and Pectinases of *Fusarium oxysporum* and Susceptibility of Date Palm Cultivars // *Biologia Plantarum* – 2000. – № 4, V. 43. – P. 571–576.
14. *Ramanathan G.* Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation // *Journal of Scientific & Industrial Research*. – 2010. – V. 69. – P. 454–459.
15. *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management / G. S. Saharan, Naresh Mehta – Springer Science & Business Media, 2008 – 486 p.

Стаття надійшла до редакції 18.09.2014 р.

