

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного

На правах рукопису

РУСОВА
Олена Миколаївна

**БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ МЕТАБОЛІТИ
VERTICILLIUM LECANII ZIMM. (VIEGAS):
СПЕКТР ДІЇ ТА КРИТЕРІЇ ВІДБОРУ
ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ**

03.00.07 — мікробіологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук
О. М. ЗАЙЧЕНКО

Київ — 1994

Ав 30.596

Робота виконана у відділі фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України та у відділі мікробіометоду Інституту біометодів захисту рослин АН Молдови.

Науковий керівник:

доктор біологічних наук **О. М. Зайченко**

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук **Е. З. Коваль**

кандидат біологічних наук **Л. М. Яковлева**

Провідна організація:

Київський державний університет ім. Т. Г. Шевченка

Захист дисертації відбудеться «21» вересня 1994 р. о 10.00 год. на засіданні спеціалізованої ради Д 016.06.01 при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Автореферат розісланий «1» серпня 1994 р.

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00754098 (X)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

Л. М. Пуріш

Актуальність проблеми. Інтенсивне використання засобів хімічного захисту рослин в останні десятиріччя супроводжувалось низкою побічних впливів, які поставили під загрозу не лише чистоту довкілля і здоров'я людини, але й саме виживання людства. Поруч з цим поява резистентних до цих речовин форм шкідників зробила багато з них не ефективними.

В зв'язку з викладеним, в контролі врожаю все більшого значення набувають біологічні методи, що базуються на використанні антагоністичних відносин в агроценозах.

Ентомопатогенний гриб *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viçgas з успіхом застосовувався в Радянському Союзі А.А.Свляховою в 1938-1944 рр. для боротьби з червцями на цитрусових культурах. Подальше вивчення дозволило з'ясувати, що поряд з цитівками і червцями він уражує деякі види попелиць, а також представників ряду дусокрилик та жорсткокрилик.

Однак, найбільший інтерес гриб викликає як патоген шкідливих овочевих культур закритого ґрунту. Успіхи в цій області досягнуті завдяки зусиллям багатьох дослідників і пов'язані головним чином з роботами Соловей (1980); Беглярова (1985); Павлюшина (1986); Горяла (1987); Hall (1976); Drumond et al. (1987); Hirte et al. (1988).

Здатність *V. lecanii* пригнічувати розвиток шкідливих комах слугувала основою для розробки ряду біопрепаратів. На сьогодні в СНД виробляють дві препаративні форми: "Вертицилін зерновий" та "Вертицилін-К". В Великобританії з 1981 року виробляються препарати "Верталек" та "Мікотал", які застосовують проти попелиць та оранжерейної білокрилки. Досягнуті певні успіхи в штучному зараженні личинок та цист фітопатогенних нематод конідіями гриба (Hanszler , 1981; 1990). Поряд з цим, *V. lecanii* відомий і як гіперпаразит на борошнесторосяних (Leeming , 1980; Price , 1988) та ірдастих грибах (Hassebrauk , 1936; Bouriguet , 1939; Pfomer Mendgen , 1979; Spenser , 1980; Sundheim , 1986; Heijwegen , 1988); Shaw, 1988).

Однак, з погляду на досить тривалу історію вивчення та застосування *V. lecanii*, відомостей щодо біологічно активних сполук цього гриба і механізмів їх дії вкрай недостатньо для того, щоб достовірно про це робити висновок. Варто лише вказати на утворення інсектицидних метаболітів контактного типу (Гіндіна та ін., 1990), на здатність *V. lecanii* утворювати геліволеву (Arima ,

1978) та діпіколінову кислоти (Claydon, 1982), а також бацианолід (Suzuki, 1977; Kanaoka, 1978; Murakoshi, 1978). З іншого боку, в літературі відсутні відомості щодо впливу токсичних речовин V. lecanii на фітопатогенні гриби та бактерії, за винятком гелволевої кислоти, яка пригнічує ріст грамполозитивних бактерій. Більшість авторів вважає, що метаболіти V. lecanii не проявляють фітотоксичної активності. Лише окремі дослідники вказували на шкідливий вплив гриба на рослини при використанні його для боротьби з комахами та фітопатогенами (Schans, 1982; Heijweggen, 1988). Однак, ці дані не знайшли підтвердження в подальших експериментах.

В зв'язку з викладеним, вкрай цікаво і практично важливо прослідкувати вплив біологічно активних сполук V. lecanii на компоненти системи "рослина-комах-фітопатоген".

Мета і завдання роботи. Метою даної роботи було виділення біологічно активних сполук V. lecanii, вивчення їх властивостей та активності щодо деяких фітопатогенних грибів і бактерій, нематод, комах, рослин. На базі одержаних даних передбачалось оцінити можливу роль цих метаболітів в складній системі взаємовідносин "рослина-комах-фітопатоген".

Досягнення поставленої мети передбачало вирішення ряду конкретних завдань, зокрема:

- виділити та ідентифікувати культури V. lecanii;
- на основі порівняльного вивчення деяких морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних і токсигенних властивостей виділених штамів здійснити їх групування, а також виявити можливі кореляційні зв'язки;
- відібрати найбільш активні штами, вивчити їх здатність до синтезу мікотоксинів;
- відпрацювати методи виділення та очищення біологічно активних сполук V. lecanii, оцінити спектр їх дії.

Поряд з цим, було виконано ряд досліджень, постановка яких була обумовлена ходом виконання даної роботи, а саме:

- відпрацювання умов біосинтезу активних метаболітів, а також вивчення деяких аспектів біохімічного механізму їх дії.

Основні положення, які виносяться на захист. В результаті виконання поставлених завдань було відпрацьовано ряд положень, основні з яких виносяться на захист:

1. Існує кореляційна залежність між антибіотичною активністю, морфолого-культуральними властивостями та активністю гідролітичних ферментів штамів *V. lecanii*.

2. Метаболіти *V. lecanii*, поряд з інсектицидними, проявляють антибіотичні, фітотоксичні та нематодцидні властивості.

3. Для досліджуваних штамів характерний ідентичний якісний склад активних метаболітів. Відмінності, що мають місце, носять кількісний характер.

4. Метаболіти *V. lecanii* мають здатність пригнічувати синтез білка та нуклеїнових кислот, що визначає широкий спектр їх біологічної дії.

Наукова новизна роботи може бути охарактеризована так:

- вперше виявлена здатність метаболітів *V. lecanii* пригнічувати ріст фітопатогенних бактерій і грибів; для значного числа штамів (189) в порівняльному розрізі наводяться дані щодо морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних і токсигенних властивостей. Встановлений кореляційний зв'язок антибіотичної активності з морфолого-культуральними ознаками та активністю гідролітичних ферментів штамів *V. lecanii*;

- відпрацьовані методи виділення та очистки біологічно активних речовин *V. lecanii*; з фільтратів культуральної рідини і міцелію 15 штамів виділені раніше не відомі токсичні метаболіти, активні щодо комах, нематод, фітопатогенних грибів та бактерій;

- виявлені відмінності в кількісному вмісті активних компонентів в екстрактах з культуральних фільтратів та міцелію штамів Р 26, 9/9Т і 168 при їх якісній спорідненості. Встановлено, що антибіотична активність визначається переважним вмістом компонентів в антифунгальному (Rf 0,60; 0,56; 0,50, в системі толуол:діетиловий ефір:ацетон (5:81:14), або ж антибактеріальному (Rf 0,65; 0,53; 0,44) дію.

- показано, що метаболіти *V. lecanii* мають фітотоксичну дію, яка проявляється в пригніченні синтезу хлорофілів а і в та каротиноїдів *Chlorella vulgaris* 62 токсином в концентрації 0,25 мкг/мл при культивуванні в умовах освітлення і 2 мкг/мл - в темновому режимі;

- вивчена дія токсинів *V. lecanii* на синтез білка і нуклеїнових кислот в клітинах *Chl. vulgaris* 62, *F. solani* 2/316 та *Cl. michiganense* 13. Встановлені відмінності в концентраціях токсину, які викликають подібний пригнічуючий ефект в досліджуваних системах.

Практичне значення роботи. Вивчення токсигенного потенціалу *V. lecanii* розширює можливості його практичного використання в захисті рослин від шкідників та хвороб шляхом створення препаратів на основі штамів, які мають комплексну дію щодо комах, нематод та фітопатогенних мікроорганізмів, а також виключає використання штамів з фітотоксичною дією.

Критерії відбору штамів-продуцентів біологічно активних речовин, розроблені на основі аналізу кореляційних зв'язків токсигенних властивостей з морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними можуть бути використані при скринінгу перспективних штамів.

Оптимізація синтезу активних метаболітів, а також розробка методів виділення та очистки спрямовані на одержання нових форм біопрепаратів на основі *V. lecanii*.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на 2-му Симпозіумі країн - членів РЕВ (Протвино, 1990), на 2-ій Республіканській конференції «Мікробіологія в сільському господарстві» (Кишинів, 1991), на 1-му Українському мікробіологічному з'їзді (Одеса, 1993).

Публікація результатів досліджень. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 друкованих праць.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини, що включає 3 глави, висновків та списку цитованої літератури.

Робота викладена на 203 сторінках машинописного тексту, включає 22 таблиці, 31 малюнок, а також бібліографічний покажчик з 292 джерел, в тому числі 247 робіт закордонних авторів.

ЗМІСТ РОБОТИ

Глава I. Біологія *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas (огляд літератури)

В даній главі, що включає 9 розділів, наведені відомості щодо історії відкриття досліджуваного ентомопатогена, систематиці, морфології, поширенню в природі, вимог до умов середовища та джерел живлення. Розглянуті механізми патогенезу комах та гіперпаразитизму. Наводяться дані щодо біопрепаратів. Підкреслюється брак відомостей про біологічно активні сполуки та їх участі в патологічному процесі.

Глава 2. Матеріали та методи досліджень

Об'єкти досліджень. Всього досліджено 189 штамів *V. lesanii*. Виділення та ідентифікація переважною більшістю культур проводились в Інституті біометодів захисту рослин АН Молдови ст. науковим співробітником О.Ф.Соловей за намоу участю. Окремі штами були надані в наше розпорядження з колекцій культур Англії, Польщі, Румунії, Угорщини. Досліджувані штами були виділені з личинок оранжерейної білокрилки, баштанної попелиці, червця та щитівки в різних регіонах (Кишинів, Ужгород, Сочі, Владивосток). Як тест-об'єкти при вивченні антибіотичної активності мікотоксинів використовували фітопатогенні гриби та бактерії, сапрофітні дріжджі, список яких наведений в таблиці 1.

Ці мікроорганізми були надані в наше розпорядження з відділу фітопатогенних бактерій ІМВ АНУ старшими науковими співробітниками В.О.Мурас та О.П.Коробко, з музею відділу фізіології та систематики мікроміцетів - ст. науковим співробітником І.О.Бланською та відділу фізіології промислових мікроорганізмів - ст. науковим співробітником С.С.Нагорною.

Про фітотоксичну активність судили на основі здатності метаболітів пригнічувати ріст *Chl. vulgaris* 62.

Нематицидну дію вивчали на личинках *Meloidogyna incognita* та сапробіонтах, а інсектицидну активність досліджували на личинках перської попелиці (*Muzus persicae*) та оранжерейної білокрилки (*Trialeurodes vaporariorum*).

Методи культивування. Досліджувані штами мікроміцетів, в залежності від поставленої мети культивували поверхневим або глибинним способом. Гриби вирощували на середовищі з кукурудзяним екстрактом, рН 4,5. Як джерело вуглецю використовували сахарозу (30 г/л) та крохмаль (20 г/л). Засів проводили стандартною суспензією конідій 2-тижневого віку. Густина засіву 5×10^6 клітин/мл, температура 24-26°C. Для вивчення морфолого-культуральних особливостей штамів гриби вирощували поверхневим способом як на рідкому, так і на твердому живильних середовищах: суловому агарі та агаризованному середовищі Чапека. Культури описували згідно рекомендацій (Андріюк та ін., 1980).

Вивчення біологічної активності. Досліджували антибіотичну дію культуральних фільтратів (К2) 189 штамів *V. lesanii*, антибіотичну та фітотоксичну дію метаболітів, виділених з 15 штамів

Таблиця I.

Список досліджуваних штамів тест-мікроорганізмів

№ п/п	В и д	Штам
1	<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i> Davis, Gillaspie, Vidaver, Harris 1984	13
2	<i>C. michiganense</i> subsp. <i>sepedonicum</i> Davis. Gillaspie, Vidaver, Harris 1984	7755
3	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Pammel 1895) Dowson 1939	820
4	<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> (Smith 1801) Dye 1978	8838
5	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (Burkholder 1926) Young et al. 1978	8633
6	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> (Smith and Bryan 1915) Young et al. 1978	40
7	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> (Jones 1901) Dye 1968	9068
8	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Jones 1901) Dye 1968	8982
9	<i>E. toxica</i> Korobko 1973	8418
10	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Smith et Townsend 1907) Conn 1942	
11	<i>Bacillus</i> sp.	
12	<i>Candida kefyr</i>	44
13	<i>Myrothecium roridum</i> Tode	BKMF 832
14	<i>Drechslera teres</i> (Sacc.) Shoem. Ito	109828
15	<i>Fusarium sporotrichiella</i> Bilal	53115
16	<i>F. moniliforme</i> Sheld	54262
17	<i>F. graminearum</i> Schwabe	673
18	<i>F. solani</i> (Mart.) App. et Wr.	2/315
19	<i>F. macroceras</i> Wr. et Rg.	578A
20	<i>F. oxysporum</i> (Schlecht.) Snyder et Hans	55715
21	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	108815

з найбільшою активністю щодо різних фітопатогенів. В подальших експериментах використовували токсичні екстракти штамів Р 26 та 9/9Т. Виячали їх дію на нематод та комах, відмічали пригнічуючу дію на листя томатів. Для оцінки антибіотичної і фітотоксичної активності застосовували методи дисків та лунок (Методи експериментальної мікології, 1982). Нематицидну дію екстрактів вивчали ліжковим методом (Тимченко, 198). Використовували 4 концентрації токсину, виділеного з КФ штаму 9/9Т, (%): 0,2; 0,3; 0,4 та 0,8. Дослідження інсектицидної активності проводили згідно методу Гіндіної та ін. (1990). Використовували 1% водні розчини екстрактів з КФ та міцелію штамів Р 26 і 9/9Т.

Біохімічні методи аналізу. Поряд з вивченням морфолого-культуральних властивостей штамів досліджували деякі їх фізіолого-біохімічні характеристики, а саме активність таких гідролітичних ферментів як целюлаза, ксиланаза, пектиназа, хітиназа, протеаза. Поряд з цим, вивчали дію токсичних метаболітів на фотосинтезуючі пігменти хлорелли, а також синтез ДНК, РНК та білка у деяких фітопатогенних мікроорганізмів та хлорелли.

Активність ксиланази, що утворюється в культурі грибів, досліджували методом агарових блоків (Dingle et al. , 1953). Для виявлення активності пектино- та хітинолітичних ферментів гриби висівали в чашки Петрі на агаризовані живильні середовища, які містили пектин або хітин як єдине джерело вуглецю.

Активність целюлозолітичних ферментів оцінювали за характером росту гриба в пробірках з рідким середовищем Чапека без вуглеводів з стрічкою фільтрувального паперу (Методи експериментальної мікології, 1982). Для вивчення протеолітичної активності використовували желатину. Як субстрати для виявлення активності ферментів використовували:

1. Ксилан з вівса: 0,5% в фосфатному буфері; агар - 2%; рН 7,1 - для виявлення ксиланазної активності.
2. Цитрусовий пектин (" Serva ", США); 0,5% в мінеральному середовищі Чапека - для виявлення пектиназної активності.
3. Колоїдний хітин (Кузнецова, Янгулова, 1970) в агаризованому середовищі для грибів (Hankin, Anagnostakiy , 1975) без додавання дріждйового екстракту. Хітин готували згідно методу Reynolds et al. (1954) в модифікації Інституту органічної хімії РАН (1961)
4. Фільтрувальний папір в голлодному середовищі Чапека (Методи експериментальної мікології, 1982).

5. Желатина, рН 7,0 (Методи експериментальної мікології (1982).

Для вивчення дії токсичних метаболітів на фотосинтезуючі пігменти хлорелли вирощували глибинним способом на качалці (160 об/хв) при температурі 24°C і освітленості 4000 лк (Zaichenko et al. (1989) в колбах Ерленмейєра на 100 мл, які містили 40 мл середовища без джерела вуглецю. У випадку культивування хлорелли в темновому режимі в середовище додавали пептон і глюкозу. Густина засіву $1,2 \times 10^7$ клітин/мл. Кінцева концентрація спирту в досліджуваних системах не перевищувала 0,05%. Досліджували 5 концентрацій токсину, виділеного з міцелію штаму 9/9T, (мкг/мл): 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 і 5,0. Досліджувані пігменти (хлорофіли а і в, каротиноїди) екстрагували абсолютним ацетоном, а їх вміст в клітинах хлорелли розраховували за рівняннями, складеними на основі експериментально одержаних питомих коефіцієнтів Хольма-Веттштейна (Методи біохімічного аналізу рослин, 1978) з використанням спектрофотометра "Beckman" "DU - 8B (Австрія).

Про пригнічення синтезу білка та нуклеїнових кислот токсинами *V. lecanii* судили на підставі даних щодо включення мічених попередників - ^3H -лейцину (40, MBq, 1080 мкCi) /"ізоотоп", С.- Петербург/ та ^{14}C -аденіну (40,63 MBq, 1097 мкCi) /МТА Ізоотоп Інтер-зете, Будапешт / в макромолекули (Рязанова та ін., 1982).

Досліджувані діючі концентрації мікотоксинів відпрацьовували в попередніх дослідях для кожної з систем і становили вони для *chl. vulgaris* 62 - 0,25; 0,5; 1,0 і 2,0 мкг/мл; для *F. solani* - 5; 10; 25 і 50 мкг/мл та для *cl. michiganense* 13 - 50, 100, 200 і 500 мкг/мл. Радіоактивність вимірювали за допомогою рідинного сцинтиляційного спектрометра "Beckman" (Австрія).

Глава 3. Порівняльна характеристика морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та токсигенних властивостей штамів

Вивчення антибіотичних властивостей метаболітів *V. lecanii* до останнього часу не було предметом спеціальних досліджень. В літературі відсутні відомості щодо ролі токсинів в процесі ураження грибів, на яких паразитує *V. lecanii*. Проте активність останнього щодо грибів і бактерій викликає особливий інтерес. Включений в складну систему взаємовідносин "рослина-комаха-фітопатоген" ентомопатоген, що є одночасно гіперпаразитом, може відігравати важливу роль в захисті рослини-хазяїна як від шкідників, так і від хвороб.

В дослідженнях такого плану важливо виявити можливі кореляційні зв'язки антибіотичної активності з морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями.

В умовах стаціонарного культивування на рідкому живильному середовищі у 189 штамів грибів вивчали зміну рН середовища до кінця ферментації (12 діб), вихід біомаси, проводили оцінку їх антибіотичних властивостей щодо фітопатогенних мікроорганізмів.

Було показано, що культуральні фільтрати 116-ти штамів *V. lecanii* пригнічували ріст вивчених фітопатогенів, за винятком *Agrobacterium tumefaciens* і *F. sporotrichiella* 53115.

Найбільш чутливим до метаболітів *V. lecanii* з фітопатогенних бактерій виявились: *C1. veredonicum* 7755 - збудник кільцевої гнилі картоплі, *E. carotovora* sub. sp. *atroseptica* 9068 - збудник гнилей овочевих культур і *P. lachrymans* 40, який викликає кутову плямистість огірків. Серед фітопатогенних грибів найбільш чутливими були *F. solani* 2/315, що викликає гнилі бобових та овочевих культур, а також *F. macrospora* 579 A і *F. moniliforme* 54262 - збудники рожевої цвіль алакових. Заслужовує на увагу та обставина, що ізоляти *V. lecanii* з оранжерейної біокрылки, яка паразитує на огірках і томатах, адатні пригнічувати ріст бактеріальних та грибних патогенів цих рослин (*P. lachrymans* 40, *C1. michiganense* 13, *F. solani* 2/315).

Як за морфолого-культуральними, так і фізіолого-біохімічними властивостями досліджена популяція грибів виявилась досить гетерогенною.

Для математичної обробки експериментальних даних використовували методи числової таксономії (Бейлі, 1970). Експериментально одержані ознаки були розбиті на 6 груп: 1-ша група об'єднувала кількісні ознаки, що характеризують антибіотичну активність щодо фітопатогенних грибів і бактерій; 2-га група об'єднувала кількісні ознаки, що характеризують інтенсивність спороношення, біомасу, розміри колоній, довжину конідій і рН середовища культивування; 3-тя група об'єднувала якісні морфолого-культуральні ознаки *V. lecanii* при рості на рідкому живильному середовищі; 4-та група об'єднувала якісні морфолого-культуральні ознаки штамів при їх рості на агаризованому середовищі Чапека; 5-та група об'єднувала якісні морфологічні ознаки, що характеризують будову та просторове розташування репродуктивних органів; 6-та група об'єднувала кількісні ознаки, що характеризують активність гідролітичних ферментів.

Подібність штамів оцінювали методом показників відстаней. Кожному штаму був поставлений у відповідність вектор в n -мірному евклідовому просторі, де n - кількість ознак штамів.

Таким чином, подібність між штамми визначали як відстань між векторами.

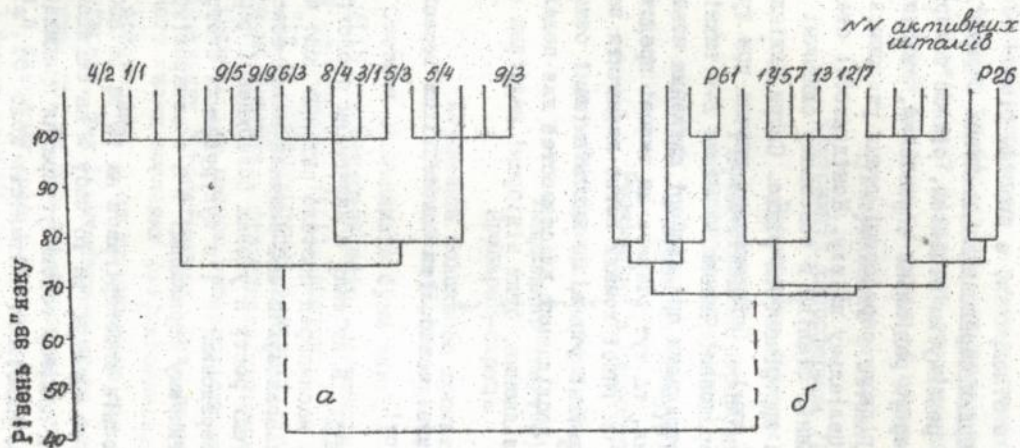
Результати обробки на ЕОМ представлені у вигляді таблиць рівнів зв'язку, за якими будувались дендрограми, що дають наочне уявлення про ієрархічну структуру.

При аналізі дендрограм виявилось, що штами з антибактеріальною та антифунгальною активностями утворювали різні кластери в усіх шести групах ознак. При цьому, з 9 штамів (А ІГ, А І, С 7І, Р - 26, ІУ 57, ІІ, ІЗ, І2/7, Р 6І), найбільш активних щодо бактерій, 5 виявилось в одному кластері в 2-ій (С 7І, ІУ 57, ІІ, ІЗ, І2/7), 4-ій (С 7І, ІУ 57, ІІ, ІЗ, І2/7), 5-ій (Р 26, ІУ 57, ІЗ, І2/7, Р 6І) і 6-ій (С 7І, Р 26, ІУ 57, ІЗ, І2/7) групах і 6 (С 7І, Р 26, ІУ 57, ІЗ, І2/7, Р 6І) - в третій групі ознак. З 16-ти штамів з антифунгальною активністю (8І, І/5, 2/7, 3/3, 3/ІЗ, І/ІТ, 3/ІТ, 4/2Т, 5/3Т, 5/4Т, 6/3Т, 8/4Т, 9/3Т, 9/5Т, 9/9Т, І0/5Т) в одному кластері виявляється 8 штамів в третій групі (3/3, І/ІТ, 3/ІТ, 5/4Т, 8/4Т, 9/3Т, 9/9Т, І0/5Т), 7 в четвертій (5/3Т, 6/3Т, 8/4Т, 9/3Т, 9/5Т, 9/9Т, І0/5Т), І0 - в п'ятій (І/ІТ, 3/ІТ, 4/2Т, 5/3Т, 5/4Т, 6/3Т, 8/4Т, 9/3Т, 9/5Т, 9/9Т) і 9 - в шостій (3/3, І/ІТ, 3/ІТ, 5/3Т, 5/4Т, 6/3Т, 8/4Т, 9/3Т, 9/5Т).

Рівень зв'язку, на якому формувались кластери, в усіх випадках перевищує 68%, за винятком шостої групи (56%) для штамів з антибактеріальною активністю.

Таким чином, встановлена позитивна кореляція між антибіотичною активністю штамів, морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями. На мал. І наведені фрагменти дендрограми, побудованої на основі подібності між штамми за п'ятью групами ознак.

Узагальнюючи наведене вище, ми дійшли висновку, що пошук штамів з антифунгальною активністю слід здійснювати серед ізолятів, виділених з попелиць, які мають такі властивості: не проявляють активності гідролітичних ферментів, або з проявляють її в незначній мірі; на твердому середовищі формують виступачі в субстрат колонії білого та сіруватого забарвлення з слабо розвинутим міцелієм, оксамитовою структурою, складчатою поверхнею, війчастим краєм; реверзум паливий, радіально окреслений; на рідкому середовищі утворюють тонку складчасту поверхневу плівку з оксамитовою текстурою; можливе зня-



Мал. 1. Дендрограма подібності за морфологічними ознаками штамів, активних щодо грибів (а) та бактерій (б).

но-червоне забарвлення реверсаума. В світловому мікроскопі розрізняють прямостоячі моноподіально розгалужені конідіеносці, фіаліди переважно зібрані в мутовки. Зустрічається також супротивне та одиначне розміщення, міжвузля більші або ж дорівнюють довжині фіалід. Спори циліндричні: середні (5,4 - 6,1 мкм) і великі (6,3 - 7,6 мкм), спороношення значне.

Для виявлення антибактеріальної активності, навпаки, слід використовувати штами, виділені з білокрилки, з високим рівнем ферментативної активності. На твердих середовищах ці штами формують білі пухнасті колонії з добре розвинутим міцелієм, рівною поверхнею і розгалуженим краєм. Реверсаум радіально окреслений, палевого чи охристого забарвлення. На рідкому середовищі штами утворюють складчасту товсту пухнасту міцеліальну плівку. Конідіеносці стеються, переважно не розгалужені, фіаліди в основному одиночні і супротивно розміщені. Мувки зустрічаються рідко. Спори циліндричної форми, дрібні (3,4 - 4,6 мкм). Спороношення значне при культивуванні на агаризованому середовищі Чапека не менше 2-х тижнів.

Ці критерії слід використовувати при відборі активних штамів. Що стосується джерел виділення, то тут існують як типові представники, належність яких до тої чи іншої комахи легко визначити за рядом ознак, так і численні проміжні форми, що мають змішані ознаки.

З врахуванням комплексу досліджених властивостей для подальшого, більш поглибленого дослідження, були відібрані найбільш активні штами.

Глава 4. Біологічно активні метаболіти *Verticillium lecanii* та їх властивості

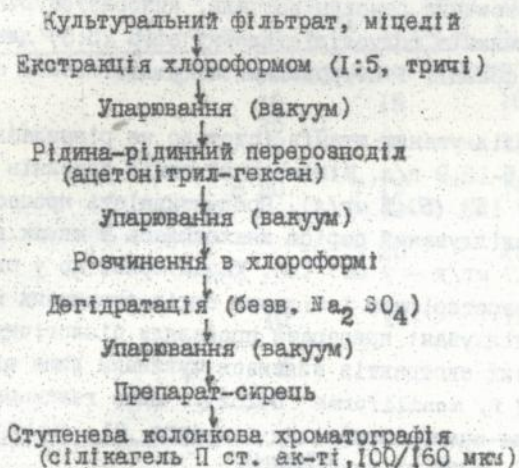
Динаміка токсинутворення. В зв'язку з вивченням біологічно активних сполук *V. lecanii* насамперед постало питання щодо вибору препарату для досліджень. Враховуючи це, вивчали зміст токсичних метаболітів в різні періоди росту в умовах поверхневої ферментації на двох середовищах: середовищі № 1 з кукурудзяним екстрактом та основному напісінтетичному середовищі № 2 з аспарагіном як джерелом азоту.

Максимальний вихід токсинів спостерігався на 10 та 16 добу вирощування на середовищі № 1 та на 6, 10 та 16 добу - на середовищі № 2. Максимум продуктивності процесу токсинутворення припадає на 6-10 добу на середовищі № 1. Найбільша активність щодо *Cl. macleodense* 13 буда характерна для позаклітинних метаболітів на 14 добу культивування на середовищі № 1 і з 10 до 14-ї доби - на середовищі № 2.

Піки активності міцеліальних екстрактів з середовища № 2 реєструвались на 6 та 10 добу вирощування гриба. На середовищі № 1 їх активність з 6 до 16 доби істотно не змінювалась (23-25 мм); максимальне значення спостерігалось на 8 та 12 добу.

В зв'язку з викладеним, подальші дослідження проводили з препаратами, одержаними на 12 добу культивування на середовищі № 1, з врахуванням того, що це середовище забезпечує значно більший вихід токсину порівняно з альтернативним.

Виділення біологічно активних сполук. Для цього використовували культуральні фільтрати та міцелій трьох штамів (Р 26, 9/9Т та 168). Нижче наводиться загальна схема виділення:



Системи розчинників були такі: н-гексан, н-гексан:діетиловий ефір (1:3), діетиловий ефір, діетиловий ефір:ацетон (4:1), діетиловий ефір:ацетон (1:1), ацетон.

Дія на фітопатогенні бактерії і гриби. В главі 3 ми вже вказували на здатність фільтратів культуральної рідини ряду штамів V. lecanii з певною вибірковістю пригнічувати ріст грибних та бактеріальних фітопатогенів. Так, деякі з них пригнічували ріст значного числа вивчених фітопатогенів, інші - лише окремих або навіть поодиноких. В одних випадках для них була характерною як антифунгальна, так і антибактеріальна активність, з інших - або та, або інша, що, як нам здається, може бути пов'язане з відмінностями як в якісному, так і кількісному складі активних компонентів.

З метою одержати відповідь на це питання, а також інші і була започаткована постановка цього дослідження, яке відличає порів-

няльне вивчення накопичення біомаси, виходу токсинів та продуктивності процесу токсинування, а також біологічної активності екстрактів з фільтратів культуральної рідини і міцелію найбільш активних штамів.

В роботі було використано 15 штамів *V. tescani*, виділених з тепличної білокрилки (Р 26, II, II2, II6, I24, I53, I62, I68, I82, I93, I95, I96) та баштанної попелиці (А I, 5/3Т, 9/9Т).

З хлороформних екстрактів фільтратів культуральної рідини і міцелію одержували ацетонітрильну та гексанову фракції і використовували їх для біологічних та хроматографічних досліджень. Компонентний склад токсичних речовин вивчали, використовуючи метод ТЛХ в системах розчинників толуол:діетиловий ефір (5:6) для речовин ацетонітрильної фракції і петролейний ефір:діетиловий ефір (7:3) - для гексанової.

Біомаса досліджуваних штамів істотно не різнилась і коливалась в межах 14,5-16,9 г/л. Мінімальний вихід токсинів був характерний для штаму I53 (50,5 мг/л). Продуктивність процесу токсинування за досліджуваний період знаходилась в межах від 3,3 мг/г у шт. I53 до 10,7 мг/г - у шт. I68. Характерно, що у штамів з більшою біомасою спостерігали і більший вихід токсичних метаболітів.

Не всі досліджувані препарати проявляли біологічну активність. Так, до гексанових екстрактів виявився чутливим лише один з досліджуваних штамів (*F. moniliforme* 54262). Лише гексанова фракція шт. Р 26 виявляла антибактеріальну дію щодо *Cl. michiganense* I3, *Cl. sporadicum* 7755 та *Bacillus* sp.

Дані щодо токсичності ацетонітрильних фракцій наведені в табл. 2, з якої видно, що найбільшу активність виявляють екстракти з міцелію та культуральних фільтратів штамів А I, Р 26, II, 9/9Т, I24, I68 і міцеліальний екстракт штаму 5/3Т. При цьому, шт. Р 26 виявляв виключно антибактеріальну дію, шт. 9/9Т - як антибактеріальну, так і антифунгальну, а штами А I, II, I24 та I68 - переважно антифунгальну і зовсім незначну антибактеріальну дію. При цьому, антифунгальна активність корелювала з фітотоксичною. Слабо виражена активність щодо обмеженого числа фітопатогенів відмічалась також у штамів II2, II6, I62, I68 та I96. Штами I53, I82 та I95 виявились не активними.

Наші припущення відносно того, що дія на різні групи фітопатогенів пов'язана з різними сполуками, були згодом підтверджені даними хроматографічних та біоавтографічних досліджень.

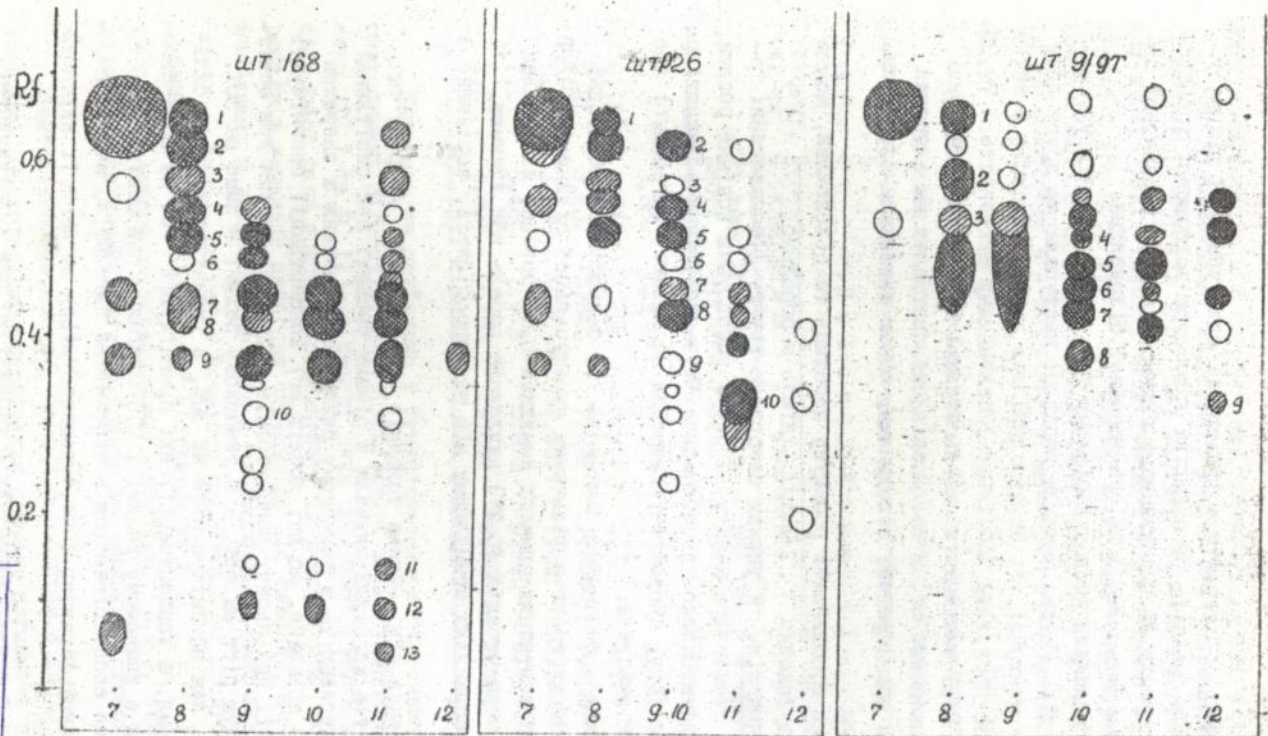
Вивчення компонентного складу комплексних препаратів. Препарат-сирець розділяли за допомогою ступеневої кслонкової хроматографії. Як стаціонарну фазу використовували сілікагель (II ступеню активності по Брокману, 100/160 мкм). Системи розчинників були такими: Н-гексан, н-гексан:діетиловий ефір (1:3), діетиловий ефір, діетиловий ефір:ацетон (9:1), діетиловий ефір:ацетон (4:1), діетиловий ефір:ацетон (1:1), ацетон. Вихід речовин з колонки контролювали за вмістом сухої маси в фракціях після їх упарювання, за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках "Silufol" UV 254 (Kavallier, Чехія), використовуючи системи розчинників толуол:діетиловий ефір (5:6) та толуол:діетиловий ефір:ацетон (5:8:14) з наступним біоавтографічним проявленням, а також за допомогою біотестів на антифунгальну, антибактеріальну та фітотоксичну активності щодо *F. solani* 2/315, *Cl. michiganense* 13 і *Chl. vulgaris* 62, відповідно.

Про активність фракцій судили на підставі виміру діаметру стерильних зон навкруг паперових дисків, просочених 1%-ним спиртовим розчином досліджуваної речовини. Візуалізацію плям на ТЛХ-пластинках здійснювали шляхом обробки їх 10% розчином фосфорно-молібденової кислоти (ФМК) в етанолі і витримки на протязі 5 хвилин при 105°⁰. Поряд з цим, здійснювали УФ-детекцію компонентів.

Результати хроматографічного дослідження активних фракцій представлені на мал. 2. Очевидно, що одноіменні фракції токсичних метаболітів штамів Р 26 та 168 містять одні й ті ж компоненти, за винятком 3-х високополярних речовин в нижній частині хроматограми шт. 168. Деяко іншу картину має хроматограма метаболітів шт. 9/9Т, тим не менше, і тут ми виявляємо ті ж компоненти.

Для виявлення активних речовин використовували метод біоавтографічного проявлення хроматограм. Результати дослідів показали, що антибактеріальну дію мають компоненти з Rf 0,65; 0,53; 0,44, а антифунгальну дію - компоненти з Rf 0,60; 0,56 та 0,50. Речовина з Rf 0,65 одержана в кристалічному вигляді.

Препарати з фільтратів культуральної рідини і міцелію 3-х штамів істотно різнилися за кількісним вмістом окремих компонентів з різною біологічною дією. Це дозволяє нам стверджувати, що активність штамів щодо грибів і бактерій пов'язана з різними компонентами і залежить від їх кількісного вмісту в комплексному препараті, що, можливо, є специфічним для кожного з штамів.



Значення R_f в системі толуол-екстр-ацетон (5:81:14) ли фракції
 1-0,70; 2-0,65; 3-0,60; 4-0,56; 5-0,53; 6-0,50; 7-0,47; 8-0,44; 9-0,38; 10-0,35; 11-0,15; 12-0,11; 13-0,06

Мал. 2. Схема хроматографічного розподілу біологічно активних фракцій трьох штамів *U. vesanii*

Дія на комах. Екстракти з фільтратів культуральної рідини і міцелію, а також фракції, одержані за допомогою колонкової хроматографії, досліджували на інсектицидну активність щодо персикової попелиці (*Myzodes persicae*) та оранжерейної білокрилки.

Фракції проявляли антибактеріальну (шт. Р 26) та антифунгальну (шт. 9/9Т) дію. Гибель личинок попелиці наступала на другу добу в той час як в контролі всі комахи лишались живими. Фракція з антифунгальною дією проявляла найбільшу інсектицидну активність - 78,9%. Токсин(и) шт. 9/9Т викликають гибель більшої кількості тест-комах порівняно з токсинами шт. Р 26. Досліджені екстракти не виявляли дії на личинки оранжерейної білокрилки, однак викликали хлороз листків томатів.

Враховуючи особливості розвитку попелиць та білокрилки, можна припустити, що токсини *V. lecanii* діють перорально.

Нематицидна дія. В умовах закритого ґрунту фітопатогенні галові нематоди становлять велику загрозу, ушкоджуючи коріння рослин, і препарат з нематицидною дією знайшов би застосування в захисті рослин. З іншого боку, сапрофітні нематоди не являють загрози, і дія токсину на них небезпечна.

На личинках *Meloidogyna incognita* та сапрофітних нематодах був досліджений екстракт з фільтрату культуральної рідини шт. 9/9Т. 100% гибель паразитичних нематод викликав 0,8% розчин; мінімальна досліджувана концентрація (0,2%) викликала гибель 25% личинок *M. incognita* і справляла стимулюючу дію на сапробіонтів, порівняно з контролем.

Фітотоксична дія. Вплив токсинів *V. lecanii* на ріст та синтез пігментів хлорелли вивчали в різних умовах: при освітленні без джерела вуглецю та в темновому режимі вирощування з джерелом вуглецю. Було показано, що всі досліджені концентрації пригнічують ріст водорості. При цьому, концентрація токсину 1 мкг/мл при освітленні пригнічує ріст на 65%, а в темновому режимі - лише на 30%. Концентрація, яка пригнічує ріст на 30%, в умовах освітлення складала 0,6 мкг/мл, а концентрації, які пригнічують ріст на 50%, складала 4 мкг/мл в темновому режимі і 0,8 мкг/мл - при освітленні.

Зміни, що спостерігаються в біосинтезі пігментів, носять переважно кількісний характер і не супроводжуються змінами їх якісного складу.

Як видно з даних, наведених в таблиці 3, при культивуванні хлорелли в темновому режимі токсини *V. lecanii* справляють стимулюючу дію на синтез пігментів в межах концентрацій 0,125 - 1,0 мкг/мл.

Лише концентрація в 2 мкг/мл дещо пригнічує синтез пігментів.

При культивуванні хлорелли в умовах освітлення без джерела вуглецю спостерігали дещо іншу картину. Мінімальна з досліджуваних концентрацій токсину стимулювала синтез пігментів, а концентрації 0,25; 0,5; 1,0 і 2,0 мкг/мл справляли пригнічуючу дію. Так, концентрація 2 мкг/мл знижувала вміст хлорофілу а в клітинах до 13,5%, хлорофілу в - до 37,4%, а каротиноїдів - до 14,6%.

Таблиця 3

Вплив токсинів *Verticillium lecanii* 9/9T на синтез хлорофілів та каротиноїдів у *Chlorella vulgaris* 62

Концентрація токсину, мкг/мл	Вміст пігментів, мг/г					
	хлорофіл а		хлорофіл в		каротиноїди	
	в тем-ноті	при освітленні	в тем-ноті	при освітленні	в тем-ноті	при освітленні
0	3,389	5,576	0,954	1,784	2,092	3,414
0,125	3,553	7,268	0,956	2,731	2,171	4,239
0,25	3,937	5,340	1,071	1,766	2,403	3,127
0,5	3,558	4,301	1,001	1,401	2,189	2,687
1,0	3,440	1,973	0,973	0,940	2,125	1,290
2,0	3,332	0,753	0,861	0,667	2,061	0,497

Напевно, це пов'язано з функціональними особливостями фотосинтетичних пігментів, які організовані в дві фотосинтезуючі системи (ФС I та ФС II), в складі яких приймають участь в реакціях світлової фази процесу фотосинтезу. Слід зазначити, що синтез хлорофілу в виявився найбільш стійким до дії токсину, що може бути пов'язано з локалізацією його в хлоропластах. Вважають (Goodwin, Mercer, 1966), що майже повністю хлорофіл в та ксантофіли у вищих рослин і зелених водоростей містяться не в ФС I і ФС II, а входять до складу іншого світлозбираючого комплексу (СЖ), синтез якого відбувається в значно більшій мірі при низькій інтенсивності світла.

Центральною частиною, "ядром" фотосистем є хлорофіл-білковий комплекс. Счевидно, що пригнічення синтезу пігментів пов'язане з порушенням синтезу білка, в зв'язку з чим ми зробили спробу дослідити вплив токсину на функціонування білок-синтезуючої системи хло-

релли.

Деякі аспекти механізму дії метаболітів у *V. lecanii*. Як найбільш вірогідний механізм порушення синтезу пігментів можна розглядати порушення в синтезі білка або ж в енергетичному обміні. Враховуючи це, ми зробили спробу дослідити вплив токсинів у *V. lecanii* на синтез білка та нуклеїнових кислот в модельних системах *Cl. michiganense* 13, *F. solani* 2/315 та *Chl. vulgaris* 62. Як мічені попередники використовували ^3H -лейцин та $2\text{-}^{14}\text{C}$ -аденін.

Було показано, що в усіх досліджених модельних системах спостерігається пригнічення синтезу білка, однак концентрації, що викликають 50% пригнічення, істотно різняться (мал. 3). Так, синтез білка в бактеріальній системі пригнічується в незначній мірі при використанні менших концентрацій, а 50% пригнічення спостерігається при концентрації 200 мкг/мл, в той час як аналогічний ефект в системі *F. solani* викликається концентрацією 10 мкг/мл, а в системі *Chl. vulgaris* - в діапазоні концентрацій 1-2 мкг/мл.

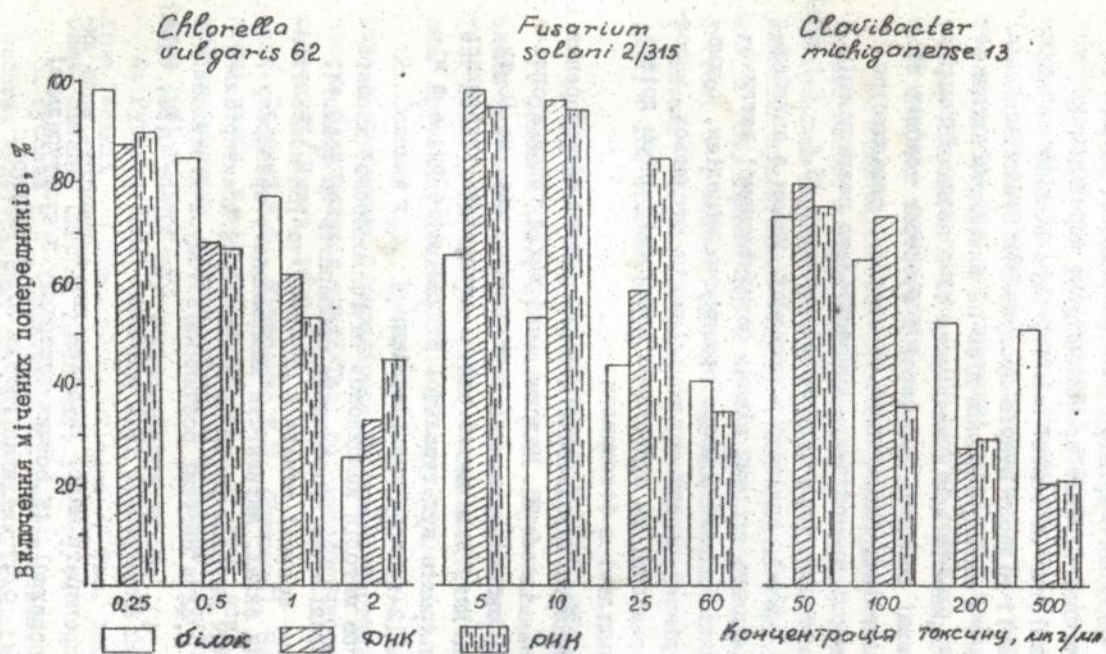
Значний інтерес викликає здатність метаболітів *V. lecanii* пригнічувати синтез білка як в системі прокаріот, так і еукаріот. Різний ступінь пригнічення синтезу нуклеїнових кислот також був характерним для метаболітів *V. lecanii*. Більш чутливим до такої дії виявився синтез ДНК і РНК у *Chl. vulgaris* 62, в той час, як пригнічення синтезу бактеріальних нуклеїнових кислот спостерігається лише при використанні більш високих концентрацій мікотоксинів.

Чутливість синтезу нуклеїнових кислот у *F. solani* 2/315 до метаболітів *V. lecanii* займає проміжне положення.

Рівниця в діючих концентраціях токсичних метаболітів, що викликають подібний пригнічуючий ефект, здається нам досить цікавою в плані їх можливої регуляторної ролі в функціонуванні складних взаємовідносин в системі "рослина-фітопатоген-гіперпаразит", які, напевне, в значній мірі визначаються станом білок-синтезуючих систем.

ВИСНОВКИ

1. В результаті вивчення антибіотичної активності фільтратів культуральної рідини 189-ти штамів *V. lecanii* встановлено, що метаболіти 116-ти штамів пригнічують ріст фітопатогенних бактерій, які належать до родів *Clavibacter*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* і грибів рр. *Myrothecium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Potrytis*.



Мал. 3. Включення мічених попередників в білок, ДНК та РНК
Chl. vulgaris 62, *F. solani* 2/315 і *Cl. michiganense* 13.

2. Досліджені морфолого-культуральні властивості штамів та активність гідролітичних ферментів; встановлена кореляція Іх з антибіотичною активністю. На основі аналізу корелятивних зв'язків запропоновані критерії відбору штамів-продуцентів біологічно активних сполук. Штами з антифунгальною дією не виявляють активності гідролітичних ферментів або ж виявляють її в незначній мірі, на твердому середовищі формують виступаючі в субстрат колонії зі слабо розвинутим міцелієм, оксамитовою текстурою і складчастю поверхнею; конідієносці пряmostоячі, моноподіально розгалужені, фіаліди зібрані в мутовки, спори середньої величини (5,4 - 6,1 мкм) та великі (6,3 - 7,6 мкм); виділені з попеліці. Штами з антибактеріальною дією виявляють високий рівень ферментативної активності, формують випуклі колонії з добре розвинутим міцелієм, пухнастою текстурою та рівною поверхнею; конідієносці стелються, нерозгалужені, фіаліди одиночні та супротивно розміщені, спори дрібні (3,4 - 4,6 мкм); виділені з білокрилки.

3. Вивчена динаміка накопичення біомаси та токсинотворення на прикладі *V. lecanii* P 26. Максимальний вихід токсина спостерігається в кінці експоненціальної фази росту гриба, на 10-ту добу культивування. Найбільша антибіотична активність виявлялась в екстрактах з фільтратів культуральної рідини на 14-ту, а з міцелію - на 8-му та 12-ту добу культивування.

4. За допомогою методів колонкової та тонкошарової хроматографії досягнуто розділення комплексних препаратів на фракції. Показано, що активні фракції штамів P 26, 9/9T та 168 мають ідентичний компонентний склад. Активність комплексного препарату визначається кількісним вмістом речовин, що мають антибактеріальну (Rf 0,65; 0,53; 0,44 в системі розчинників толуол-діетиловий ефір-ацетон (5:81:14), або ж антифунгальну (Rf 0,60; 0,56; 0,50) дію.

5. Виділені препарати мають інсектицидну активність щодо личинок персикової попеліці. 1% розчин екстракту з культуральної рідини *V. lecanii* 9/9T викликає гибель 46,4% личинок.

6. Встановлена нематичидна активність токсинів *V. lecanii*. Препарат з культуральної рідини штаму 9/9T в концентрації 0,8% викликав 100% гибель личинок *Meloidogina incognita*.

7. Токсини *V. lecanii* викликають хлороз листків томатів та обезбарвлення клітин хлорелли. Фітотоксична активність препа-

ратів щодо *Chlorella vulgaris* 62 супроводжується пригніченням росту водорості та амінов вмісту фотосинтетичних пігментів в клітинах хлорелли. Концентрації токсину від 0,125 мкг/мл до 1,0 мкг/мл викликають підвищення вмісту хлорофілів а, в та каротиноїдів в клітинах хлорелли, а концентрація 2,0 мкг/мл пригнічує синтез пігментів при культивуванні хлорелли в темновому режимі. При освітленні концентрація 0,125 мкг/мл справляє стимулюючу дію, а 0,25 мкг/мл - пригнічуючу.

8. Метаболіти *V. lecanii* пригнічують синтез білка і нуклеїнових кислот в модельних системах бактерій, грибів та хлорелли, що визначає широкий спектр їх дії. Концентрації токсинів, які викликають пригнічення синтезу білка і нуклеїнових кислот більше, ніж на 50%, складають: в системі *Chl. vulgaris* 62 - 2 мкг/мл, в системі *F. solani* 2/315 - 25 мкг/мл (білок) і 60 мкг/мл (НК) і в системі *Cl. michiganense* 13 - 500 мкг/мл (білок), 200 мкг/мл (ДНК) і 100 мкг/мл (РНК).

Список робіт, опублікованих по темі дисертації:

1. Соловей Е.Ф., Кучеренко Е.Н. (Руссова). Технологические проблемы получения биопрепарата на основе *Verticillium lecanii* // Тез. докл. II Симпозиума стран - членов СЭВ по микробным пестицидам/ Протвино, Москва, 15 - 19 окт. 1990 г./ - с. 113.
2. Соловей Е.Ф., Кучеренко Е.Н. (Руссова). Проблемы производства и применения биопрепарата на основе *Вертициллиум лекани* против белокрылки и тлей//Тез. сб. «Биологический метод защиты растений»/ Минск, 1990 г./.
3. Соловей Е.Ф., Кучеренко Е.Н. (Руссова). Биологическая активность гриба *Verticillium lecanii* // Тез. докл. II Республиканской конференции «Микробиология в сельском хозяйстве»/Киев, 4-5 июня 1991 г./ - с. 93.
4. Руссова Е.Н., Зайченко А.М. Токсигенный потенциал *verticillium lecanii* (Zilmermann) Viegas // Тез. докл. I укр. микробиол. съезда/ Одесса, 13-16 окт. 1993 г./.
5. Руссова Е.Н., Соловей Е.Ф., Зайченко А.М. Антибиотические свойства культуральных фильтратов *Verticillium lecanii* Zilmermann (Viegas) //Микробиол. журн. - 1993.- 55, № 5, с.69-72.
6. Руссова Е.Н., Соловей Е.Ф., Зайченко А.М. Сравнительная характеристика токсинообразования и биологического действия извлятов *Verticillium lecanii* Zilmermann (Viegas) //Микробиол. журн. - 1993. - 55, № 5. - с. 72-80.

Е.Ф.

066754

AB 30.596