

УДК 581.557

**МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ *TRICHODERMA VIRENS* –
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АУКСИНА
В МИКОРИЗНЫХ СООБЩЕСТВАХ**

© 2014 г.

И.В. Стручкова

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

annbril@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2014

Одной из причин стимулирующего влияния на растения грибов рода *Trichoderma* является выделение ими фитогормонов ауксинов. Установлена способность к синтезу ауксинов микроскопическим грибом *Trichoderma virens* (штамм ВКМ F-1117) при различных концентрациях в среде роста триптофана как предшественника. Наибольшие количества индолил-3-уксусной кислоты грибок выделяет при стационарном режиме культивирования и концентрации триптофана 5 мМ.

Ключевые слова: *Trichoderma virens*, ауксины, триптофан, микориза.

Введение

Широко распространенные в почвах микроскопические несовершенные грибы рода *Trichoderma*, являющиеся анаморфой аскомицетов рода *Hypocrea*, часто вступают в симбиотические отношения с различными растениями [1]. Известно, что в большинстве случаев это способствует лучшему развитию растений, их устойчивости к патогенам и другим неблагоприятным факторам внешней среды [2]. В частности, недавно показано, что инокуляция грибом *Trichoderma harsianum* Rifai растений *Vaccinium corymbosum* L. заметно (в 2–3 раза) увеличивает сухой вес побегов и корней этой ценной ягодной культуры [3].

Стимулирующий эффект на рост и развитие обеспечивается целым комплексом воздействий, в том числе – влиянием на растение выделяемых грибом ауксинов [4, 5]. Типичный ауксин – индолил-3-уксусная кислота (ИУК) – также важен при непосредственном формировании симбиотических связей гриба с растением, регуляции активности ряда ферментов и синтезе грибом вторичных метаболитов [5, 6]. В то же время способность к синтезу ИУК у разных видов и даже штаммов грибов варьирует в десятки и сотни раз [7]. Кроме того, грибы обычно синтезируют ИУК, используя в качестве предшественника триптофан [4], поэтому на продуцирование ими ауксинов способно влиять выделение разных количеств этой аминокислоты растением-хозяином.

Поскольку выявление ауксинпродуцирующей активности и возможностей ее стимуляции у различных представителей рода *Trichoderma*

представляется важным для поиска грибов – эффективных компонентов микоризных сообществ, целью нашей работы являлось исследование синтеза ИУК быстрорастущим и легко культивируемым микромицетом *Trichoderma virens* ВКМF-1117. Представляло интерес установить принципиальную возможность образования ИУК указанным штаммом, а также влияние на интенсивность данного процесса аминокислоты триптофана в среде роста как предшественника при синтезе ауксина.

Экспериментальная часть

Trichoderma virens ВКМF-1117 (ранее *T. viride* Persoon 1801, штамм ВКМF-1117), полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, выращивали на жидкой питательной среде Чапека в темноте при комнатной температуре в течение 14 суток. В опытных вариантах в среду вносили триптофан в концентрациях 0.5; 2.0 и 5.0 мМ. Использовали два режима культивирования: с перемешиванием на качалке со скоростью 200 об/мин и стационарный. Мицелий отфильтровывали и определяли его сырой и сухой вес.

ИУК выделяли из культуральной жидкости (КЖ) по методике Х. Хасана [8] с некоторыми модификациями и количественно определяли согласно схеме, представленной на рис. 1. Полученный с помощью роторного испарителя сухой остаток этилацетатного экстракта КЖ использовали для количественного определения ИУК спектрофотометрическим методом (СФ) по реакции Сальковского и для тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах *Silufol* в

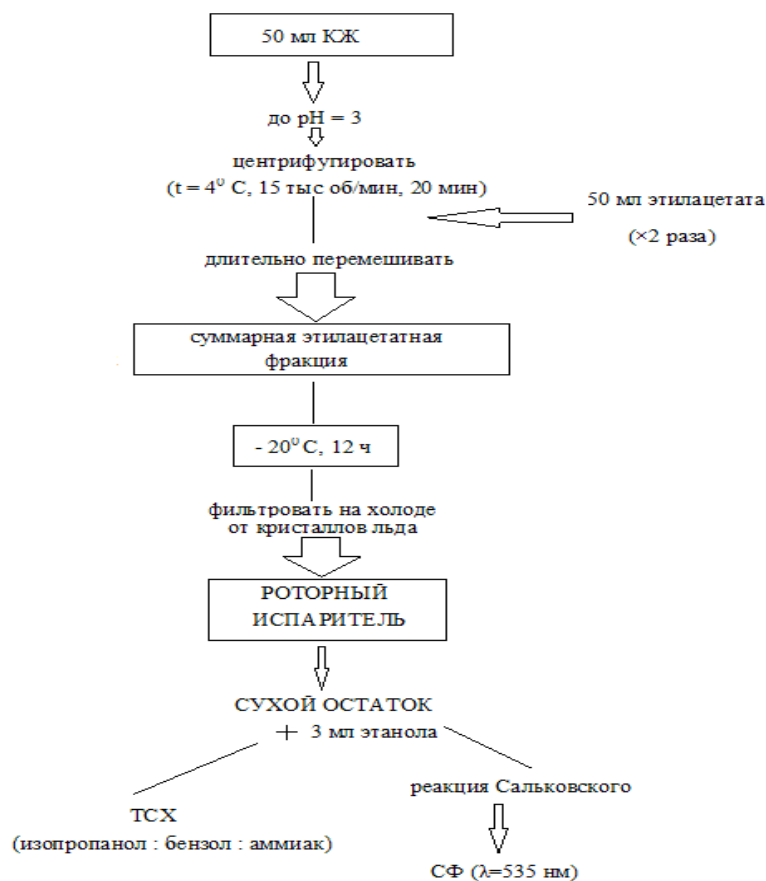


Рис. 1. Схема выделения и анализа содержания ИУК, продуцируемой грибом *Trichoderma virens* VKMF-1117

системе растворителей изопропанол : бензол : аммиак = 40 : 10 : 10 [9]. Количество ИУК определяли с использованием калибровочной кривой в мкМ КЖ. Также рассчитывали удельную ауксинпродуцирующую способность мицелия (мкг ИУК/мг сырого веса мицелия).

Статистическая обработка результатов двух независимых экспериментов (в трех биологических повторностях каждый) проводилась с использованием пакета электронных таблиц *Microsoft Excel*. На рис. 2, 3 представлено среднее арифметическое повторностей с указанием стандартной ошибки среднего. Достоверность различий определяли, используя коэффициент Стьюдента с поправкой Бонферрони (статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

Нами проводился анализ ауксинпродуцирующей способности микромицета *Trichoderma virens* VKMF-1117 при разных условиях культивирования: в питательной среде изменяли содержание триптофана, а также использовали разные режимы культивирования – стационар-

ный и с перемешиванием. Наличие ИУК в культуральной жидкости *Trichoderma virens* VKMF-1117 было подтверждено соответствием положению пятен метчиков (ИУК и триптофан) при тонкослойной хроматографии и цветом окрашивания в реакции Сальковского. Результаты количественного определения ИУК представлены на рис. 2.

Установлено, что как в отсутствие триптофана в среде роста гриба, так и при его концентрациях ниже 2 мМ синтез ИУК грибом был нестабилен, а продуцируемые количества ИУК малы. Внесение триптофана в указанных концентрациях не приводило к достоверным различиям с контрольными значениями (без добавления аминокислоты). Увеличение количества вносимого триптофана до 5 мМ при культивировании с перемешиванием также не вызвало достоверного усиления продуцирования ауксина, однако при стационарном культивировании привело к накоплению в культуральной жидкости количеств ИУК, более чем в три раза превышающих контрольные значения и более чем в два раза – значения при меньших концентрациях аминокислоты. Это указывает на способность исследуемого гриба

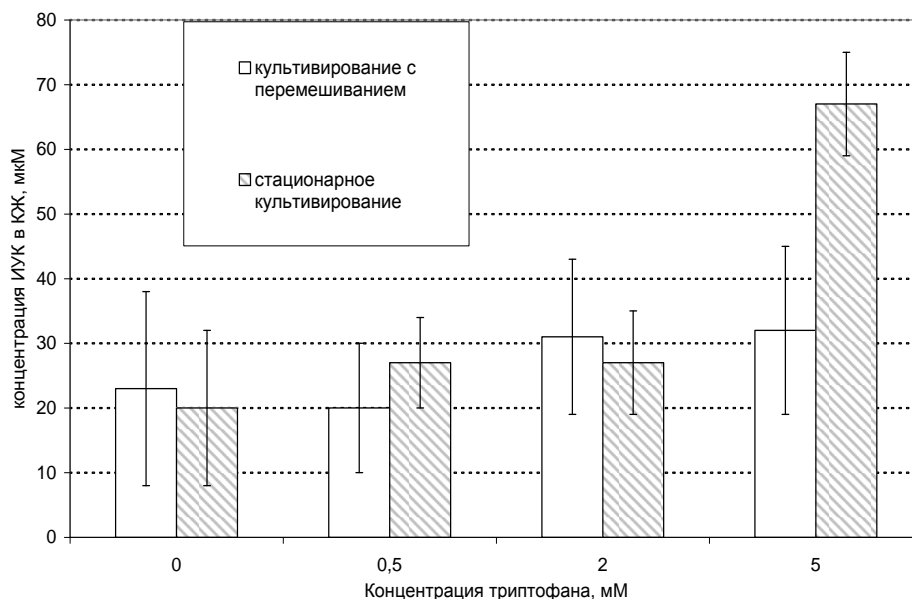


Рис. 2. Влияние концентрации триптофана на содержание ИУК в культуральной жидкости *Trichoderma virens* VKMF-1117 при разных способах культивирования

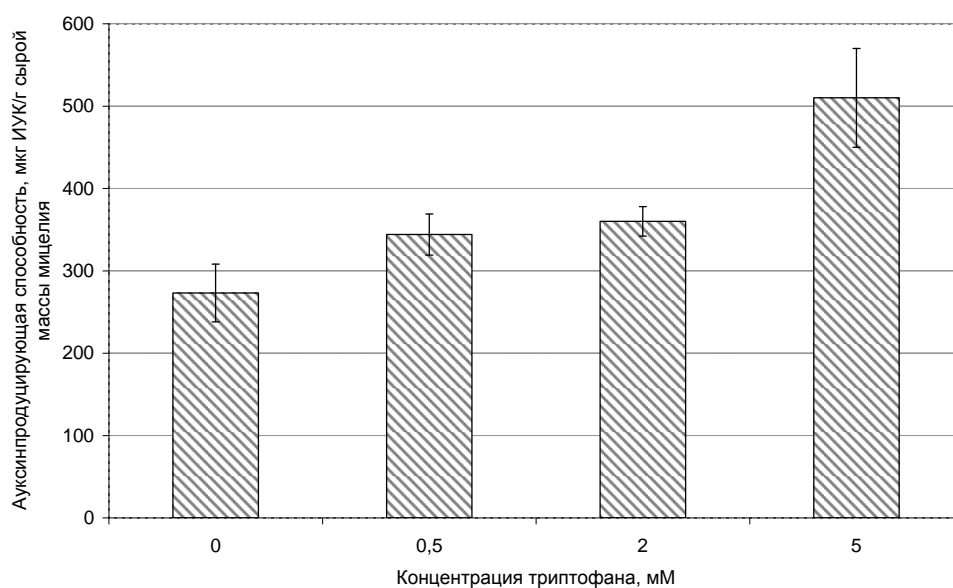


Рис. 3. Выделение ИУК биомассой гриба *Trichoderma virens* VKMF-1117 на средах с разной концентрацией триптофана

Trichoderma virens к усилению продуцирования ауксинов в присутствии триптофана. Вероятно, как и в случае других видов грибов, триптофан используется при синтезе ИУК как предшественник, однако этот эффект становится заметен лишь при достаточно высоких его концентрациях и стационарном культивировании, более близком наблюдаемому в почве развитию гриба, не нарушающему, в отличие от культивирования с перемешиванием, мицелий и не разбивающему мицелиальные скопления.

В связи с тем, что триптофан может использоваться грибами как источник питания и затрачиваться на рост мицелия, представляло интерес исследовать, какова способность продуцировать ИУК в расчете на единицу мицелиальной массы. В данном исследовании применяли только стационарное культивирование. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что продуцирование ИУК единицей массы мицелия возросло уже при 0.5 мМ триптофана, а при 5.0 мМ почти двукратно увеличивалось по сравнению с контролем. В то же время нелинейное возрастание

удельной ауксинпродуцирующей способности указывает на то, что не весь добавляемый триптофан используется для синтеза ИУК.

Заключение

Изучение способности к синтезу ИУК быстрорастущего и легко культивируемого микромицета *Trichoderma virens* ВКМФ-1117 показало его способность продуцировать ауксин. В связи с этим перспективно дальнейшее изучение указанного микроорганизма как компонента микоризных сообществ. В то же время следует учитывать, что продуцирование заметных количеств ауксина данным грибом возможно лишь при наличии достаточных количеств аминокислоты триптофана в среде роста мицелия (в изучавшихся условиях – 5 мМ).

Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности ННГУ им. Н.И. Лобачевского в соответствии с задачей 4.3 дорожной карты плана мероприятий по реализации программы о создании лабораторий ННГУ совместно с высокотехнологическими предприятиями.

Список литературы

1. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts // Nature Reviews. 2004. V. 2. P. 43–56.
2. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. *Trichoderma*–plant–

pathogen interactions // Soil Biology & Biochemistry. 2008. V. 40. P. 1–10.

3. Arriagada C., Manquel D., Cornejo P., Soto J., Sampedro I., Ocampo J. Effects of the co-inoculation with saprobe and mycorrhizal fungi on *Vaccinium corymbosum* growth and some soil enzymatic activities // Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2012. V. 12. № 2. P. 283–294.

4. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцова Т.А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 133–143.

5. Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortes-Penagos C. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2009. V. 149. № 3. P. 1579–1592.

6. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2008. V. 72. № 1–3. P. 80–86.

7. Hoyos-Carvajal L., Ordus S., Bissett J. Growth stimulation in bean *Phaseolus vulgaris* by *Trichoderma* // Biological Control. 2009. V. 51. № 3. P. 409–416.

8. Hasan H.A.H. Gibberellin and auxin production by plant root – fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction // Folia Microbiol. 2002. V. 48. № 3. P. 101–106.

9. Кошеев К.А., Баклашова Т.Г., Козловский А.Г. О гидроксировании индолил-3-уксусной кислоты грибом *Aspergillus niger* ИБФМ-F-12 // Прикладная биохимия и микробиология. 1977. Т. 13. № 2. С. 248–253.

MICROSCOPIC FUNGI *TRICHODERMA VIRENS* AS PROMISING AUXIN PRODUCERS IN MYCORRHIZAE COMMUNITIES

I.V. Struchkova

One of the reasons of fungi *Trichoderma* stimulating influence on plants is their auxin production. We have discovered that auxins can be synthesized by the microscopic fungi *Trichoderma virens* (strain BKM F-1117) with different concentrations of tryptophan as a precursor in the growth medium. Maximum indole-3-acetic acid amount was produced by the fungi under stationary cultivation conditions with tryptophan concentration of 5 mM.

Keywords: *Trichoderma virens*, auxins, tryptophan, mycorrhizae.

References

1. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts // Nature Reviews. 2004. V. 2. P. 43–56.
2. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. *Trichoderma* plant–pathogen interactions // Soil Biology & Biochemistry. 2008. V. 40. P. 1–10.
3. Arriagada C., Manquel D., Cornejo P., Soto J., Sampedro I., Ocampo J. Effects of the co-inoculation with saprobe and mycorrhizal fungi on *Vaccinium corymbosum* growth and some soil enzymatic activities //

Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2012. V. 12. № 2. P. 283–294.

4. Tsavkelova E.A., Klimova S.Yu., Cherdynytsova T.A. Mikroorganizmy – produtsenty stimulyatorov rosta rastenii i ikh prakticheskoe primenenie (obzor) // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2006. T. 42. № 3. S. 133–143.

5. Contreras-Cornejo H.A., Masías-Rodríguez L., Cortes-Penagos C. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2009. V. 149. № 3. P. 1579–1592.

6. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2008. V. 72. № 1–3. P. 80–86.
7. Hoyos-Carvajal L., Ordus S., Bissett J. Growth stimulation in bean *Phaseolus vulgaris* by *Trichoderma* // *Biological Control*. 2009. V. 51. № 3. P. 409–416.
8. Hasan H.A.H. Gibberellin and auxin production by plant root – fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction // *Folia Microbiol.* 2002. V. 48. № 3. P. 101–106.
9. Koshcheenko K.A., Baklashova T.G., Kozlovskii A.G. O gidroksilirovanii indolil-3-uksusnoi kisloty gri-bom *Aspergillus niger* IBFM-F-12 // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1977. T. 13. № 2. S. 248–253.