

А.Б. Исмагулова^{1*}, А.Д. Спанбаев¹, С.К. Наекова^{1,2},
Г.М. Салхожаева¹, З.С. Сармурзина²

¹Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

²Микроорганизмдердің Республикалық Коллекциясы, Астана, Қазақстан

*Байланыс үшін автор: altynai14.02@mail.ru

***Gliocladium catenulatum* саңырауқұлақтан алынған экстракттың *Botrytis cinerea* және *Fusarium oxysporum* фитопатогендеріне антифунгалдық әсері**

Аңдатпа. Бұл мақалада *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағының экстракттары алынып, Солтүстік Қазақстанда кең таралған фитопатогенді *Botrytis cinerea* және *Fusarium oxysporum* саңырауқұлақтарына антифунгалды қасиеті қарастырылды. Зерттеу нәтижесінде ауруға ұшырамаған құлпынай тамырынан *Gliocladium catenulatum* оқшауланды. Бұл микромицет-антогонист фитопатогендерге жоғары антифунгалды белсенділігін көрсетті, басылу аймағы орта есеппен – $35 \pm 0,05$ мм. *Fusarium oxysporum* фитопатогенінің антогонистке сезімталдығы *Botrytis cinerea*-ға қарағанда жоғарырақ екені анықталды. Мысалы, *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағының экстрактысы 30 рет сұйылтылған оңтайлы концентрациясы әсерінен *Fusarium oxysporum*-дағы басу аймағы – $26 \pm 0,03$ мм, ал *Botrytis cinerea*-да $24 \pm 0,03$ мм құрады.

Gliocladium catenulatum продуцентінің қарқынды өсуі мен дамуы үшін оңтайлы жағдай (өсіру ортасы, температура, көмірсуларды пайдалану, рН ортасы) беттік культивирлеу әдісімен анықталды.

Зерттеудің мақсаты – *Gliocladium catenulatum*-нен алынған экстракттардың *Botrytis cinerea* және *Fusarium oxysporum* фитопатогендеріне қарсы антифунгалдық қасиетін бағалау және болашақта дақылдардың өнімділігін арттыру үшін осы микромицетті фунгицидтік биологиялық препарат ретінде қолдану.

Түйін сөздер: *Gliocladium catenulatum*, фитопатогендер, антогонизм, антифунгалдық қасиет.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2023-145-4-71-85>

Кіріспе

Елімізде бау-бақша және ауылшаруашылық дақылдарында қоңыр жапырақ таты мен тамыр шіріктерінің жаппай дамуы көптеп байқалады. Егіннің үлкен шығынын азайту және болдырмау үшін өсімдіктер мен топырақ ағзасына зиянды әсер етпейтін микроорганизмдердің көмегімен биологиялық препараттарды жасау мақсатымыз болып табылады. Өсімдік инфекциясын жоюға, теңдестірілген табиғи қоректенуді енгізуге бағытталған агробиотехнологиялық шаралар ауру мен зиянкестердің таралуын азайтуға ықпал етеді. Бүгінгі таңда өсімдіктерді қорғаудың биологиялық шараларына ерекше назар аударылған. Оларды жоспарлау кезінде биологиялық препараттарды уақтылы қолдану ғана жоғары экономикалық тиімділікті қамтамасыз ететіндігін ескеру қажет [1].

Қазіргі таңда экологиялық және экономикалық тиімділігі зор биологиялық препаратты әзірлеу және кең түрде қолдану шет елдік ғылыми зерттеу зертханаларында

іске асырылуда. Атап айтқанда: Department of Life Sciences зерттеу орталығы, Modena and Reggio Emilia университеті, Каирского университетінің микробиология және ауылшаруашылық кафедрасы, Mansoura университетінің Botany кафедрасы, Египет, KiyoshiIsono антибиотикалық зертхана, физикалық және химиялық зерттеу институты, Жапония және т.б. [2, 3].

Дәнді дақылдардың аурулары жыл сайын егіннің 30% – азаюына, аурулардың 70%-ға дейін қолайлы дамуы елімізде жоғары шығынға әкеледі. Жыл сайын астық тұқымдарының септориозының жаппай дамуы мен таралуына саңырауқұлақ мицелийі түріндегі үлкен инфекциялық қоры өсімдік қалдықтарында және мицелий түрінде аңыздық егісте сақталады [4]. Патоген алдымен өлі тіндердің орнына орналасады. Ол өзінің улы секрецияларымен көрші тірі жасушаларды улайды, уақыт өте келе оларға еніп, оларды қоректену үшін пайдаланады. Яғни, аурудың қоздырғышы өзі улаған тіндерді тікелей қорек ретінде қолданады. Құлпынайдың сұр шірігі әсіресе ылғалды және суық ауа райында жидектер піскен кезде жиі кездеседі. Жидектердің гүлсидамы мен топырақпен байланысы, шіріген өсімдік қалдықтарының, шіріген сабанның немесе үгінділердің, ауру жидектердің болуы – мұның бәрі аурудың даму қарқындылығын арттырады. Механикалық тұрғыдан жәндіктер мен ұлудың шырыштары жидектерді қатты зақымдайды [5, 6, 7].

Қазіргі уақытта отандық нарықта «Хазраст Али Акбар» ЖШС және «Биомикол», «Биокенбид» өндірушісінен «Eco Save» компаниясынан БИОБАРС-М биопрепараттары әзірленіп, кеңінен қолданылады. «Биомикол» биологиялық өнімі – бактерицидтік әсері бар кең спектрлі фунгицид. Биологиялық препараттың белсенді құрамы-көптеген саңырауқұлақтар мен бактериялық өсімдік ауруларының көбеюін тежейтін *Bacillus subtilis* бактериялық культурасының тірі жасушалары мен споралары. Биологиялық өнім сәбіз, картоп, қызанақ, қияр, бұрыш, дәнді дақылдарды сақтау және өсіру кезінде қолдануға арналған. «Биокенбид» – бактериялық препарат, оның құрамына *Bacillus thuringiensis* споралары мен культура жасушалары, дельта-эндотоксин ақуыз кристалдары түрінде және бета-экзотоксиннен тұрады. «В»-маркалы МЭРС және БИОБАРС-М биологиялық өнімдері өсімдіктерді топырақтағы артық ылғалдан және зиянкестерден қорғайды [8, 9, 10, 11].

Зерттеу жұмысымыздың мақсаты – құлпынай жемістерінде кездесетін фитопатогенді саңырауқұлақтар *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*-ге антогонистік қасиеті бар *Gliocladium catenulatum*-нан алынған экстракттардың антифунгалдық қасиетін зерттеу.

Ғылыми зерттеу жұмыстары «Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті» ҚеАҚ, Астана, «Микроорганизмдердің Республикалық Коллекциясы» ЖШС, Астана жүргізілді.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зақымдалған және сау құлпынай жемістерінен саңырауқұлақ культурасын бөліп алу.

Микромицет саңырауқұлақтарды бөліп алу үшін сау және зақымдалған құлпынай сынамалары алынды (сурет-1). Алынған құлпынай сынамалары стерильді табақшаға салынып, тазартылған суда 2-3 минут ұсталды. Содан кейін 40 секунд ішінде 95% этанолмен жуылып, одан әрі 3 минут 10% дезинфекциялаушы «Дезотабс» ерітіндісінде ұсталды. 40 секунд ішінде 70% этанолмен, содан кейін 40 секунд ішінде тазартылған сумен жуылды. Алынған құлпынай сынамаларын таза құрғақ табақшаға стерильді пинцетпен салынды, зақымдалған бөліктерін 1x1 мм кішкене бөліктерге кесілді. Саңырауқұлақтарды сау және зақымдалған құлпынайдан бөліп алу үшін *Chapek dox agar* және *Potato dox agar* қоректік орталары қолданылды. Табақшаларды инкубациялау уақыты 26-28°C температурада 7 тәулікті құрады.



Сурет 1. Патогенді саңырауқұлақтармен зақымдалған құлпынай жемістері

Зерттеу әдістері

Саңырауқұлақтардың жинақталған культураларын алу.

Саңырауқұлақтардың өсіп келе жатқан колониялары тиісті ортасы бар пробиркаларға егілді, алынған сынама әрі қарай зерттеу үшін бастапқы материал болып табылды. Бактериялардың өсуін тежеу үшін Петри табақшасына 0,01% мөлшерде ампициллин антибиотигі қосылды. Петри табақшасы 4 секторға бөлінді, әр секторға құлпынайдың 1-ші кішкене бөлігі салынды. Инкубациялау 7 тәулік ішінде қараңғы жерде бөлме температурасында жүргізілді. Содан кейін олар жұқтырған және сау құлпынайдан саңырауқұлақ культурасы тазартылды. алынған егу материалының тазалығы мен біртектілігіне микробиологиялық бақылау жүргізілді. Бірнеше рет қайта егу нәтижесінде құлпынайдан бөліп алынған микромицеттерді микроскопиялау көмегімен туыстық және түрлік құрамы анықталды [12, 13, 14, 15].

Саңырауқұлақ культурасын молекулярлық-генетикалық идентификациялау.

Саңырауқұлақ культурасы 2 мл стерильді пробиркада екі шыны шарикпен (6 мм) 30Hz, 15минут MM300 mixerMill құрылғысында гомогенизацияланды. Содан кейін 350 мкл СТАВ ерітіндісін қосып, араластырып, 700 мкл хлороформ-изоамил спирті ерітіндісін (24:1) қосып, мұқият араластырып, 10 минут тұндырып, супернатантты таза пробиркаларға ауыстырылды. Содан кейін 700 мкл хлороформ-изоамил спирті ерітіндісі (24:1) қосылып, 65°С температурада 60 минут инкубацияланды, мұқият араластырылды және 10 минут ішінде 12000 айн/мин центрифугаланды. Центрифугалаудан кейін су фазасы жаңа таза пробиркаларға ауыстырылды және ДНҚ изопропил спиртінің көлемімен алынды. Әрі қарай, бір минут ішінде 12000 айн/мин центрифугаланды. Колонка шайғыш буферімен (80% этанол, 10 мМ Tris-HCl, рН 8,0) 2 рет жуылды. ДНҚ үлгілері 100 мкл ТЕ буферде ерітіліп, -20°С температурада сақталды. Толқын ұзындығы 280 нм болатын NANODROP спектрофотометрін қолдана отырып, ДНҚ концентрациясы спектрофотометриялық әдіспен өлшенді.

ITS аймағын амплификациялау.

ПТР реакциясы праймерлерді ITS (5'-GCTCCCGGTCACCTGAYTTTAT-3' және ITS 1-г (5'- ATGACACCCACAGGACGGTCTG-3') қолдана отырып жүргізілді. ПТР қоспасында 15 нг ДНҚ, 1 бірлік Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 мМ дНТФ, 10 x*КCl буфері (Fermentas), 2,5 мМ MgCl₂, әрбір праймер мөлшері 10 пмоль құрады. ПТР амплификациясы ұзақ мерзімді денатурацияны құрады: 95°С 6 минут; 35 циклден: 94°С 30 секунд, 57°С 30 секунд, 72°С 1 мин, соңғы элонгация 72°С 9 минут жүргізілді. ПТР бағдарламасы Simpli Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems) амплификаторында орындалды.

Нуклеотидтер жүйелігін анықтау. ПТР өнімдері байланыспаған праймерлерден тазарту экзонуклеаза I (ферменттер) және сілтілі фосфатазды *Shrimp Alkaline Phosphatase*, *Fermentas* ферментативті әдіспен жүргізілді.

Секвенирлеу реакциясы өндірушінің нұсқауларына сәйкес *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* қолдану арқылы жүзеге асырылды, содан кейін фрагменттерді 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) автоматты генетикалық анализаторында бөлінді.

Нуклеотидтер жүйелігін талдау.

Нуклеотидтер тізбегі SeqMan (DNA Star) бағдарламасында талданды және жалпы тізбекке біріктірілді. Осыдан кейін сапа көрсеткіші төмен соңғы фрагменттер алынып тасталды (праймерлердің нуклеотидтер тізбегі). Алынған тізбектер Genebank-те BLAST алгоритмі бойынша анықталды [16, 17, 18].

Gliocladium catenulatum өсіру жағдайларын оңтайландыру және ферментациялау.

Зерттелетін микромицет *Gliocladium catenulatum* фитопатогендерге қарсы антогонистік қасиеті бар екендігі әдеби шолуларда анықталды [11]. Осы продуцентті өсіруде қолайлы орта жағдайларын анықтауда *Chapek dox agar*, *Potato dox agar* екі түрлі өсіру орталары пайдаланылды. Қолайлы өсіру температурасын анықтауда Петри табақшаларында стандартты *Chapek dox agar* ортасына егілді және әртүрлі температурада термостаттарда өсірілді. Микромицеттердің өсуі мен морфологиясы 0°C-тан +35°C-қа дейінгі диапазонда 1-5 тәулік бойы зерттелді. Оңтайлы рН мәнін анықтау үшін микромицеттер рН 5,0-ден 9,0-ге дейінгі әр түрлі диапазоны бар стандартты өсіру ортасын қолдана отырып, беттік өсірілді. Қарқынды өсу мен даму үшін көміртектің әртүрлі көздері (глюкоза, сорбитол, маннитол, крахмал) алынды [12]. Егу материалын дайындау *Chapek dox broth* ортасында 750 мл көлеміндегі Эрленмейердің тербелмелі колбаларында, 250 мл қоректік ортаның көлемімен және 2% - мөлшерінде егу материалы алынды. Қатты орта ретінде бидай кебегі 1% глюкоза қосылған, 28°C және рН 8 температурада 10 тәулік бойы жүргізілді. Өсірілген микромицеттерден биологиялық белсенді заттарды алу кезінде этил спирті еріткіш ретінде пайдаланылды. Этил спирті буландырғыш ротордың көмегімен толық буланғаннан кейін қою биологиялық белсенді зат алынды. Алынған сығындыдан 1:30 қатынасында ерітінді дайындалды және антифунгалды белсенділікті анықтау үшін қолданылды. Еріткіш ретінде диметилсульфоксид (DMSO) қолданылды [19, 20, 21].

Саңырауқұлақ культурасының антифунгалды белсенділігін анықтау.

Саңырауқұлақтардың антифунгалды қасиеттері агарға диффузия әдісімен анықталды. Агар пластинасының қалыңдығында диаметрі 8 мм саңылаулар жасалды, содан кейін фитопатогендер агардың бетіне егілді, одан әрі сыналатын биологиялық белсенді зат *Gliocladium catenulatum* саңлауларының әр түрлі концентрациялары (1:10, 1:20, 1:30, 1:40) енгізілді. Зерттелетін антогонист саңырауқұлақтан алынған экстракттардың сынақ культураларының өсуіне тежеу аймағының диаметрі 3 және 5-ші тәулікке бағаланды. Алынған нәтижелер белгілері: 0-белсенділік жоқ, 12 мм-ге дейін - әлсіз сезімтал, 13-тен 29 мм-ге дейін-орташа сезімтал, 30 мм және одан жоғары-жоғары сезімтал дегенді білдіреді [22, 23].

Статистикалық өңдеу. Барлық эксперименттер үш биологиялық және аналитикалық қайталануларда жүргізілді. Алынған нәтижелерді статистикалық өңдеу STATISTICA 8.0 бағдарламасын қолдану арқылы жүргізілді [15].

Зерттеу нәтижелері

Саңырауқұлақ культураларының культуральді-морфологиялық және физиолого-биохимиялық ерекшеліктері.

Gliocladium catenulatum культурасы сау құлпынай тамырынан, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* фитопатогендермен зақымдалған жемістерінен бөліп алынды. Саңырауқұлақтар келесі культуральді -морфологиялық және физиолого-биохимиялық ерекшеліктерімен сипатталды:

Botrytis cinerea -грам-оң саңырауқұлақ. Гифтері кең, қара, бөліктерден тұрады. Конидиофорлары қара, ұзын, тармақталған, жоғарғы жағында тармақтары бар (ағаш тәрізді). Тармақтары дөңгелек немесе сопақ пішінді, ұштарында конидиялары бар

ісінген. Конидиялар түссіз, жинақталған түрі әлсіз түтінді-сұр немесе ашық қоңыр, қысқа тісшелерде орналасқан. Конидиялардың мөлшері (10-18) x (7-10) мкм. Конидиофорлар түссіз немесе бозғылт қоңыр, тармақталған түзу, ұзындығы 2 мм, қалыңдығы 16-30 мкм. Саңырауқұлақ қара немесе қара түсті склероцияларды құрайды, олардың мөлшері субстраттың қасиеттеріне байланысты. Саңырауқұлақтың өсуі тез (колониялар 3-5 күн ішінде қалыптасады). Колониялар үлпілдек, басында ақ түсті, жасына қарай сұр немесе қоңыр түске ие болады. Колониялардың артқы жағы қара. (сурет-2)

Fusarium oxysporum грам-оң зең саңырауқұлағы. *Fusarium* тез өсуімен ерекшеленеді. Чапек қоректік ортасында үлпілдек, киіз, тегіс, ақ, қызғылт, қызғылт сары, күлгін, қоңыр түсті колонияларды құрайды. Микроскопиялау кезінде фиалидтер спородохияда топтастырылуы мүмкін екендігі байқалды, олардан орақ пішінді макроконидиялар пайда болады, 2-7 жасушалы. Микроконидиялар 1-2 жасушалы, дөңгелек, сопақша, кейде сәл қисық. Жалған бастар немесе тізбектер түзеді. Жетілген культураларды хламидоспоралар түзіледі. (сурет-2)

Gliocladium catenulatum *Deuteromyces* класына, *Moniliales* қатарына, *Gliocladium* туысына жатады. Саңырауқұлақ келесі сипаттамаға ие: Чапек қоректік ортасында колониялары жапырақ тәрізді-үлпілдек, жасыл түсті, спора түзу колонияның ортасында жүреді. Конидиеносцалар кедір-бұдырлы, ұзындығы шамамен 100 мкм құрайды, тармақтары 15-20x4 мкм, метулалар 7-10x2,5 мкм, фиалидтер 10-20x2 мкм. Конидиялар эллипсоидты 4-8x3-4 мкм, ұзын шырышты бағандарда тегіс, ашық жасыл. Көміртек көздерінен глюкоза, галактоза, сахароза, мальтоза, фруктоза, арабиноза, рамнозаны сіңіреді. Нитрат, нитрит және аммоний азотын жақсы сіңіреді. (сурет-2)

Чапек дох агар ортасында культивирленген саңырауқұлақтар



Botrytis cinerea

Fusarium oxysporum

Gliocladium catenulatum

Potato dox агар ортасында культивирленген саңырауқұлақтар

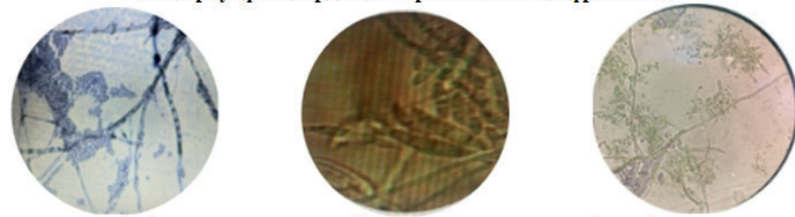


Botrytis cinerea

Fusarium oxysporum

Gliocladium catenulatum

Саңырауқұлақтардың микроскопиялық құрылымы



Botrytis cinerea

Fusarium oxysporum

Gliocladium catenulatum

Сурет 2. Саңырауқұлақтардың морфологиялық белгілері

Саңырауқұлақтардың культуральді-морфологиялық және физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеумен бірге, культуралардың сәйкестендіру дұрыстығын растау үшін олардың рРНҚ нуклеотидтер тізбегін, сондай-ақ ITS1 және ITS2 аймақтарының тізбегін ішінара 18S, 28S және толық 5.8S анықтау жүргізілді. Молекулалық-генетикалық сәйкестендіру нәтижесінде бұл саңырауқұлақтардың *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium catenulatum* түрлеріне жататындығы расталды (гомологиялық деңгейі - 99%) (кесте-1).

Кесте 1

ITS аймақтарының нуклеотидтер тізбегін талдау әдісімен сәйкестендіру нәтижелері

Штам атауы	ITS генінің жүйелік фрагменті	Халықаралық мәліметтер базасында нуклеотидтер тізбегін анықтау (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) BLAST алгоритмі		
		Инвентарлық нөмері GeneBank (Accession number)	Штам атауы	% сәйкестік
	TCATTACAGAGTTCATGCCCGA AAGGGTAGACCTCCCACCCCTT GTGTATTATTACTTTGTTGCTTT GGCGAGCTGCCTTCGGGCCTT GTATGCTCGCCAGAGAATACCA ACTCTTTTATTAATGTCGTCT GAGTACTATATAATAGTTAAAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGG TTCTGGCATCGATGAAGAACGC AGCGAAATGCGATAAGTAATGT GAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCTTGGTATCCGGGGG GCATGCCTGTTGAGCGTCATT TCAACCCTCAAGCTTAGCTTG GTATTGAGTCTATGTCAGTAA TGGCAGGCTCTAAAATCAGTGG CGGCGCCGCTGGGTCCCTGAAC GTAGTAATTATCTCTCGTTACA GGTCTCGGTGTGCTTCTGCCA AAACCCAAATTTTCTATGGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGGA TACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAA	KP900730.1	<i>Botrytis Cinerea</i>	99%

<p>GACTATCGTGGAGTCAATATCT GCAACAGGAGGAATCATAGC CCCGTTTGTTCATCATGCCCG CGTACAGATTCCCTCCCGTTGG GTGGATAATGACCTAGACGAGC AGGCTACGATAGTCACAACACC AAAAGGCTATATCGACAATATC ACGGCACAGG ACTTCTTTGACC ACTTTGAGAGACTTACCCGG CCTCAAAATACATCAGATCT TCGAGTTATTCTTTATGATGG ATGTGAAAGTCATTTACCA AAGAGCTTTATCAGAAAGCT CTAGATGCGAATATTATCTTA TATCCCTTCCCTCCTCATCTG ACGCATATACTTCAGCCGTTA GATGTTGGATTATTCAGTACA TATAAGCATTGGCATCAGGA AGCCTTACTTAGGGAAATCG CTGACGGTGCTACGGACTTT AATAAAGCTGACTTTATGTTT CATTTACAGGAGATTCGCCG CAAAGCTACTAAGAAAAGTA CTATCATCTCATCGTGGGCGA AATCCGGCATCTATCCTCTTG ATCCCTCCGTTGTTATCAACA A A A T G G T C A A C C C T C T T T CATCCCTATCTTTGGAGGTTG CTGAACGTGATCTTCCCGGCT ATATCACACCTGGGTTATCTTC CA</p>	<p>JAHEVI010000015.1</p>	<p><i>Fusarium Oxysporum</i></p>	<p>99%</p>
<p>TGCTTCGTTTTTCGAAGATTA ATGTGCTAACCAGTGACTTTCC CCCCATAATAGGTTTCATCTTCA GACCGGTCAGTGCGTAAGTTG TTGCTCCTCCCANACGGGCTTT TGCCTGGTGATTGATTCTGCGG GGTGCTAACCTTGGTCGTTGAA AAGGGTAACCAAATTGGTGCT GCTTTCTGGCAAACCATCTCTG GCGAGCACGGCCTCAACAGCA ATGGTGTCTACAGCGGCACCTC CGAGCTCCAGCTCGAGCGCAT GAACGTCTACTTCAACGAGGT ATGTCCANACCGAGCTTGACA TATTCTGGNGATGATTTTCATC CTCTGACCGANATTTGGGTATA GGCCTCTGGCAACAAGTATGT TCCTCGCGCTGTCCTCGTCGAT CTTGAGCCCGGTACCATGGAT GCCGCCGCGCTGGACCTTTTG GCCAACT</p>	<p>AF133571.1</p>	<p><i>Gliocladium catenulatum</i></p>	<p>99%</p>

***Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағының өсуіне температураның, рН және субстраттардың әсерін зерттеу**

Қолайлы температура мен рН таңдау үшін әртүрлі температура мен рН мәндерінде *Gliocladium catenulatum* өсіру процесінде биомассаның өсу жылдамдығының өзгеру заңдылығы арқылы зерттелді. Алынған нәтижелер 2 және 3-кестеде келтірілген.

Кесте 2

***Gliocladium catenulatum* культураның өсу аймақтарының әртүрлі температура мәндеріне тәуелділігі, мм**

Температура °С	Колония диаметрі, мм		
	3-тәулік	5-тәулік	7-тәулік
24	0±0,04мм	50±0,1мм	70±0,2мм
28	10±0,04мм	24±0,1мм	80±0,2мм
32	8±0,04мм	15±0,1мм	70±0,2мм

Кесте 3

***Gliocladium catenulatum* культураның өсу аймақтарының әртүрлі рН мәндеріне, мм**

рН	Колония диаметрі, мм		
	3-тәулік	5-тәулік	7-тәулік
8,0	10±0,04мм	55±0,1мм	65±0,2мм
7,5	10±0,04мм	25±0,1мм	55±0,2мм
7,0	8±0,04мм	15±0,1мм	20±0,2мм

Кесте 4

Әртүрлі көмірсулармен бидай кебегі гидролизатының қатынасы

Көмірсулар көздері углерода	Жалпы өсу жылдамдығы	Биомассаның максималды мөлшері, г/л
Глюкоза	0,0023±0,0001	0,45±0,0001
Сорбит	0,0022±0,0001	0,38±0,0001
Крахмал	0,0021±0,0001	0,39±0,0001
Маннит	0,0020±0,0001	0,40±0,0001

Алынған тәжірибе нәтижелерінен бидай кебегінің гидролизаты үшін қолайлы температура 28°C екені анықталды, культураны өсірудің 7-ші тәулігінде биомассаның максималды өсу қарқындылығы байқалады, өсіру температурасы 24°C дейін төмендеген кезде культураның өсуі баяулайды.

3-кестеде келтірілген нәтижелер бойынша *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағының қолайлы рН ортасы- 8,0 мәні таңдап алынды. Бұл рН мәнімен колониялардың диаметрі 65 мм құрады.

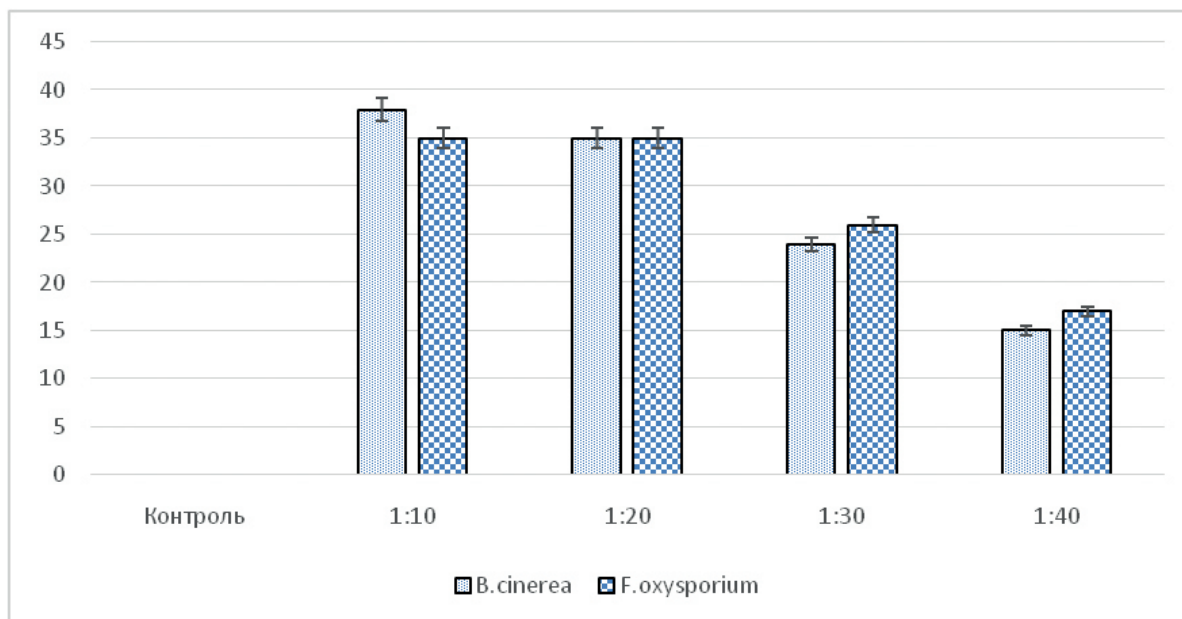
Саңырауқұлақтардың өсуі мен дамуы үшін әртүрлі көміртегі көздері қолданылады: глюкоза, сорбит, маннитол, арабиноза, крахмал, лактоза. Өндірушіге байланысты индуктордың (ксилозаның) басқа көміртегі көзіне қатынасы өзгереді. Ксилоза ортасын енгізу экономикалық тұрғыдан тиімсіз, өйткені бұл тапшы және қымбат моносахарид. Ксилоза көзі ретінде ксилоза және ксилан бар шикізат жиі қолданылады: сабан, бидай және күріш кебегі, жүгері сабағы, астық және мақта қабығы. Ең жақсы нәтижелер құрамында пентозалардың едәуір мөлшері бар ксилан бар шикізаттың гидролизаттарын орта құрамына енгізу арқылы алынады. Жүргізілген зерттеулерде глюкоза, сорбит, маннитол,

крахмал қосылған бидай кебегі гидролизатының қоспалары көміртегі көзі ретінде пайдаланылды. Әр түрлі көміртегі көздері бар бидай кебек гидролизаты қоспасының ең оңтайлы құрамы таңдалды, ол-глюкоза. Зерттеу нәтижелері 4- кестеде келтірілген.

Антифунгалды белсенділікті анықтау *Gliocladium catenulatum*

Gliocladium catenulatum экстаркттарының түрлі концентрациясының (1:10, 1:20, 1:30) антифунгалды белсенділігі 3 тәуліктен соң анықталды. Алынған нәтижелер келесідей белгіленді: 0-белсенділік жоқ, 12 мм-ге дейін-әлсіз сезімталдық; 13-тен 29 мм-ге дейін- орташа сезімталдық, 30 мм және одан жоғары-жоғары сезімталдық.

Үш түрлі концентрациялармен қатар, бақылау ретінде *Диметилсульфоксид DMSO* экстракты ерітуге қолданылған органикалық еріткіш қолданылды. *Диметилсульфоксид* еріткіші болған бақылау табақшасында еш басылу аймағы түзілмеді. Демек, оның антифунгалдық қасиетке еш қатысы жоқ екені байқалады. *Botrytis cinerea* сығынды концентрацияның неғұрлым төмендеген сайын оның антифунгалдық қасиеті де төмендеді. 1:10 ең үлкен концентрациялы сығындысы бар *Fusarium oxysporum* фитопатогенінің басу аймағының орташа мәні -35 мм, *Botrytis cinerea*-38 мм. Сығындының орташа концентрациясында (1:20) екі фитопатогенде де-35 мм бірдей мән көрсетті. 30 рет сұйылтылған кезде белсенділік 37%-ға төмендеді, ал 40 рет сұйылтылған сығынды белсенділігін 60%, 50 рет сұйылтылған кезде сығынды белсенділігін толығымен жоғалтады, сондықтан ең оңтайлы нұсқа-30 есеге дейін екені анықталды. Зерттеу нәтижесінде *Fusarium oxysporum* патогендері *Botrytis cinerea*-мен салыстырғанда алынған экстрактқа сезімтал екендігі анықталды. Мысалы, орташа есеппен 30 рет сұйылтылған кезде, *Fusarium oxysporum*-дағы басу аймағы 26 мм, ал *Botrytis cinerea*-да 24 мм болды.



Сурет 4. Түрлі концентрациядағы экстракттардың антифунгалдық көрсеткіш нәтижелері

Қорытынды

Қорытындылай келе, фитопатогендермен зақымдалған құлпынай жемістерінен зерттеу нәтижесінде өте кең таралған саңырауқұлақтар *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* және құлпынайдың сау тамырынан *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағы бөлінді.

Әрбір оқшауланған микроорганизмге культуралық-морфологиялық және микроскопиялық зерттеулер келтірілді, сондай-ақ нуклеотидтер тізбегіне талдаулар жүргізілді және қай түрге жататындары анықталды. Биологиялық белсенді зат түзуші яғни фунгицидтік қасиеті бар *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағына беттік культивирлеу әдісі арқылы барлық өсіру жағдайлары оңтайландырылды (температура 28°C, рН-8,0, бидай кебегіне 1% глюкозаның қосылуы биомассаны арттырады). Одан әрі ферментациялау нәтижесінде алынған биомасса ротор-буландырғыш арқылы концентрленіп, саңырауқұлақ экстракті алынды. Алынған экстракттардан үш түрлі концентрация дайындалып (1:10, 1:20, 1:30, 1:40), *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* фитопатогендеріне антифунгалдық зерттеулер жүргізілді. Зерттеулер нәтижелері көрсеткендей, сығынды концентрациялары патогендердің өсіп дамуын тежеді және жоғары белсенділік көрсетті, басылу аймағы орта есеппен 35±0,05мм. *Fusarium oxysporum* фитопатогенінің антогонистке сезімталдығы *Botrytis cinerea*-ға қарағанда жоғарырақ екені анықталды. Мысалы, *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағының экстрактысы 30 рет сұйылтылған оңтайлы концентрациясы әсерінен *Fusarium oxysporum*-дағы басылу аймағы 26±0,03 мм, ал *Botrytis cinerea*-да 24±0,03 мм құрады.

Қорытындылай келе, еліміздің ауылшаруашылық дақылдары мөлшерін арттыру мақсатында *Gliocladium catenulatum* саңырауқұлағынан *Fusarium Oxysporum*, *botrytis cinerea* фитопатогендеріне қарсы фунгицидтік биологиялық препарат жасауға болады.

Қаржыландыру. Бұл зерттеулерді (IRN BR18574066) Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігі, ғылым комитеті қаржыландырды.

Әдебиеттер тізімі

1. Harman G.E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity // *New Phytologist*. – 2011. – Vol. 189(3). – P. 647-649.
2. Baudoin E., Benizri E., Guckert A. *Appl. Soil Ecol.* – 2002. – Vol. 19(2). – P. 135-145.
3. Frankenberger W.T., Arshad M. *Phytohormons in Soil: Microbial Production and Function*. – New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. – 503 p.
4. Leveau J., Lindow S. *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – P. 2365-2371.
5. Duffy B., Keel C., Defago G. *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70(3). – P. 1836-1842.
6. Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2002. – Vol. 81(1-4). – P. 537-547.
7. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1998. – Vol. 36. – P. 453-483.
8. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. – Киев «Наукова думка», 1982. – С. 552.
9. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварица А.Е., Рогожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2015. – №51(3). – С. 215-225.
10. Rankovic B., Mistic M., Sukdolac S. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla* // *Br. J. Biomed. Sci.* – 2007. – Vol. 64(4). – P. 143-148.
11. Yassin A.M., El-Deeb N.M., Metwaly A.M., El Fawal G.F., Radwan M.M., Hafez E.E. *Applied biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 182. – P. 1675-1693.
12. Metwaly A.M., Fronczek F.R., Ma G., Kadry H.A., Atef A., Mohammad I.A.-E., Cutler S.J., Ross S.A. *Tetrahedron letters*. – 2014. – Vol. 55. – P. 3478-3481.
13. Metwaly A.M., Kadry H.A., Atef A., Mohammad A.-E.I., Ma G., Cutler S.J., Ross S.A. *Phytochemistry letters*. – 2014. – Vol. 7. – P. 1-5.
14. Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U. Optimization of culture conditions for lichen *Usneaghattensis* G. Awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production // *Food Technol. Biotechnology*. – 2009. – Vol. 47(7). – P. 12.
15. Howell C.R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases // *J. Phytopathology*. – 2006. – Vol. 96(2). – P. 178-180.
16. Hassine M., Jabnoun-Khiareddine H., Aydi Ben Abdallah R., Daami-Remadi M. In vitro and In vivo Antifungal Activity of Culture Filtrates and Organic Extracts of *Penicillium* sp. and *Gliocladium* spp. against *Botrytis cinerea* // *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. – 2017. – Vol. 8(12). – P. 2-9.
17. Arifova Z.I. Influence of microbiological preparations on morphostructure, yield, and quality of raspberries // *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. – 2019. – Iss. 1(17). – P. 6-12.
18. Akram S., Khan S.M., Khan M.F., Khan H.U., Tariq A., Umar U.U., Gill A. Antifungal activity of different systemic fungicides against *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici* associated with tomato wilt and emergence of resistance in the pathogen // *Pakistan Journal of Phytopathology*. – 2018. – Vol. 30(2). – P. 169-176.
19. El-Sayed M.T., El-Sayed A.S.A. Bioremediation and tolerance of zinc ions using *Fusarium solani* // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6(e05048). – P. 235-244.
20. Skugoreva S.G., Kantor G.Ya., Domracheva L.I., Kutyavina T.I. Comparative analysis of the effectiveness of the use of sorbents of different nature with respect to copper(II) ions // *Theoretical and Applied Ecology*. – 2018. – No. 3. – P. 12-18.
21. Skugoreva S.G., Kantor G.Ya., Domracheva L.I., Sheshegova T.K. Assessment of sorption abilities of various species of *Fusarium* micromycetes in relation to heavy metal ions // *Theoretical and Applied Ecology*. – 2019. – No. 4. – P. 102-109.
22. Yang J.H., Wang J.H., Guo W.B., Ling A.R., Luo A.Q., Liu D.Y., Yang X.L., Zhao Z.H. Toxic effects and possible mechanisms of deoxynivalenol exposure on sperm and testicular damage in BALB/c mice // *J. Agric. Food Chem.* – 2019. – Vol. 67(8). – P. 2289-2295.
23. Домрачева Л.И., Фокина А.И., Скугорева С., Ашихмина Т.Я. Почвенные грибы рода *Fusarium* и их метаболиты: опасность для биоты, возможность использования в биотехнологии // *Теоретические проблемы экологии*. – 2021. – №12 – С. 6-15.

А.Б. Исмагулова¹, А.Д. Спанбаев¹, С.К. Наекова^{1,2}, Г.М. Салхожаева¹, З.С. Сармурзина²
¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан
²Республиканская коллекция микроорганизмов, Астана, Казахстан

Противогрибковое действие экстракта гриба *Gliocladium catenulatum* на фитопатогены *Fusarium oxysporum* и *Botrytis cinerea*

Аннотация. В данной статье рассматривается антифунгальное свойство экстракта, полученного от ферментации *Gliocladium catenulatum*, на широко распространенные фитопатогенные грибы сельскохозяйственных культур в Северном Казахстане, как *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*. В результате исследований микромицет-антагонист, выделенный из корня здоровой клубники *Gliocladium catenulatum*, показал высокую антифунгальную активность с зоной подавления 35±0,05мм. Выявлено, что штаммы *Fusarium oxysporum* более чувствительны по сравнению с *Botrytis cinerea* по отношению к экстракту *Gliocladium catenulatum*. Например, при оптимальном разбавлении экстракта в 30 раз в среднем зона подавления у *Fusarium oxysporum* показывает 26±0,03мм, тогда как у *Botrytis cinerea* 24±0,03 мм.

Было определено оптимальное условие (питательная среда, температура, использование углеводов, рН среда) для интенсивного роста и развития продуцента *Gliocladium catenulatum* поверхностным методом культивирования.

Цель исследований – оценить фунгицидное свойство экстракта *Gliocladium catenulatum* против фитопатогенов *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*. В дальнейшем использовать данный микромицет в качестве биопрепарата против фитопатогенных грибов для повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: *Gliocladium catenulatum*, фитопатогены, антагонизм, антифунгальные свойства.

А.В. Ismagulova¹, А.Д. Spanbaev¹, С.К. Nayekova^{1,2}, G.M. Salkhozhayeva¹, Z.S. Sarmurzina²
¹L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan
²Republican Collection of Microorganisms, Astana, Kazakhstan

Antifungal effect of *Gliocladium catenulatum* mushroom extract on phytopathogens *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*

Abstract. This article discusses the antifungal property of the *Gliocladium catenulatum* extraction on widespread phytopathogenic fungi of agricultural crops in Northern Kazakhstan as *Botrytis cinerea* and *Fusarium Oxysporum*. As a result of studies, this micromycete-antagonist isolated from the root of healthy strawberry *Gliocladium catenulatum* showed high antifungal activity, suppression zone 35±0.05 mm. It was revealed that *Fusarium Oxysporum* strains are more sensitive compared to *Botrytis cinerea*. For example, with optimal dilution of the extract 30 times, on average the suppression zone in *Fusarium Oxysporum* showed 26±0.03 mm, whereas in *Botrytis cinerea* 24±0.03 mm.

The optimal condition (nutrient medium, temperature, carbohydrate use, pH medium) for intensive growth and development of *Gliocladium catenulatum* producer by surface cultivation method was determined.

The aim of the research is to evaluate the fungicidal property of *Gliocladium catenulatum* against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* and further use this micromycete as a biological preparation against phytopathogenic fungi to increase crop yields.

Keywords: *Gliocladium catenulatum*, phytopathogens, antagonism, antifungal properties.

References

1. Harman G.E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity, *New Phytologist*, 189(3), 647-649 (2011).
2. Baudoin E., Benizri E., Guckert A. *Appl. Soil Ecol.*, 19(2), 135-145 (2002).
3. Frankenberger W.T., Arshad M. *Phytohormones in Soil: Microbial Production and Function* (New York: Marcel Dekker, Inc., 1995, 503 p.).
4. Leveau J., Lindow S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2365-2371 (2005).
5. Duffy B., Keel C., Defago G. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3), 1836-1842 (2004).
6. Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 537-547 (2002).
7. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 36, 453-483 (1998).
8. Bilaj V.I. *Metody eksperimental'noj mikologii* [Methods of experimental mycology] (Kiev «Naukova dumka», 1982, 552 s.) [Kyiv "Naukova Dumka", 1982, 552 p.]. [in Russian]
9. Sadykova V.S., Kurakov A.V., Kuvarina A.E., Rogozhin E.A. *Antimikrobnaya aktivnost' shtammov gribov roda Trichoderma iz Srednej Sibiri, Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Antimicrobial activity of strains of fungi of the genus Trichoderma from Central Siberia, Applied biochemistry and microbiology], 51(3), 215-225 (2015). [in Russian]
10. Rankovic B., Mistic M., Sukdolak S. *Antimicrobial activity of extracts of the lichens Cladonia furcata, Parmelia caperata, Parmelia pertusa, Hypogymnia physodes and Umbilicaria polyphylla*, *Br. J. Biomed. Sci.*, 64(4), 143-148 (2007).
11. Yassin A.M., El-Deeb N.M., Metwaly A.M., El Fawal G.F., Radwan M.M., Hafez E.E. *Applied biochemistry and Biotechnology*, 182, 1675-1693 (2017).
12. Metwaly A.M., Fronczek F.R., Ma G., Kadry H.A., Atef A., Mohammad I.A.-E., Cutler S.J., Ross S.A. *Tetrahedron letters*, 55, 3478-3481 (2014).
13. Metwaly A.M., Kadry H.A., Atef A., Mohammad A.-E.I., Ma G., Cutler S.J., Ross S.A. *Phytochemistry letters*, 7, 1-5 (2014).
14. Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U. *Optimization of culture conditions for lichen Usneaghattensis G. Awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production*, *Food Technol. Biotechnology*, 47(7), 12 (2009).
15. Howell C.R. *Understanding the mechanisms employed by Trichoderma virens to effect biological control of cotton diseases*, *J. Phytopathology*, 96(2), 178-180 (2006).
16. Hassine M., Jabnoun-Khiareddine H., Aydi Ben Abdallah R., Daami-Remadi M. *In vitro and In vivo Antifungal Activity of Culture Filtrates and Organic Extracts of Penicillium sp. and Gliocladium spp. against Botrytis cinerea*, *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 8(12), 2-9 (2017).
17. Arifova Z.I. *Influence of microbiological preparations on morphostructure, yield, and quality of raspberries*, *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*, 1(17), 6-12 (2019).
18. Akram S., Khan S.M., Khan M.F., Khan H.U., Tariq A., Umar U.U., Gill A. *Antifungal activity of different systemic fungicides against Fusarium oxysporum F. sp. lycopersici associated with tomato wilt and emergence of resistance in the pathogen*, *Pakistan Journal of Phytopathology*, 30(2), 169-176 (2018).
19. El-Sayed M.T., El-Sayed A.S.A. *Bioremediation and tolerance of zinc ions using Fusarium solani*, *Heliyon*, 6(e05048), 235-244 (2020).
20. Skugoreva S.G., Kantor G.Ya., Domracheva L.I., Kut'yavina T.I. *Comparative analysis of the effectiveness of the use of sorbents of different nature with respect to copper(II) ions*, *Theoretical and Applied Ecology*, 3, 12-18 (2018).
21. Skugoreva S.G., Kantor G.Ya., Domracheva L.I., Sheshhegova T.K. *Assessment of sorption abilities of various species of Fusarium micromycetes in relation to heavy metal ions*, *Theoretical and Applied Ecology*, 4, 102-109 (2019).
22. Yang J.H., Wang J.H., Guo W.B., Ling A.R., Luo A.Q., Liu D.Y., Yang X.L., Zhao Z.H. *Toxic effects and possible mechanisms of deoxynivalenol exposure on sperm and testicular damage in BALB/c mice*, *J. Agric. Food Chem.*, 67(8), 2289-2295 (2019).
23. Domracheva L.I., Fokina A.I., Skugoreva S., Ashihmina T.YA. *Pochvennye griby roda Fusarium i ih metabolity: opasnost' dlya bioty, vozmozhnost' ispol'zovaniya v biotekhnologii*, *Teoreticheskie problemy ekologii* [Soil fungi of the genus Fusarium and their metabolites: danger to biota, possibility of use in biotechnology, Theoretical problems of ecology], 12, 6-15 (2021). [in Russian]

Авторлар туралы мәлімет:

Исмагулова А.Б. – биология магистрі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қажымұқан көшесі, 13, Астана, Қазақстан.

Спанбаев А.Д. – биология ғылымдарының қауымдастырылған профессоры, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қажымұқан көшесі, 13, Астана, Қазақстан.

Наекова С.К. – аға ғылыми қызметкер, биология ғылымдарының магистрі, Микроорганизмдердің Республикалық Коллекциясы, Ш. Уәлиханов көшесі, 13/1, Астана, Қазақстан.

Салхожаева Г.М. – аға оқытушы, биология ғылымдарының кандидаты, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қажымұқан көшесі, 13, Астана, Қазақстан.

Сармурзина З.С. – биология ғылымдарының кандидаты, Микроорганизмдердің Республикалық Коллекциясы, Ш. Уәлиханов көшесі, 13/1, Астана, Қазақстан.

Ismagulova A.B. – PhD student, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 13 Munaitpassov st., Astana, Kazakhstan.

Spanbaev A.D. – Associate Professor, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 13 Munaitpassov st., Astana, Kazakhstan.

Nayekova S.K. – Senior Researcher, Master of Biological Sciences, Republican Collection of Microorganisms (RCM), 13/1 Sh. Ualikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Salkhozhayeva G.M. – Candidate of Biological Sciences, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 13 Munaitpassov st., Astana, Kazakhstan.

Sarmurzina Z.S. – Candidate of Biological Sciences, Republican Collection of Microorganisms (RCM), 13/1 Sh. Ualikhanov str., Astana, Kazakhstan.