

## ВЛИЯНИЕ БРАССИНОЛИДОВ НА ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ

Я.С. Камельчук

*Полесский государственный университет, Пинск, [kamelchuk.ja@polessu.by](mailto:kamelchuk.ja@polessu.by)*

**Введение.** В природе ферменты, осуществляющие биodeградацию целлюлозы, продуцируются в основном грибами и бактериями [1]. Однако только грибы способны в большом количестве выделять целлюлазы в среду. Образование ферментов микроорганизмами зависит не только от видовой принадлежности продуцентов, но и состава питательных сред, используемых для их выращивания [2]. Брассиностероиды (БС) известны как группа стероидных гормонов, которые оказывают комплексное воздействие на растения [3]. Их регуляторная роль проявляется в стимуляции процессов роста, интенсивности фотосинтеза, стрессовых реакций, изменениях белкового обмена, транспорта ионов и многих других аспектах обмена веществ. Информация о роли брассиностероидов в физиологических и биохимических процессах грибов ограничена, а данные о влиянии их на целлюлолитическую активность микоризных грибов отсутствуют.

**Методы исследования.** В качестве объектов исследования использовали два грибных штамма, природных изолята, депонированных в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Изоляты грибов выделяли из природных объектов - представителей семейства вересковых растений аборигенного вида - черники, культурного вида - голубики высокорослой [4]. Идентификацию выделенных грибов проводили на основании результатов, протоколов, описанных в предыдущих публикациях автора [5]. Тестируемые грибы выращивали в чашках Петри в течение 3 суток на питательной среде следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  - 2,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5,  $\text{KCl}$  - 0,5, пептон - 0,2, Na-карбоксиметилцеллюлоза - 2,0, агар-агар - 17. Для окрашивания использовали раствор Люголя. Целлюлолитическую активность выявляли по способности формировать зоны просветления вокруг колоний, которую оценивали по величине диаметра зон просветления [6]. Микоризные грибы культивировали в жидкой картофельно-сахарозной среде с брассинолидами на качалке в течение 7-10 дней при 24°C. Для определения активности культуральной жидкости использовали диски, пропитанные культуральной жидкостью. Приведенные в работе результаты экспериментов представляют собой усредненные величины трех опытов. При статистической обработке полученных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel.

**Результаты и обсуждение.** При выявлении целлюлолитической активности использовали методы, основанные на формировании комплексов между полисахаридами и красителями. Способность к деградации грибами целлюлозы оценивали по способности их расти и формировать зоны просветления вокруг колоний на агаризованной минеральной среде с использованием субстрата КМЦ и раствора Люголя. При наличии у микоризных грибов способности продуцировать ферменты, осуществляющие биodeградацию целлюлозы, которые диффундируют в агар и гидролизуют Na-КМЦ, окрашенная агаризованная питательная среда вокруг выросших грибных колоний обесцвечивается, а присутствие брассинолидов усиливает или понижает эту способность (таблица 1,2).

Таблица 1. – Влияние эпи- и гомобрасинолидов на целлюлолитическую активность микоризных грибов

| Целлюлолитическая активность площадь лизиса, мм <sup>2</sup> (n=3) |                                 |                         |                          |                                 |                         |
|--|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| <i>Ph. fortinii</i>  |                                 |                         | <i>Pezicula sp.</i>      |                                 |                         |
| Концентрации гормонов, М   | Площадь лизиса, мм <sup>2</sup> | Отношение к контролю, % | Концентрации гормонов, М | Площадь лизиса, мм <sup>2</sup> | Отношение к контролю, % |
| <b>Контроль</b>  | <b>399,67±9,80</b>              | -                       | <b>Контроль</b>          | <b>277,67±9,21</b>              | -                       |
| 24-ЭБ 10 <sup>-7</sup>   | 473,67±9,91                     | 119↑                    | 24-ЭБ 10 <sup>-7</sup>   | 286,33±2,45                     | 103↑                    |
| 24-ЭБ 10 <sup>-9</sup>   | 469±6,12                        | 117↑                    | 24-ЭБ 10 <sup>-9</sup>   | 407,33±14,70                    | 147↑                    |
| 24-ЭБ 10 <sup>-12</sup>  | 515,67±2,45                     | 129↑                    | 24-ЭБ 10 <sup>-12</sup>  | 358,33±4,49                     | 129↑                    |
| 28-ГБ10 <sup>-7</sup>  | 241,67±10,73                    | 60↓                     | 28-ГБ10 <sup>-7</sup>    | 291,33±2,45                     | 105↑                    |
| 28-ГБ 10 <sup>-9</sup>   | 360±6,03                        | 90↓                     | 28-ГБ 10 <sup>-9</sup>   | 314,33±15,50                    | 113↑                    |
| 28-ГБ10 <sup>-12</sup>   | 477±18,78                       | 119↑                    | 28-ГБ10 <sup>-12</sup>   | 346,67±8,57                     | 125↑                    |

Таблица 2. – Влияние эпи- и гомобрасинолидов на целлюлолитическую активность культуральной жидкости микоризных грибов

| Целлюлолитическая активность площадь лизиса, мм <sup>2</sup> (n=3) |                                 |                         |                              |                                 |                         |
|--|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| КЖ гриба <i>Ph. fortinii</i>                                       |                                 |                         | КЖ гриба <i>Pezicula sp.</i> |                                 |                         |
| Концентрации гормонов, М   | Площадь лизиса, мм <sup>2</sup> | Отношение к контролю, % | Концентрации гормонов, М     | Площадь лизиса, мм <sup>2</sup> | Отношение к контролю, % |
| <b>Контроль</b>  | <b>655±15,87</b>                | -                       | <b>Контроль</b>              | <b>382,67±8,09</b>              | -                       |
| 24-ЭБ 10 <sup>-7</sup>   | 885±5,29                        | 135↑                    | 24-ЭБ 10 <sup>-7</sup>       | 438,67±9,39                     | 115↑                    |
| 24-ЭБ 10 <sup>-9</sup>   | 1002,67±5,21                    | 153↑                    | 24-ЭБ 10 <sup>-9</sup>       | 557±2,04                        | 146↑                    |
| 24-ЭБ 10 <sup>-12</sup>  | 910±12,66                       | 139↑                    | 24-ЭБ 10 <sup>-12</sup>      | 484,33±4,33                     | 127↑                    |
| 28-ГБ10 <sup>-7</sup>  | 982,33±2,45                     | 150↑                    | 28-ГБ10 <sup>-7</sup>        | 453±2,45                        | 118↑                    |
| 28-ГБ 10 <sup>-9</sup>   | 1555,67±9,33                    | 238↑                    | 28-ГБ 10 <sup>-9</sup>       | 492±7,35                        | 129↑                    |
| 28-ГБ10 <sup>-12</sup>   | 1098,33±13,62                   | 168↑                    | 28-ГБ10 <sup>-12</sup>       | 529,67±2,04                     | 138↑                    |

Оба гриба обладали целлюлолитической активностью (таблица 1) Целлюлолитическая активность по отношению к контролю гриба *Ph. fortinii* угнеталась при использовании только гомобрасинолида в концентрации 10<sup>-7</sup> М на 40 % и концентрации 10<sup>-9</sup> М на 10 %, с концентрацией 10<sup>-12</sup> был выражен положительный эффект и целлюлолитическая активность возросла на 19 %.

Целлюлолитическая активность гриба *Pezicula sp.* по отношению к контролю была выше при использовании гомобрасинолида со всеми концентрациями. Активность возрастала на 25 % с 28-ГБ 10<sup>-12</sup> (с этой концентрацией был самый выраженный эффект), с концентрацией 10<sup>-9</sup> на 13 %, а с концентрацией 10<sup>-7</sup> на 5 %.

При изучении целлюлолитической активности культуральной жидкости *Ph. fortinii* и *Pezicula sp.* (таблица 2) отмечено, активность КЖ обоих грибов выше КЖ контроля во всех случаях применения гомобрасинолида со всеми исследуемыми концентрациями. С использованием концентрации 28-ГБ 10<sup>-7</sup> и 10<sup>-12</sup> М целлюлолитическая активность КЖ гриба *Ph. fortinii* была примерно одинаковой и оставалась выше контроля на 50÷68 %, а с концентрацией 10<sup>-9</sup> активность КЖ возросла в 2,4 раза и является ярко выраженным изменением целлюлолитической активности при изучении влияния гомобрасинолида.

Целлюлолитическая активность КЖ гриба *Pezicula sp.* оказалась не такой активной как у КЖ гриба *Ph. fortinii*, но оставалась выше контроля также со всеми концентрациями гомобрасинолида. Повышенная на 118 % целлюлолитическая активность отмечена с концентрацией 28-ГБ 10<sup>-7</sup>. Более выраженная активность с положительным эффектом на 138% наблюдалась с концентрацией гомобрасинолида 10<sup>-12</sup> М. С применением 28-ГБ 10<sup>-9</sup> выраженный эффект целлюлолитической активности составил 129 %.

При добавлении гормона 28-ГБ10<sup>-12</sup> в обоих грибах наблюдается значительное увеличение площади лизиса, что указывает на усиление целлюлолитической активности. В грибе *Ph. fortinii*

площадь лизиса увеличивается на 119 %, а в грибе *Pezicula sp.* - на 125 %. Увеличение концентрации приводит к снижению активности.

Концентрация гомобрасинолида  $10^{-9}$ М при глубинном культивировании еще более усиливает целлюлолитическую активность КЖ обоих грибов. В КЖ гриба *Ph. fortinii* площадь лизиса увеличивается на 238 %, а в КЖ гриба *Pezicula sp.* - на 129 %. При использовании наименьшей концентрации гормона 28-ГБ10<sup>-12</sup> также наблюдается увеличение площади лизиса, но эффект у обоих грибов выражен по-разному. В КЖ гриба *Ph. fortinii* площадь лизиса увеличивается на 168%, а в грибе *Pezicula sp.* - на 138%. Увеличение концентрации гормонов обычно сопровождается менее выраженным увеличением целлюлолитической активности.

**Заключение.** Таким образом, впервые показана эффективность применения фитогормонов 24-эпибрасинолида и 28-гомобрасинолида для усиления способности микоризных грибов к деградации ими целлюлозы. Проведенные эксперименты показали, что добавление брасиностероидов в любой исследуемой нами концентрации в питательную среду при погружном культивировании обоих микоризных грибов значительно усиливает целлюлолитическую активность КЖ. Целлюлолитическая активность микоризных грибов связана с их способностью разлагать целлюлозу, основной компонент растительной клеточной стенки. Применение эпи- и гомобрасинолидов способствует увеличению целлюлолитической активности определенных видов микоризных грибов, в нашем случае *Pezicula sp.*, а с эпибрасинолидом - *Ph. fortinii*. Это может быть связано с усилением выделения целлюлаз, ферментов, ответственных за разложение целлюлозы.

#### Список использованных источников

1. Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology / M.K. Bhat // Biotechnol. Adv. – 2000. – Vol. 18, № 5. – P. 355–383.
2. Мороз И.В., Михайлова Р.В., Шахнович Е.В., Лобанок А.Г. Использование экспрессметодов при скрининге грибных продуцентов целлюлаз // Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биологически активные соединения для сельского хозяйства, здоровья человека и охраны окружающей среды: Матер. IX Междунар. конф. daRostim 2013, Львов, 07-10 октября 2013 г. / Львовская политехника; В.Новиков (отв.ред.) [и др.] – Львов: Издательство Львовской политехники, 2013. – С. 91-92.
3. Khripach, V. A. Brassinosteroids: A new class of plant hormones / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. E. De Groot. – San Diego, 1998. – 456 p.
4. Камельчук, Я. С. Особенности выделения и культивирования *in vitro* эндомикоризных грибов из корней представителей семейства вересковых (*Ericaceae juss.*) / Я. С. Камельчук, Н. А. Ламан // Ботаника (исследования) Вып. 47. – Мн.: «Колорград». – 2018. – С. 110-115.
5. Камельчук, Я.С. Морфолого-культуральные и молекулярно-генетические особенности коллекционных штаммов микоризных грибов *Phialocephala fortinii* и *Pezicula sp.* / Я.С. Камельчук [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси: научный журнал. - 2020. - Т. 64, № 5. - С. 567-573.
6. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β-глюканазной, ксиланазной, целлюлазной активностей: МВИ.МН 3235–2009. – Введ. 30.09.09. – Минск : РУП «Белорус. гос. ин-т метрологии», 2009. – 36 с.