

Биопрепараты и биозащита

УДК 632.51:582.28:57.083.1

doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1054rus

**ПОЛУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОГО ГЛУБИННОГО МИЦЕЛИЯ
Stagonospora cirsi C-163 — ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МИКОГЕРБИЦИДА
ДЛЯ БОРЬБЫ С БОДЯКОМ ПОЛЕВЫМ *Cirsium arvense* (L.) Scop.*****С.В. СОКОРНОВА, А.О. БЕРЕСТЕЦКИЙ**

Биогербициды должны проявлять стабильную эффективность в полевых условиях, обладать специфичностью и скоростью действия, быть совместимыми с другими препаратами и востребованными на рынке. Основой микогербицидов может служить как мицелий, так и конидии фитопатогенных грибов. Мицелий менее устойчив к сушке, чем конидии. В то же время технологический процесс получения конидий зачастую сложнее, а эффективность в полевых условиях менее стабильна, чем у мицелия. Фитопатогенный гриб *Stagonospora cirsi* J.J. Davis, вызывающий заболевание пятнистости листьев у корнеотпрысковых сорных растений семейства *Asteraceae*, рассматривается как потенциальный микогербицид, предназначенный для борьбы с бодяком полевым *Cirsium arvense* (L.) Scop. В настоящей работе мы впервые показали, что, манипулируя составом жидкой питательной среды, можно существенно повысить патогенность мицелия гриба *S. cirsi* и его толерантность к высушиванию. Цель исследования — получить высокий выход вирулентного мицелия *S. cirsi* C-163, оптимизируя состав жидкой питательной среды по источникам углерода и азота, а также длительность глубинного жидкофазного культивирования. Посевной материал получали на картофельно-глюкозном агаре на 10-е сут. Мицелий выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл жидкой питательной среды на орбитальных качалках (180 об/мин) при температуре 24 ± 2 °C в течение 2-7 сут. В жидких питательных средах варьировали источники углерода (дульцит, рамноза, L-инозит, L-арабиноза, D-сорбит, глюкоза, трегалоза, сахароза) и азота (казеин, соевый пептон, пептон ферментативный, соевая мука, желатин, лецитин, дигидрофосфат аммония, хлорид аммония, сульфат аммония, нитрат натрия), используя в качестве основы следующий состав среды: источник углерода (20 г/л), органический (10 г/л) или неорганический (3,5 г/л) источник азота, дрожжевой автолизат (1 г/л), KH_2PO_4 (1 г/л), MgSO_4 (0,5 г/л). Значение pH жидких питательных сред доводилось до 6,0. Для установления оптимальных концентраций сахарозы и соевой муки в питательной среде, содержащей также дрожжевой автолизат (1 г/л), KH_2PO_4 (1 г/л), MgSO_4 (0,5 г/л), изменяли количество сахарозы от 10 до 70 г/л с шагом 10 г/л и концентрацию соевой муки от 5 до 20 г/л с шагом 2,5 г/л. Степень поражения бодяка полевого в результате развития болезни оценивали по площади некрозов листовых высечек либо целых растений, находящихся в фазе розетки. Мицелий (влажность 85-87 %) высушивали в тонком слое (1-2 мм) проточным стерильным воздухом при 30 °C без протекторов в течение 3 ч. Наибольший выход мицелия выявили в варианте, когда источником углерода в питательной среде был L-инозит. Его замена на сахарозу и D-сорбит приводила к снижению выхода биомассы на 25 %. В то же время на этих средах образовывался наиболее агрессивный в отношении бодяка мицелий. При изменении источников азота максимальный выход мицелия наблюдался для казеина, соевой муки и ферментативного пептона. В процессе высушивания мицелия потери жизнеспособности пропагул оказались существенными. Наиболее устойчивым к высушиванию был мицелий, полученный на сахарозо-соевой питательной среде. Наиболее жизнеспособный мицелий, заражение которым приводило к быстрому развитию болезни и обширной некротизации листьев бодяка, образовывался в середине экспоненциальной фазы роста. Оптимизация концентрации соевой муки (15 г/л) и сахарозы (60 г/л) позволила повысить выход и агрессивность мицелия в отношении бодяка соответственно в 12 и 4 раза по сравнению с параметрами на стандартной питательной среде Чапека и существенно сократить время культивирования (3 сут). Таким образом, в результате оптимизации условий жидкофазной глубинной ферментации выход вирулентного мицелия *S. cirsi* возрос более чем в 10 раз и стал сопоставим с принятым в биотехнологической практике.

Ключевые слова: фитопатогенные грибы, *Stagonospora cirsi*, *Cirsium arvense*, бодяк полевой, глубинная жидкофазная ферментация, источники углерода и азота, мицелий, микогербицид.

Из более чем 200 видов грибов и бактерий, которые рассматривались как возможные биогербициды различного спектра действия, к 2011 году лишь 8,1 % стали основой для производства коммерческих препара-

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-16-00085 «Разработка технологий получения и применения микогербицидов для борьбы с трудноискоренимыми сорными растениями».

тов, 19,4 % были зарегистрированы, но не коммерциализированы и 72,5 % не подтвердили свою эффективность (1). Причина заключается в том, что коммерческий успех биогербицида определяется не только вирулентностью для целевого объекта, но и эффективностью в полевых условиях, специфичностью и скоростью действия (агрессивностью), технологичностью, стоимостью используемых в производственном цикле питательных сред, возможностью совместного применения с другими биологическими и химическими препаратами, а также потребностями рынка (2, 3).

Технология получения биопрепаратов определяется прежде всего природой исходного инфекционного материала. Большинство зарегистрированных микопестицидов разработаны на основе конидий, в ряде случаев для этого используют мицелий и его видоизменения. К недостаткам мицелия чаще всего относят низкую устойчивость к сушке. В то же время технологический процесс получения конидий зачастую сложнее, а эффективность в полевых условиях менее стабильна, чем у мицелия (3, 4).

Фитопатогенный гриб *Stagonospora cirsii* J.J. Davis рассматривается как потенциальный микогербицид, предназначенный для борьбы с бодяком полевым *Cirsium arvense* (L.) Scop. (5). Заболевание пятнистости листьев у корнеотпрысковых сорных растений семейства *Asteraceae* может вызываться как конидиями, так и фрагментами мицелия *S. cirsii* С-163. Штаммы этого вида образуют конидии только под воздействием ультрафиолета (5). Мицелий *S. cirsii* С-163 способен вызывать заболевание сорняка при более жестких температурно-влажностных условиях, чем конидии (6). Преимущества использования в поле препаратов на основе мицелия показаны также для других потенциальных микогербицидов (6-9). Отчасти это объясняют автоингибированием развития конидий при их высокой численности (10, 11). Известны случаи, когда конидии фомоидных микромицетов, полученные *in vitro*, были авирулентны (12). Кроме того, возникновение синергетического эффекта при совместном применении мицелия и химических гербицидов в пониженных дозах обеспечивает более стабильную эффективность препаратов на основе мицелия в полевых условиях (13-15). Поэтому в качестве инфекционного материала при разработке биогербицида против бодяка полевого рассматривают прежде всего мицелий *S. cirsii*.

По сравнению с твердофазным культивированием жидкофазная глубинная ферментация — более простой и быстрый способ получения инфекционного материала (16-18). Разработка этой технологии включает оптимизацию питательной среды по жизнеспособности и агрессивности получаемого материала (16). Для фитопатогенных микромицетов показано, что агрессивность инфекционного материала определяется природой источников углерода и азота, их соотношением и абсолютной концентрацией (19-21), а также физиологическим состоянием пропагул (6). Следует отметить, что для фомоидных микромицетов, к которым относится *S. cirsii*, не проводились комплексные исследования по оценке влияния длительности культивирования, природы и концентрации источников углерода и азота на качество мицелия, получаемого в результате глубинной ферментации.

В настоящей работе мы впервые показали, что, манипулируя составом жидкой питательной среды, можно существенно повысить патогенность мицелия гриба *S. cirsii* и его толерантность к высушиванию.

Нашей целью была оптимизация состава питательной среды (по источникам С, N) и длительности глубинного жидкофазного культивирования для повышения выхода вирулентного мицелия *Stagonospora cirsii* С-163.

Методика. В работе использовали штамм гриба *S. cirsii* С-163, который хранился при 5 °С в пробирках на скошенном картофельно-глюкозном агаре и при -80 °С в 10 % глицерине. Посевной материал по-

лучали на картофельно-глюкозном агаре.

Мицелий выращивали в колбах Эрленмейра объемом 250 мл с 50 мл жидкой питательной среды на орбитальной качалке (180 об/мин). В жидких питательных средах варьировали источники углерода (дульцит, рамноза, L-инозит, L-арабиноза, D-сорбит, глюкоза, трегалоза, сахароза) и азота (казеин, соевый пептон, пептон ферментативный, соевая мука, желатин, лецитин, дигидрофосфат аммония, хлорид аммония, сульфат аммония, нитрат натрия). Использовали следующий состав сред: источник углерода (20 г/л), органический (10 г/л) или неорганический (3,5 г/л) источник азота, дрожжевой автолизат (1 г/л), $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 г/л), MgSO_4 (0,5 г/л). Значение pH жидких питательных сред до автоклавирования доводили до 6,0 (с учетом оптимальных для развития мицелия гриба *S. cirsi* значения pH 5-6) (8).

Для установления оптимальных концентраций сахарозы и соевой муки в питательной среде, содержащей также дрожжевой автолизат (1 г/л), $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 г/л), MgSO_4 (0,5 г/л), изменяли количество сахарозы от 10 до 70 г/л с шагом 10 г/л и концентрацию соевой муки от 5 до 20 г/л с шагом 2,5 г/л. Оптимальное время культивирования определяли в диапазоне от 2 до 7 сут при температуре 25 ± 2 °C на питательной среде (pH 6,0) следующего состава: соевая мука (14 г/л), сахароза (60 г/л), дрожжевой автолизат (1 г/л), $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 г/л), MgSO_4 (0,5 г/л). Определение КОЕ, выхода мицелия по сухой массе, pH культуральной жидкости осуществляли по стандартным методикам (22).

Агрессивность мицелия в отношении бодяка полевого оценивали по площади поражения листовых высечек либо целых растений, находящихся в фазе розетки. Из листьев среднего яруса пробочным сверлом высекали диски диаметром 0,8 см. Их помещали рядами по 12 шт. адаксиальной стороной вверх в герметичные прозрачные пластиковые контейнеры на увлажненную стерильной водой фильтровальную бумагу. Листовые высечки инокулировали фрагментами мицелия *S. cirsi* С-163 (50 мг/мл) нанесением водной суспензии (5 мкл) в центр диска. В опытах на целых растениях их опрыскивали водной суспензией той же концентрации при расходе 1,5 мл/растение. Агрессивность *S. cirsi* на высечках из листовых дисков оценивали на 2-е сут после инокуляции по относительной площади некрозов, образующихся при температуре 25 °C и периодическом (12 ч темнота/12 ч свет) искусственном освещении. Агрессивность *S. cirsi* на целых растениях определяли по относительной площади некрозов листьев на 7-е сут после инокуляции.

Мицелий (влажность 85-87 %) высушивали в тонком слое (1-2 мм) проточным воздухом при 30 °C без протекторов в течение 3 ч.

1. Выход и агрессивность 4-суточного мицелия *Stagonospora cirsi* С-163 при разных источниках С в среде культивирования ($M \pm \text{SEM}$)

Источник углерода	Выход биомассы, г/л	Площадь некрозов, %
L-инозит	5,60±0,10	20±4
Сахароза	4,20±0,08	55±4
D-сорбит	4,13±0,19	50±4
Рамноза	3,79±0,13	23±2
L-арабиноза	3,24±0,23	10±4
Трегалоза	3,11±0,22	35±7
Глюкоза	3,08±0,08	25±4
Дульцит	2,37±0,13	5±2
HCP _{0,05}	0,29	9

Опыты проводили в 4 повторностях. Результаты подвергали дисперсионному анализу. Однородность дисперсий выборок проверяли с помощью критерия Кохрена. Для средних (M) приведены стандартные отклонения ($\pm \text{SEM}$). Достоверность различий средних значений определена с помощью критерия наимень-

шей существенной разности (HCP_{0,05}). Вычисления выполняли в программе Microsoft Excel 2007.

Результаты. Первой этап оптимизации условий культивирования *S. cirsii* С-163 заключался в выборе источника углерода для жидкой питательной среды. Вариант с L-инозитом как источником углерода обеспечивал наибольший выход. Замена L-инозита на сахарозу и D-сорбит приводила к снижению выхода биомассы на 25 %. В то же время на средах с сорбитом и сахарозой образовывался мицелий, наиболее агрессивный в отношении бодяка (табл. 1). По этой причине, а также учитывая коммерческую доступность и стабилизирующие свойства сахарозы (9), ее использовали в качестве источника углерода при выборе источника азота на следующем этапе оптимизации.

2. Выход и агрессивность 4-суточного мицелия *Stagonospora cirsii* С-163 при разных источниках N в среде культивирования ($M \pm SEM$)

Источник азота	Выход	
	биомассы, г/л	Площадь некрозов, %
Казеин	55,80±0,11	100±0
Соевая мука	25,29±0,09	100±0
Пептон ферментативный	21,24±0,13	96±5
Желатин	18,12±0,14	100±0
Лецитин	12,01±0,08	75±12
Соевый пептон	6,11±0,17	100±0
Дигидрофосфат аммония	6,70±0,13	50±4
Сульфат аммония	5,12±0,08	58±4
Нитрат натрия	4,50±0,08	45±7
Хлорид аммония	4,21±1,30	50±4
НСР _{0,05}	0,3	9

Варьируя источники N на среде с сахарозой, получили, что выход сухой биомассы на питательных средах с органическим азотом (за исключением соевого пептона) составлял 12-55 г/л, более чем в 3 раза превышая показатель на стандартной среде Чапека с дрожжевым экстрактом (источник азота — нитрат натрия) (табл. 2). Водная суспензия на основе фрагментов мицелия, полученного на питательных средах с казеином, пептоном, соевой мукой или желатином, вызывала гибель высечек из листьев бодяка. Максимальный выход мицелия наблюдался для казеина, соевой муки и ферментативного пептона (табл. 2). Питательные среды такого состава были базовыми на третьем этапе оптимизации.

3. Жизнеспособность 4-суточного мицелия *Stagonospora cirsii* С-163 после сушки при разных источниках N в среде культивирования ($M \pm SEM$)

Источник азота	КОЕ/г×10 ⁶	
	до сушки	после сушки
Казеин	0,4±0,1	0,05±0
Пептон ферментативный	1,1±0,1	0,10±0,01
Соевая мука	1,2±0,1	0,30±0,01
НСР _{0,05}	0,20	0,01

Возможность успешной стабилизации инфекционного материала закладывается еще на этапе культивирования (23, 24). Поэтому основным критерием отбора на третьем этапе оптимизации состава питательной среды была устойчивость полученного на различных питательных средах мицелия к сушке. При высушивании потери жизнеспособности пропагул оказались существенными. Наибольшую устойчивость к высушиванию проявил мицелий, полученный на сахарозо-соевой питательной среде, которую и выбрали для дальнейшей оптимизации (табл. 3). Полученные данные о низкой устойчивости мицелия *S. cirsii* С-163 к высушиванию согласуются с приведенными в литературе (3, 8). В случаях, когда потенциальный микогербицид образует склероции, их, учитывая большую термотолерантность этой жизненной формы, используют в качестве инфекционного материала (25-27). Фомоидные микромицеты такой способностью не обладают. Более мягкие условия сушки обеспечиваются при получении песто- и альгинатных гранул. Мы считаем, что их использование перспективно при разработке микогербицидов на основе мицелия фомоидных фитопатогенов, поскольку это позволяет снизить потери при высушивании, а в состав таких препаративных форм можно включать дополнительные активные компоненты, повышающие эффективность препаратов в полевых условиях (28-30).

На четвертом этапе оптимизации питательной среды оценивали влияние длительности культивирования гриба на патогенные свойства мицелия и его выход (рис. 1). Максимальный выход мицелия (около 36 г/л) соответствовал началу стационарной фазы роста гриба и приходился на 4-5-е сут культивирования. При этом наибольшую активность в отношении бодяка проявлял 3-суточный мицелий, что соответствует середине экспоненциальной фазы роста гриба, характеризующейся наиболее активными метаболическими процессами.

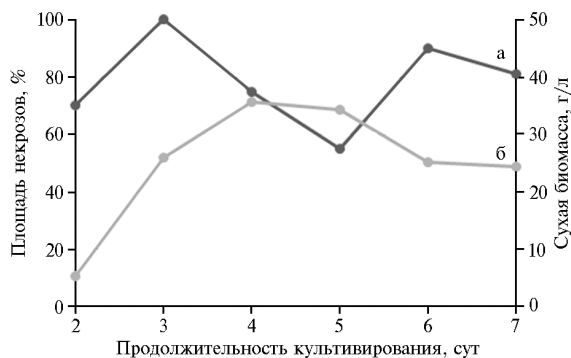


Рис. 1. Агрессивность (а; $НСП_{0,05} = 8,0$) и выход мицелия (б; $НСП_{0,05} = 0,9$) *Stagonospora cirsi* С-163 в зависимости от продолжительности культивирования на сахарозо-соевой среде.

связываем с началом токсинообразования (32).

Поскольку при глубинном жидкофазном культивировании сокращение времени ферментации становится важным технологическим преимуществом, в дальнейшей работе оптимизировали концентрации соевой муки и сахарозы для получения 3-суточного мицелия. Дисперсионный анализ опытных данных показал во всех случаях статистически значимое ($p < 0,001$) совместное и индивидуальное влияние концентраций источников углерода и азота в жидкой питательной среде на патогенность и выход мицелия. Этот результат полностью согласуется с данными литературы о влиянии концентрации и соотношения этих компонентов питательной среды на выход и патогенность разных типов инфекционного материала, например конидий *Colletotrichum coccoides* (21), конидий, микросклероций и мицелия *C. truncatum* (24, 27).

Наибольший выход сухой биомассы (36 г/л) отмечали при концентрации сахарозы 60 г/л и соевой муки 15 г/л. Дальнейшее увеличение количества соевой муки уменьшало выход мицелия. Очевидно, это было связано со снижением аэрации питательной среды из-за увеличения ее плотности. При обработке высечек листьев водной суспензией мицелия *S. cirsi* С-163 (25 мг/мл) максимальная площадь некрозов наблюдалась при концентрации сахарозы от 30 г/л и выше и при концентрации соевой муки 12,5-17,5 г/л. Снижение патогенности при высоких концентрациях соевой муки также было связано с уменьшением аэрации, приводящей к преждевременному старению и деградации мицелия. Как видно из графиков (рис. 2), область максимальных значений выхода мицелия гриба лежит внутри области максимальных значений площади некрозов. Поэтому оптимальные концентрации углерода и азота выбирали по максимальному выходу биомассы *S. cirsi*. Оптимизированная сахарозо-соевая среда (рН 6,0) имела следующий состав: соевая мука (15 г/л), сахароза (60 г/л), дрожжевой автолизат (1 г/л), KH_2PO_4 (1 г/л), $MgSO_4$ (0,5 г/л). Надо отметить, что при

Второй пик биологической активности (6-е сут) приходился на стационарную фазу роста, когда обычно происходит образование и накопление вторичных метаболитов. Известно, что *S. cirsi* при стационарном культивировании на жидкой питательной среде Чапека выделяет стаганолидоподобные токсины, проявляющие фитотоксичность (31). Некротизация субстрата может ускорять развитие болезни, поэтому второй пик биологической активности мы свя-

увеличении степени аэрации оптимальные для наибольшего выхода агрессивного мицелия концентрации сахарозы и соевой муки могут измениться и требуют коррекции (16). Выход сухого высокоагрессивного в отношении бодяка полевого мицелия на оптимизированной сахарозо-соевой среде на 3-и сут составил 36 г/л. На исходной среде Чапека с дрожжевым экстрактом выход мицелия не превышал 3 г/л.

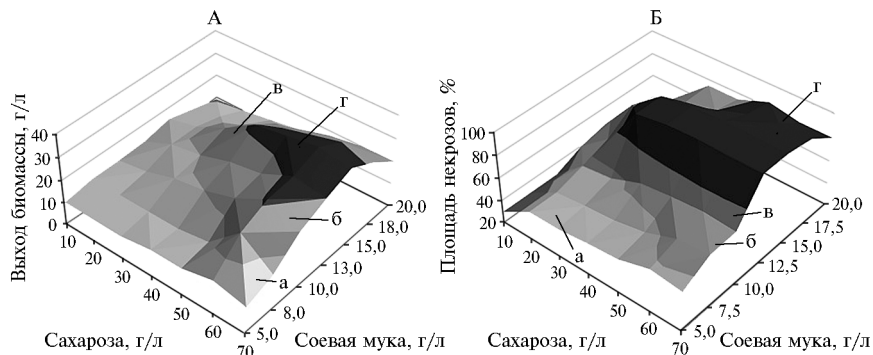


Рис. 2. Выход (А) и агрессивность (Б) мицелия *Stagonospora cirsií* в зависимости от концентрации в среде сахарозы и соевой муки: а — 0-10, б — 10-20, в — 20-30, г — 30-40 г/л, НСР_{0,05} = 1,5 (А); а — 20-40, б — 40-60, в — 60-80, г — 80-100 г/л, НСР_{0,05} = 7,0 (Б).

Таким образом, оптимизация параметров жидкофазной глубинной ферментации повысила выход вирулентного мицелия *Stagonospora cirsií* С-163 более чем в 10 раз (до сопоставимого с принятым в биотехнологической практике). На микогербицидные свойства мицелия *S. cirsií* существенно влияет длительность культивирования и органическая природа азота в среде. Предложенный высокотехнологичный способ получения инфекционного мицелия, сохраняющего жизнеспособность при высушивании, может применяться при производстве биопрепарата против бодяка полевого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bailey K.L., Falk S. Turning research on microbial bioherbicides into commercial products — a *Phoma* story. *Pest Technology*, 2011, 5(1): 73-79.
2. Hershenthorn J., Casella F., Vurro M. Weed biocontrol with fungi: past, present and future. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2016, 26(10): 1313-1326 (doi: 10.1080/09583157.2016.1209161).
3. Amsellem Z., Zidack N.K., Quimby P.C. Jr., Gressel J. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop Prot.*, 1999, 18(10): 643-649 (doi: 10.1016/S0261-2194(99)00070-8).
4. Berestetskiy A., Sokornova S. Production and stabilization of mycoherbicides. In: *Biological approaches for controlling weeds* /R. Radhakrishnan (ed.). TechOpen, 2018: 63-88 (doi: 10.5772/intechopen.76936).
5. Berestetskiy A.O., Kungurtseva O.V., Sokornova S.V. Can mycelial inoculum be an alternative to conidia in the case of *Stagonospora cirsií* J.J. Davis, a potential biocontrol agent of *Cirsium arvense*? *Proc. 13th EWRS Symposium «Current status and future prospects in bioherbicide research and product development»*. Bari, Italy, 2005: 7.
6. Sokornova S.V., Berestetskiy A.O. Production of virulent mycelial inoculum of *Stagonospora cirsií* Davis by liquid state fermentation. *Proc. XV Congress of European mycologists*. SPb, 2007: 204-205.
7. Amsellem Z., Zidack N.J., Charles P., Quimby Jr., Cohen B., Gressel J. Novel formulations of mycelia from liquid fermentation. *Proc. III International Weed Science Congress* /A. Légère (ed). Foz do Iguassu, Brazil, 2000: 379.
8. Dokken F. *Submerged fermentation of Colletotrichum truncatum for biological control of scentless chamomile*. *Master's thesis*. University of Saskatchewan, Saskatoon, 2007.
9. Makowski R.M.D. Effect of inoculum concentration, temperature, dew period, and plant growth stage on disease of round-leaved mallow and velvetleaf by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*. *Phytopathology*, 1993, 83: 1229-1234 (doi: 10.1094/Phyto-83-1229).
10. Ng S.C., Kadir J., Hailmi M.S., Rahim A.A. Efficacy of *Exserohilum longirostratum* on barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* spp. *crusgalli*) under field conditions. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2011, 21(4): 449-460 (doi: 10.1080/09583157.2011.554972).

11. Heiny D.K., Templeton G.E. Effects of spore concentration, temperature and dew period on disease of field bindweed caused by *Phoma proboscis*. *Phytopathology*, 1991, 81: 905-909 (doi: 10.1094/Phyto-81-905).
12. Гасич Е.Л., Берестецкий А.О., Хлопунова Л.Б. Влияние экологических факторов на патогенность *Calophoma complanata* в отношении борщевика Сосновского. *Микология и фитопатология*, 2018, 3(52): 207-216.
13. Jahromi F.G., Van De Ven R.J., Cother E.J., Ash G.J. The interaction between *Plectosporium alismatis* and sublethal doses of bensulfuron-ethyl reduces the growth of starfruit (*Damasonium minus*) in rice. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2006, 16(9): 929-940 (doi: 10.1080/09583150600828106).
14. Gressel J. Herbicides as synergists for mycoherbicides, and vice versa. *Weed Science*, 2010, 58(3): 324-328 (doi: 10.1614/WS-09-071.1).
15. Weaver M.A., Boyette C.D., Hoagland R.E. Rapid kudzu eradication and switchgrass establishment through herbicide, bioherbicide and integrated programmes. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2016, 26(5): 640-650 (doi: 10.1080/09583157.2016.1141175).
16. Wraight S.P., Jackson M.A., de Kock S.L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential* /T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan (eds.). CAB International, NY, 2001.
17. Bailey K.L. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens. In: *Integrated pest management: current concepts and ecological perspective* /D.P. Abrol (ed.). San Diego, Academic Press, 2014: 245-266 (doi: 10.1016/B978-0-12-398529-3.00014-2).
18. Van Lenteren J.C., Bolckmans K., Köhl J., Ravensberg W.J., Urbaneja A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 2018, 63: 39-59 (doi: 10.1007/s10526-017-9801-4).
19. Hershenhorn J., Casella F., Vurro M. Weed biocontrol with fungi: past, present and future. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2016, 26(10): 1313-1328 (doi: 10.1080/09583157.2016.1209161).
20. Boyette C.D., Hoagland R.E., Stetina K.C. Efficacy improvement of a bioherbicidal fungus using a formulation-based approach. *American Journal of Plant Sciences*, 2016, 7(16): 2349-2358 (doi: 10.4236/ajps.2016.716206).
21. Yu X., Hallet S.G., Sheppard J., Watson A.K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccoides*. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 1998, 20(6): 333-338 (doi: 10.1038/sj.jim.2900534).
22. *Методы экспериментальной микологии* /Под ред. В.И. Билай. Наукова Думка, Киев, 1982.
23. Jackson M.A., Cliquet S., Iten L.B. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2003, 13(1): 23-33 (doi: 10.1080/0958315021000054368).
24. Schisler D. A., Jackson M. A., Bothast R. J. Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. *Phytopathology*, 1991, 81(6): 587-590.
25. Aybeke M. Several pesta tablet trials with *Aspergillus alliaceus* Thom & Church for effective underground and aboveground *Orobanche* L. biocontrol. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 2016, 17(1): 65-70.
26. Tehranchian P., Adair R.J., Lawrie A.C. Potential for biological control of the weed Angled Onion (*Allium triquetrum*) by the fungus *Stromatinia cepivora* in Australia. *Australasian Plant Path.*, 2014, 43(4): 381-392 (doi: 10.1007/s13313-014-0279-6).
27. Schisler D.A., Jackson M.A. Germination of soil-incorporated microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* and colonization of seedlings of the weed *Sesbania exaltata*. *Can. J. Microbiol.*, 1996, 42(10): 1032-1038 (doi: 10.1139/m96-132).
28. Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L., Stewart A. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.*, 2012, 30(5): 250-258 (doi: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003).
29. Boyette C.D., Hoagland R.E., Weaver M.A., Stetina K.C. Interaction of the bioherbicide *Myrothecium verrucaria* and glyphosate for kudzu control. *American Journal of Plant Sciences*, 2014, 5: 394-395 (doi: 10.4236/ajps.2014.526413).
30. Duke S.O., Owens D.K., Dayan F.E. The growing need for biochemical bioherbicides. In: *Biopesticides: state of the art and future opportunities. ACS Symposium Series*. American Chemical Society, Washington, DC, 2014: 31-43 (doi: 10.1021/bk-2014-1172.ch003).
31. Yuzikhin O., Mitina G., Berestetskiy A. Herbicidal potential of stagonolide, a new phytotoxic nonenolide from *Stagonospora cirsii*. *J. Agr. Food Chem.*, 2007, 55(19): 7707-7711 (doi: 10.1021/jf070742c).
32. Duke S.O., Dayan F.E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. In: *Discovery and synthesis of crop protection products. ACS Symposium Series*. American Chemical Society, Washington, DC, 2015: 79-92 (doi: 10.1021/bk-2015-1204.ch007).

LIQUID FERMENTATION OF *Stagonospora cirsii* C-163, A POTENTIAL MYCOHERBICIDE FOR *Cirsium arvense* (L.) Scop.

S.V. Sokornova, A.O. Berestetskiy

All-Russian Research Institute of Plant Protection, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail toxbiotech@vizr.spb.ru (✉ corresponding author), s.sokornova@spbu.ru

ORCID:

Sokornova S.V. orcid.org/0000-0001-6718-4818

Berestetskiy A.O. orcid.org/0000-0002-0612-6996

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (grant № 16-16-00085 «Technologies for production and use of mycobiocides against difficult-to-eradicate weeds»)

Received May 20, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1054eng

Abstract

The bioherbicides should exhibit stable effectiveness in the field, be specific and quick in action, compatible with other preparations and meet market demand. In many ways, the cost and quality of product is determined by the technology of obtaining infectious material. An infectious material is used as a mycelium and its modifications and as conidia as well. The extreme sensitive of the mycelium to drying is often referred as main disadvantage of using it as the basis of a formulation. At the same time, the technological process of obtaining conidia is often more complicated, and the efficiency in the field is less than the mycelium has. The phytopathogenic fungus *Stagonospora cirsii* J.J. Davis, which is causative agent of a leaf spot disease of creeping perennial weeds in the family *Asteraceae*, is considered a potential mycoherbicide of Canadian thistle *Cirsium arvense* (L.) Scop. However, the yield of *C. cirsii* C-163 mycelium on standard nutrient media is significantly lower than that used in biotechnology (3 g/l). Our paper is the first to report that manipulation with liquid nutrient medium allows a significant increase in *S. cirsii* mycelium pathogenicity and tolerance to exciccation. The study is devoted to the optimization of liquid-phase deep fermentation parameters, as well as the duration of cultivation and composition of a nutrient medium, in order to obtain the *C. cirsii* C-163 mycelium with improved mycoherbicidal properties. This infection material is a good basis for development formulations that can be used both individually and jointly with other protective agents for perennial weed control. The advantage of the approach used in the work is that the resistance to drying, an important technological parameter which largely determines the success of the herbicides, was additionally considered, along with virulence and mycelial yield, during the optimization of fermentation parameters. The strain *C. cirsii* C-163 was used. The 10-day inoculum was obtained in Petri plates on potato dextrose agar medium. The mycelium was incubated in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of the medium at 130 rpm and 24±2 °C for 2-7 days. The base liquid nutrient media contained carbon source (20 g/l), organic (10 g/l) or inorganic (3.5 g/l) nitrogen source, yeast auto lysate (1 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), MgSO₄ (0.5 g/l). Dulcite, rhamnose, L-inositol, L-arabinose, D-sorbitol, glucose, trehalose, and sucrose were a source of carbon. Casein, soy peptone, enzyme peptone, soy flour, gelatin, lecithin, ammonium dihydrogen phosphate, ammonium chloride, ammonium sulfate, and sodium nitrate were a source of nitrogen was. The pH of all liquid nutrient media was adjusted to 6.0. To establish the optimum concentrations of sucrose and soy flour in a nutrient medium with yeast auto lysate (1 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), MgSO₄ (0.5 g/l), the amount of sucrose was changed from 10 to 70 g/l with a step of 10 g/l and the concentration of soy flour was changed from 5 to 20 g/l with a step of 2.5 g/l. The degree of leaf damage caused by disease was estimated by the necrosis area of leave disks or whole plants (5-6 true leaves). Drying of harvest mycelium, humidity 85-87 %, was carried out in a thin layer (1-2 mm) with flowing air at 30 °C without protectors for 3 hours. The highest yield of mycelium is when the carbon source in the nutrient medium is L-inositol. When inositol is substituted with sucrose or D-sorbitol, the biomass yield reduces by 25 %. At the same time, these nutrient media gave the most aggressive mycelium. Among nitrogen sources, the maximum yield of mycelium is in the case of casein, soy flour and enzymatic peptone. In the process of drying mycelium, loss of viability of propagules turned out to be significant. The mycelium obtained on sucrose-soy nutrient medium is the most resistant to drying. The most viable and aggressive mycelium was formed in the middle of the exponential growth phase which occurred on day 3 when cultivated in flasks on a soya-sucrose nutrient medium. Optimization of the concentration of soybean flour (15 g/l) and sucrose (60 g/l) makes it possible to increase the yield and aggressiveness of mycelium 12 and 4 times, respectively, as compared to Czapek medium. Thus, the present study provides a method for the preparation of a mycelium having a high aggressiveness to the host-plant and a capability to remain viable during drying. The prospects of such a method of obtaining an infectious material are proved.

Keywords: phytopathogenic fungi, *Stagonospora cirsii* J.J. Davis, *Cirsium arvense* (L.) Scop., Canada thistle, submerged liquid cultivation, carbon source, nitrogen source, mycelium, mycoherbicide.