

ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ 320 І 1515 МІКРОМІЦЕТУ *TRICHODERMA KONINGII*

Матвієнко А.О.^{1,2}, Сирчін С.О.²



Відеодповідь

ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка, nastiamatvienko2@gmail.com
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Abstract

Proteases, along with chitinases and laminarinases, are part of the triad of hydrolytic enzymes providing biocontrol potential of the fungi Trichoderma genus, but remain largely unexplored so far. We therefore conducted a comparative evaluation of the potential to produce extracellular proteolytic activity of Trichoderma koningii strains 320 and 1515 were highly active against phytopathogens.

Keywords: *biocontrol agent, Trichoderma koningii, proteolytic activity*

Вступ. Сучасні високоврожайні технології вирощування сільськогосподарських культур використовують тривале широкомасштабне монокультурне землеробство і передбачають надмірне використання хімічних пестицидів та добрив. Але це призводить до руйнування біоценозів сільськогосподарських угідь, хвороб рослин, загального погіршення екологічної ситуації ґрунтів та водних ресурсів. Альтернативою є розвиток "зеленого" або органічного сільського господарства з використанням безпечних, ефективних та екологічно чистих заходів боротьби з хворобами рослин. Біологічний контроль в основному використовується для боротьби зі фітопатогенами рослин за допомогою корисних організмів та продуктів їхньої життєдіяльності, щоб контролювати хвороби рослин та ефективно зменшити застосування хімічних добрив і пестицидів. Мікроскопічні гриби роду *Trichoderma* широко використовуються для боротьби з фітопатогенами, сприяють росту рослин, підвищувати їх стійкість до стресів [1].

На сьогодні відомо понад 370 видів роду *Trichoderma*, серед яких найбільш розповсюджені *T. harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* і *T. aureoviride*. Найбільшу біоконтрольну активність проявляли *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. polysporum* і *T. asperellum* [2].

Trichoderma spp. широко використовується для біологічного контролю вертицильозного в'янення бавовни, сірої гнилі томатів, в'янення дині, сухої гнилі картоплі, кореневої гнилі тютюну та інших хвороб рослин. На сучасному ринку біологічних препаратів проти хвороб сільськогосподарських культур найбільше представлений *T. harzianum*, *T. viride* і *T. koningii* [3]. Не зважаючи на наявність низки комерційних препаратів на основі *Trichoderma spp.* вважається, що локальні (місцеві) ізоляти можуть проявляти більш широкий спектр біоконтрольної активності. Це свідчить про необхідність проведення їх подальшого пошуку і досліджень різних видів біологічної активності [4].

Раніше, з використанням методу подвійної культури, нами було встановлено, що природні ізоляти 320 і 1515 гриба *T. koningii* ефективно

пригнічують ріст низки важливих фітопатогенів: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Nectria inventa* та *Nigrospora oryzae* [5].

Метою наших досліджень було визначити рівень протеолітичної активності *T.koningii* штами 320 та 1515 при рості на поживних середовищах з різними джерелами вуглецю.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були два штами гриба *Trichoderma koningii* 320 і 1515, які були виділені, ідентифіковані та зберігаються в колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Культури досліджуваних грибів попередньо вирощували на картопляно-декстрозному агарі у пробірках зі скошеним живильним агаром та інкубували за температури $26\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 10-14 діб.

Для загальної оцінки здатності гриба продукувати протеази використовували метод Карімі [6], який полягав в вирощуванні досліджуваних штамів на чашках Петрі на середовищі SMA (4 г знежиреного молока, 1 г пептону, 5 г NaCl, 15 г агару на 1 літр H_2O). Протеазну активність оцінювали через п'ять днів культивування грибів за температури 26°C за здатністю створювати прозорі ореоли (гало) навколо колоній.

Для визначення протеолітичної активності гриби культивували протягом п'яти днів при 26°C в рідкому середовищі Чапека та в середовищах де замість глюкози вносили 1% пептону або казеїну. Біомасу відділяли центрифугуванням при 6000g упродовж 10 хв. В агаризованому середовищі з 1% казеїном, в якому робили лунки діаметром 1 см. В лунки вносили 50 мкл супернатанту і інкубували добу за температури 26°C .

Кількісні показники протеолітичної активності КФ визначали за модифікованим методом Ансона [7]. Реакційну суміш, що містила 0,5 мл КФ та 0,5 мл 1%-го казеїну Hammarstein (Sigma-Aldrich) у 0,05 М фосфатному буфері, рН 6,0, інкубували без струшування при 37°C протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти, витримували 15 хв., осад відділяли центрифугуванням при 6000 g упродовж 10 хв. До 0,5 мл надосадової рідини додавали 2,5 мл 0,4 М розчину Na_2CO_3 , витримували 15 хвилин після чого додавали 0,5 мл реактиву Фоліна. Через 30 хвилин вимірювали оптичну густину при $\lambda=660$ нм на спектрофотометрі СФ-46. Значення протеолітичної активності визначали за калібрувальною кривою за тирозином. Одиницю протеолітичної активності визначали як кількість ферменту, необхідну для утворення 1 мкмоль продукту за хвилину реакції в мл за стандартних умов проведення аналізу.

Всі аналізи виконували в трьох незалежних експериментах. Відмінності в середніх значеннях вважали достовірними на рівні $P<0,05$.

Результати та обговорення. Встановлено, що при культивуванні досліджених штамів на агаризованому середовищі SMA спостерігається утворення ореолів (гало) навколо колоній грибів (Рис.1., а,б).



Рис. 1. Виявлення активності протеолітичних ферментів за утворенням ореолів у чашках Петрі зі специфічними середовищами: а - утворення ореолу в результаті продукування протеази *T.koningii* штамми 320 та 1515, б - через п'ять днів культивування на SMA середовищі, с - утворення ореолів внаслідок протеолітичної активності культуральних фільтратів досліджених штамів грибів на агаризованому середовищі з казеїном. В лунки вносили КФ після вирощування штамів 320 та 1515 на казеїні -1,4 і на середовищі Чапека 2,3 відповідно.

Що свідчить про наявність у них протеолітичної активності. В іншому експерименті було показано, що утворення ореолів відбувалось за дії протеаз в КФ грибів культивованих на поживних середовищах з казеїном. В той час як при їх культивуванні на середовищі Чапека активність практично не проявлялась (Рис.1., с). Це свідчить про індуцибельний характер продукування протеаз *T. koningii* 320 і 1515.

При культивуванні досліджених грибів в рідкому мінеральному середовищі з різними джерелами вуглецю було встановлено, що на середовищі з глюкозою (Чапека) утворювались слідові кількості протеолітичної активності. В той же час на середовищах з білковими субстратами досліджені штами продукували протеази зі значеннями активності: штам 320 - 5,5 і 10,2; штам 1515- 4,95 і 9,35 од/мл для середовищ з пептоном і казеїном відповідно (Рис.2.). Це свідчить про те, що нативний (не гідролізований) білковий субстрат є більш сильним індуктором синтезу протеаз. З даних послідовностей геномів шести видів грибів роду *Trichoderma* відомо, що вони містять низку генів які кодують головним чином серинові протеази а також містять аспарагінові і метало-протеази. Разом з хітиназами та ламінариназами, протеази є частиною тріади гідролітичних ферментів, що забезпечують потенціал біоконтролю грибів роду *Trichoderma*. Однак, на відміну від хітиназ та ламінариназ, протеази досі залишаються недостатньо дослідженими і потребують більш детального вивчення.

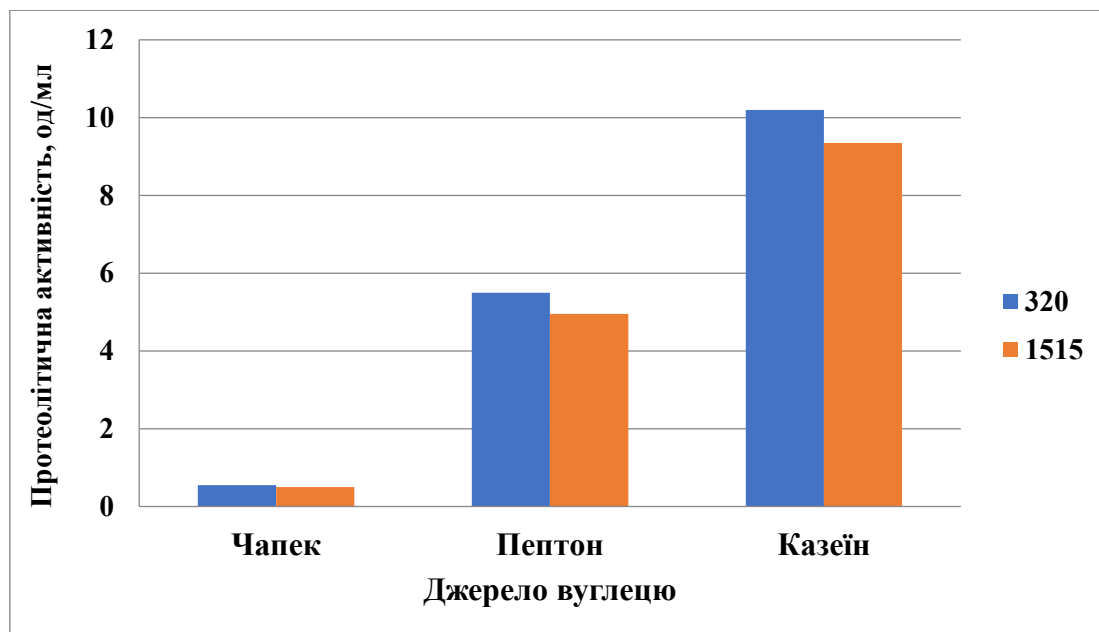


Рис. 2. Протеолітична активність *T. koningii* штамів 320 та 1515, при культивуванні на поживних середовищах з різними джерелами вуглецю

Висновки. Таким чином, за результатами досліджень було виявлено, що штамми 320 та 1515 аскоміцету *Trichoderma koningii* продукують протеолітичну активність рівень якої залежить від джерела вуглецю в поживному середовищі.

Список використаної літератури:

1. Woo SL, Hermosa R, Lorito M, Monte E.. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. Nat Rev Microbiol.2023;21:312–326. doi:10.1038/s41579-022-00819-5
2. Thambugala KM, Daranagama DA, Phillips AJL, Kannangara SD, Promputtha I. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:604923. doi: 10.3389/fcimb.2020.604923.
3. Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszuk-Ścisiel J. *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. Int J Mol Sci. 2022;23(4):2329. doi: 10.3390/ijms23042329.
4. Chan ME, Tan JY, Lee YY, Lee D, Fong YK, Mutwil M, Wong JY, Hong Y. Locally Isolated *Trichoderma harzianum* Species Have Broad Spectrum Biocontrol Activities against the Wood Rot Fungal Species through Both Volatile Inhibition and Mycoparasitism. J Fungi (Basel). 2023; 9(6):675. doi: 10.3390/jof9060675.
5. Savchuk YaI, Yurieva OM, Syrchin SO et al. *Trichoderma* Strains – Antagonists of Plant Pathogenic Micromycetes. Mikrobiol. Z. 2022; 84(1):24-38.doi: 10.15407/microbiolj84.01.020
6. Karimi K, Narmani A , Pertot I, Arzanlou M. Rapid and Easy Modified Plate-based Screening Methods for Quantitative and Qualitative Detection of Protease Production by Fungi. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 2019; 54 (1): 1–8. doi: 10.1556/038.54.2019.001
7. Jain, A., Jain, R., Jain, S. (2020). Enzyme Assay: Qualitative and Quantitative . In: Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-9861-6_17