

И.Н. Курченко, А.К. Павличенко, Е.М. Юрьева

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП Д 03680, Украина, тел.: +38(044) 526 11 89,
e-mail: irinakurchenko@ukr.net

РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭНДОФИТНЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ALTERNARIA ALTERNATA* И *CERATOCYSTIS SP.*

Цель исследования – сравнительное изучение ростовых характеристик и особенностей потребления глюкозы эндофитными и фитопатогенными штаммами *A. alternata* и *Ceratocystis sp.* *Методы.* В работе использованы общепринятые микробиологические методы исследований, проведена статистическая обработка данных. *Результаты.* Разница в значениях удельной скорости роста между фитопатогенными и эндофитными штаммами одного вида оказалась недостоверной. Уровень накопления биомассы эндофитного штамма *Ceratocystis sp.* был на 56,3% выше, чем фитопатогенного, при этом для штаммов *A. alternata* наблюдалась противоположная тенденция – у фитопатогена он был на 11,7% выше, чем у эндофита. Для экономического коэффициента исследованных штаммов *Ceratocystis sp.* и *A. alternata* установлена противоположная закономерность: он был на 38,5% ниже у фитопатогена *Ceratocystis sp.* и на 40,7% – у эндофита *A. alternata*. Эндофитный штамм *A. alternata* и фитопатогенный *Ceratocystis sp.* характеризовались высокой скоростью потребления глюкозы (0,019 и 0,017 ч⁻¹ соответственно). Значения метаболического коэффициента были ниже у штаммов с высокими экономическими коэффициентами – фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis sp.* Таким образом, по ростовым характеристикам фитопатогенных и эндофитных штаммов *Ceratocystis sp.* и *A. alternata* установлены противоположные закономерности.

Ключевые слова: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis sp.*, удельная скорость роста, экономический коэффициент, эндофит, фитопатоген.

В последние десятилетия значительно возросло количество исследований, посвященных изучению видового разнообразия и физиологических особенностей группы эндофитных грибов, а также их биологической роли, которая до настоящего времени выяснена недостаточно [3, 18]. При изучении видового состава эндофитных грибов мхов, кустарничков порядка *Ericales* и других растений мезоолиготрофных и олиготрофных болот Ровенской и Житомирской областей нами выявлены общие для



этих растений виды грибов-эндофитов [3]. Для дальнейших исследований были отобраны доминирующие и часто встречающиеся виды эндофитов *Ceratocystis* sp., *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium poae*, а для сравнения — штаммы соответствующих видов микроскопических грибов — патогенов растений и почвенных сапрофитов.

Большинство видов *Alternaria* — сапрофиты, обитающие обычно в почве или на разлагающихся растительных остатках. Они получают источники питания и энергии за счет гидролиза целлюлозосодержащих субстратов и встречаются в разных местообитаниях как убиквисты. Некоторые виды являются патогенами растений и возбудителями латентной инфекции [16, 19].

Виды рода *Ceratocystis* обнаруживаются при сосудистом микозе древесных растений, однако не существует единого мнения относительно патогенных свойств представителей этого рода [12, 14, 17]. Виды рода *Ceratocystis* были выделены нами с высокой частотой как эндофиты болотных растений, а также среди комплекса патогенных видов при массовом усыхания дубрав Украины [3, 5].

Особенности роста *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. представлены лишь в единичных работах [15, 16, 19]. К сожалению, отсутствуют данные относительно ростовых характеристик штаммов разных трофических групп исследуемых видов как интегрального показателя их общего физиологического состояния. Цель данного исследования — сравнительное изучение ростовых характеристик и особенностей потребления глюкозы эндофитными и фитопатогенными штаммами *A. alternata* и *Ceratocystis* sp.

Материалы и методы

Объектами исследования были 2 штамма: эндофит *A. alternata* 16801 (стебель сабельника, Ровенская обл., 2002), фитопатоген *A. alternata* 16819 (плоды томата, Херсонская обл., 2009); а также эндофитный штамм *Ceratocystis* sp. 16871 (верхушка сабельника, Житомирская обл., 2010) и фитопатогенный штамм *Ceratocystis* sp. 16872 (ветка дуба, Житомирская обл., 2012), которые поддерживаются в коллекции культур грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Посевным материалом служила стандартная суспензия (1×10^6 колоний/мл) 10-суточной культуры грибов, которую вносили в количестве 10% (об/об) в среду Чапека, содержащую 20 г/л глюкозы [10]. Культивирование исследованных штаммов проводили в течение 10 суток в колбах Эрленмейера емкостью 0,75 л, содержащих 0,2 л среды, на качалках (232 об/мин, температура 26–28 °С), рН среды 4,7.

Накопление биомассы определяли гравиметрически после высушивания до постоянного веса при 70 °С, концентрацию глюкозы в среде — модифицированным методом Бертрана [9, 10].



Удельную скорость роста (μ) в экспоненциальной фазе, экономический (Y) и метаболический (q) коэффициенты в стационарной фазе рассчитывали в соответствии с общепринятыми формулами [11].

Полученные результаты были обработаны статистически (средние значения, ошибки средних, средние квадратичные отклонения для $n=9$ при уровне значимости $P=0,95$), представлены графически и проанализированы с применением пакета STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Все штаммы *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. на питательной среде с глюкозой характеризовались мицелиальным ростом и в общем росли медленнее, чем изученные ранее штаммы *Fusarium poae* и *Penicillium funiculosum* из разных местообитаний [8]. Log-фаза у всех изученных штаммов наступала через 24–36 часов после начала культивирования, ее продолжительность достигала 48 часов у эндофитных штаммов и 12–24 часа — у фитопатогенных (табл.; рис.). Как правило, все штаммы выходили на стационарную фазу роста к 7–9 суткам.

Таблица

Ростовые характеристики и потребление глюкозы штаммами *Alternaria alternata* и *Ceratocystis* sp.

Table

Growth characteristics and glucose utilization by *Alternaria alternata* and *Ceratocystis* sp. strains

Штамм	μ , час ⁻¹	log фаза, час	Глюкоза на 10 сут, г/л	q , час ⁻¹	Биомасса, г/л	Y , %
<i>Alternaria alternata</i> 16801	0,150 ± 0,022	48	3,10 ± 0,90	0,019 ± 0,0007	3,760 ± 0,633	27,70 ± 0,94
<i>Alternaria alternata</i> 16819	0,130 ± 0,032	24	6,50 ± 0,09	0,013 ± 0,0014	4,260 ± 1,867	46,70 ± 4,83
<i>Ceratocystis</i> sp. 16871	0,210 ± 0,089	48	3,10 ± 0,80	0,010 ± 0,0009	5,420 ± 1,491	44,40 ± 3,81
<i>Ceratocystis</i> sp. 16872	0,170 ± 0,014	12	11,60 ± 0,31	0,017 ± 0,0006	2,370 ± 0,139	27,30 ± 0,34

Удельная скорость роста была максимальной у эндофитного штамма *Ceratocystis* sp., несколько ниже — у фитопатогенного и еще ниже — у эндофитного и фитопатогенного штаммов *A. alternata*. Следует отметить тот факт, что разница между фитопатогенными и эндофитными штаммами одного вида оказалась недостоверной (табл.).

Максимальный и минимальный уровни накопленной биомассы в стационарной фазе роста были отмечены у штаммов *Ceratocystis* sp., при-



чем фитопатоген образовывал на 56,3% меньше биомассы, чем эндофит (табл.). Уровень биомассы штаммов *A. alternata* из разных местообитаний был ниже, чем у эндофитного штамма *Ceratocystis* sp. 16871, при этом наблюдалась противоположная тенденция – у фитопатогена он был на 11,7% выше, чем у эндофита.

У эндофитного штамма *Ceratocystis* sp. 16871 при максимальных уровнях биомассы и удельной скорости роста экономический коэффициент составлял $44,4 \pm 3,81\%$ и был практически таким же, как и у фитопатогена *A. alternata* 16819 с минимальной среди изученных штаммов удельной скоростью роста (табл.).

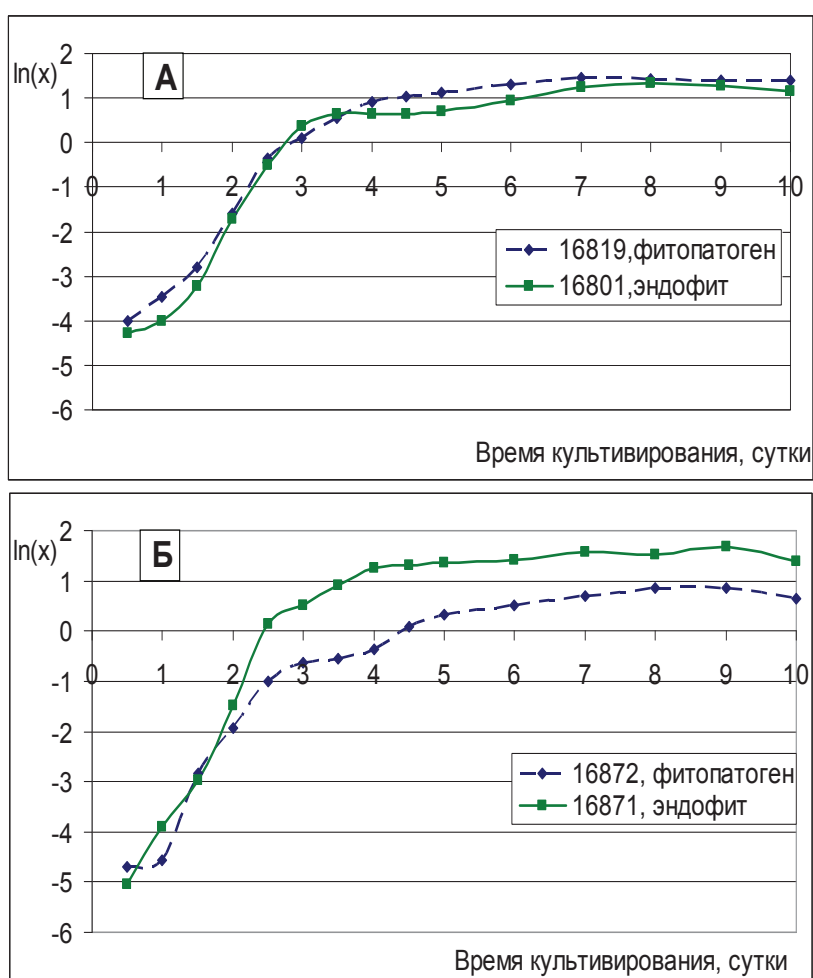


Рис. Накопление биомассы штаммами *Alternaria alternata* (А) и *Ceratocystis* sp. (Б): x – биомасса, г/л

Fig. Biomass accumulation by *Alternaria alternata* (A) and *Ceratocystis* sp. (B) strains: x – biomass, g/l



В целом, для исследованных штаммов разных видов были установлены противоположные закономерности: для *Ceratocystis* sp. экономический коэффициент был в 1,6 раза выше у эндофита, для *A. alternata* — в 1,7 раза выше у фитопатогена. Значения метаболического коэффициента были ниже у штаммов с максимальными экономическими коэффициентами — фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis* sp.

Максимальная скорость потребления глюкозы была отмечена у эндофитного штамма *A. alternata* и фитопатогенного *Ceratocystis* sp. (табл.), причем экономические коэффициенты этих штаммов были минимальными среди всех изученных. При этом метаболические коэффициенты фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis* sp. характеризовались минимальными значениями при максимальных уровнях накопления биомассы и экономического коэффициента. Следует отметить, что эндофиты *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. потребляли глюкозу активнее, чем фитопатогены этих же видов — остаточная концентрация глюкозы в среде на 10 сутки у эндофитных штаммов составила 15,5% от начального содержания, в то время как у фитопатогена *A. alternata* она достигала 32,5% и еще выше у фитопатогена *Ceratocystis* sp. — 59,5% (табл.).

При культивировании штаммов *A. alternata* pH среды изменялось от исходного 4,6–4,7 в щелочную сторону: до 7,6 у эндофита и до 8,0 у фитопатогена. Изученные штаммы *Ceratocystis* sp. также подщелачивали среду в процессе роста: эндофит — до 7,7 и фитопатоген — до 7,0.

Таким образом, полученные нами данные сравнимы с результатами, известными для других видов грибов, обладающих высокой скоростью роста. Так, удельная скорость роста двух морфологических форм (пеллеты и гифы) *Thielavia* sp. на среде с глюкозой не зависела от мицелиальной структуры и составляла в первой экспоненциальной фазе 0,306 ч⁻¹ (пеллеты) и 0,349 ч⁻¹ (гифы). Значения экономического коэффициента достигали 30,5 и 43,6% для пеллет и гиф, соответственно. При пеллетной форме роста *Thielavia* sp. экономический и метаболический коэффициенты свидетельствовали о преобладании в их метаболизме катаболических процессов. Для штамма *T. terrestris* величина экономического коэффициента также была выше у гифальной формы (45,3% на стадии ветвления мицелия и 53,3% — набухания конидий) [1].

Ранее нами было установлено, что штаммы *F. poae* и *P. funiculosum*, выделенные из разных местообитаний, различались по ростовым характеристикам [8]. Так, удельная скорость роста эндофитного штамма *F. poae* была максимальной (0,38 ч⁻¹), ниже — у фитопатогенного (0,30 ч⁻¹) и наименьшей — у почвенного штамма (0,18 ч⁻¹). Однако для изученных штаммов *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. из разных местообитаний разница в значениях удельной скорости роста была не достоверной (табл.).

Уровень накопления биомассы *F. poae* был максимальным у почвенного и минимальным — у фитопатогенного штаммов, в то время как



эндофит занимал промежуточное положение [8]. Такая же закономерность была установлена для изученных штаммов *Ceratocystis* sp. Однако, для фитопатогена *A. alternata* был характерен более высокий уровень накопления биомассы, чем для эндофита.

При изучении штаммов *F. roae* было установлено, что экономический коэффициент фитопатогена был выше, чем у эндофита. Для штаммов *A. alternata* установлена аналогичная закономерность — экономический коэффициент эндофита был на 40,7% ниже, чем у фитопатогена. Противоположная тенденция отмечена для штаммов *Ceratocystis* sp. — у фитопатогена его значение было на 38,5% ниже, чем у эндофита. У изученного ранее почвенного штамма *P. funiculosum* экономический коэффициент был на 55,8% ниже по сравнению с эндофитным. Такие различия в значениях экономического коэффициента характерны для грибов и ранее были установлены для других видов. Так, для *Phoma solanicola* величина экономического коэффициента составляла 25%, для штаммов *F. sporotrichiella* она варьировала в пределах 23–57%, *P. spinulosum* — 38–55%, *P. westlingii* — 14–40%, а для *P. aurantiogriseum* в среднем составляла 41% [2, 13].

В результате изучения ростовых характеристик эндофитных и фитопатогенных штаммов *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. были сделаны следующие выводы:

— штаммы *A. alternata* и *Ceratocystis* sp., выделенные из разных местообитаний, росли медленнее, чем изученные ранее штаммы *F. roae* и *P. funiculosum*;

— удельная скорость роста эндофитных штаммов *Ceratocystis* sp. и *A. alternata* была выше, чем у фитопатогенов этих же видов, однако, в отличие от *F. roae*, эта разница была значительно менее выражена и практически не выходила за пределы статистической ошибки;

— по величине экономического коэффициента для исследованных штаммов *Ceratocystis* sp. и *A. alternata* установлены противоположные закономерности: для *Ceratocystis* sp. он был на 38,5% ниже у фитопатогена, а для *A. alternata* — на 40,7% ниже у эндофита;

— значения метаболического коэффициента были ниже у штаммов с максимальными экономическими коэффициентами — фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis* sp.

Таким образом, ростовые параметры фитопатогенных штаммов *Ceratocystis* sp. и *F. roae* более сходны между собой (меньшая удельная скорость роста, уровень биомассы, более медленное потребление глюкозы) отличаются от таковых, полученных для штаммов *A. alternata* [4, 6, 7].



І.М. Курченко, А.К. Павличенко, О.М. Юр'єва

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна,
тел.: +38(044) 5261189, e-mail: irinakurchenko@ukr.net

РОСТОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕНДОФІТНИХ ТА ФІТОПАТОГЕНИХ ШТАМІВ *ALTERNARIA ALTERNATA* І *CERATOCYSTIS* SP.

Реферат

Мета досліджень — порівняльне вивчення ростових характеристик та особливостей споживання глюкози ендofітними і фітопатогенними штамми *A. alternata* та *Ceratocystis* sp. **Методи.** В роботі використані загальноприйняті мікробіологічні методи досліджень, проведена статистична обробка даних. **Результати.** Різниця у величинах питомої швидкості росту між ендofітними та фітопатогенними штамми одного виду виявилася недостовірною. Рівень накопичення біомаси ендofітного штаму *Ceratocystis* sp. був на 56,3% вищим, ніж у фітопатогенного, при цьому для штамів *A. alternata* спостерігалася протилежна тенденція — у фітопатогена він був на 11,7% вищим, ніж у ендofіта. Для економічного коефіцієнта досліджених штамів *Ceratocystis* sp. і *A. alternata* встановлена протилежна закономірність: він був на 38,5% нижчим у фітопатогена *Ceratocystis* sp. і на 40,7% — у ендofіта *A. alternata*. Ендofітний штам *A. alternata* і фітопатогенний *Ceratocystis* sp. характеризувалися високою швидкістю споживання глюкози (0,019 і 0,017 год⁻¹ відповідно). Значення метаболічного коефіцієнта були нижчими у штамів з високими економічними коефіцієнтами — фітопатогена *A. alternata* і ендofіта *Ceratocystis* sp. Таким чином, за ростовими характеристиками фітопатогенних та ендofітних штамів *Ceratocystis* sp. і *A. alternata* встановлені протилежні закономірності.

Ключові слова: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis* sp., питома швидкість росту, економічний коефіцієнт, ендofіт, фітопатоген.

I.N. Kurchenko, A.K. Pavlychenko, E.M. Yurieva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154,
Acad. Zabolotny St., Kiev, GSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38(044) 526 11 89, e-mail: irinakurchenko@ukr.net

GROWTH CHARACTERISTICS OF ENDOPHYTIC AND PLANT PATHOGENIC *ALTERNARIA ALTERNATA* AND *CERATOCYSTIS* SP. STRAINS

Summary

The **aim** of our investigation — a comparative study of growth characteristics and peculiarities of glucose utilization by endophytic and



plant pathogenic *A. alternata* and *Ceratocystis* sp. strains. **Methods.** The standard methods of microbiological research were used; statistical analysis of the data was carried out. **Results.** The difference in specific growth rate between plant pathogenic and endophytic strains of the same species was not significant. Biomass accumulation level of endophytic *Ceratocystis* sp. strain was by 56.3% higher than of plant pathogenic ones, while the opposite trend observed for *A. alternata* strains – it was by 11.7% higher for plant pathogen than for endophyte. The opposite regularity in economic coefficient was established for *Ceratocystis* sp. and *A. alternata* strains. It was by 38.5% lower for plant pathogenic *Ceratocystis* sp. strain and by 40.7% – for endophytic *A. alternata* ones. Endophytic *A. alternata* and plant pathogenic *Ceratocystis* sp. strains characterized by high rate of glucose utilization (0.019 and 0.017 h⁻¹ respectively). The metabolic coefficient values were lower for strains with the high economic coefficients – plant pathogenic *A. alternata* and endophytic *Ceratocystis* sp. Thus, the opposite regularities in growth characteristics of plant pathogenic and endophytic *Ceratocystis* sp. and *A. alternata* strains were established.

Key words: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis* sp., specific growth rate, economic coefficient, endophyte, plant pathogen.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громозова Е.Н., Фомина М.А., Блажчук И.С., Подгорский В.С. Физиологические особенности роста различных мицелиальных структур *Thielavia* sp. на среде с глюкозой // Микробиол. журн. – 1989. – 51, № 1. – С. 43–46.
2. Дорожкин Н.А., Бельская С.И., Попов Ф.А. Влияние источников углеродного и азотного питания на рост и развитие *Phoma solanicola* Prill. et Del. // Микол. и фитопатол. – 1978. – 12, № 4. – С. 310–314.
3. Курченко И.Н., Соколова Е.В., Орлов А.А., Жданова Н.Н. Эндофитные микромицеты высших растений и их экологическая роль в круговороте ¹³⁷Cs в биогеоценозах сфагновых болот Украинского Полесья // Прикладная радиоэкология леса. – Житомир: Полісся, 2007. – С. 359–412.
4. Курченко І.М., Соколова О.В., Жданова Н.М., Яринчин А.М., Йовенко О.М. Целюлазна і ксиланазна активності фітопатогенних та ендоефітних штамів грибів *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler // Микробиол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 25–30.
5. Курченко І.М., Соколова О.В., Орлов О.О., Юр'єва О.М., Іванюк Т.М. Мікобіота *Quercus robur* L. дібров Житомирської області // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 5. – С. 23–33.
6. Курченко І.М., Соколова О.В., Юр'єва О.М., Жданова Н.М. Целюлазна активність *Ceratocystis* sp. різних трофічних груп // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 6. – С. 27–34.



7. Курченко І.М., Соколова О.В., Юр'єва О.М. Ксиланазна активність фітопатогенних і ендоефітних штамів *Ceratocystis* sp. // Мікробіол. журн. — 2010. — 72, № 5. — С. 8–14.

8. Курченко І.Н., Павличенко А.К., Юр'єва Е.М. Ростовые характеристики штаммов *Fusarium roae* (Peck) Wollenw. и *Penicillium funiculosum* Thom // Микробиол. журн. — 2013. — 75, № 5. — С. 40–44.

9. Методы биохимического исследования растений / Под ред. Н.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, Ленинградское отделение, 1987. — С. 134–135.

10. Методы экспериментальной микологии: Справочник. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.

11. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.

12. Селочник Н.Н. Трахеомикоз дуба // Микол. и фитопатол. — 1998. — 32, № 4. — С. 63–74.

13. Тугай Т.И., Василевская А.И., Артышкова Л.В., Бузарова Е.И., Наконечная Л.Т. Динамика роста и особенности потребления глюкозы некоторыми видами рода *Penicillium*, проявляющими радиоадаптивные свойства // Микол. и фитопатол. — 2010. — 44, № 5. — С. 452–461.

14. de Beer Z.W., Wingfield B.D., Wingfield M.J. The *Ophiostoma piceae* complex in the Southern Hemisphere: a phylogenetic study // Mycol. Res. — 2003. — 107, № 4. — P. 469–476.

15. Dickinson C.H., Boardman F. Physiological studies of some fungi isolated from peat // Trans. Brit. Mycol. Soc. — 1970. — 55, № 2. — P. 293–305.

16. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi / Second edition. — Eching: IHW-Verlag, 2007. — 672 p.

17. Kamgan N.G., Jacobs K., de Beer Z.W., Wingfield M.J., Roux J. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species including three new taxa, associated with wounds on native South African trees // Fungal Diversity. — 2008. — V. 29. — P. 37–59.

18. Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites // Chemistry & Biology. — 2012. — 19, N 7. — P. 792–798.

19. Thomma B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite // Molecular Plant Pathology. — 2003. — 4, № 4. — P. 225–236.

Стаття надійшла до редакції 04.05.2013 р.

