

Сергей Витальевич Хижняк

Красноярский государственный аграрный университет, профессор кафедры экологии и природопользования, доктор биологических наук, доцент, Красноярск, Россия
skhizhnyak@yandex.ru

Елена Николаевна Еськова

Красноярский государственный аграрный университет, доцент, заведующая кафедрой экологии и природопользования, кандидат биологических наук, доцент, Красноярск, Россия
nikeskov@mail.ru

АНТИГРИБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫТЯЖКИ ЛИСТЬЕВ БРУСНИКИ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГНИЛИ ЗЕМЛЯНИКИ *RHIZOPUS STOLONIFER*

Цель исследования – изучить антигрибные свойства водной вытяжки листьев брусники *Vaccinium vitis-idaea* L. в отношении возбудителя текучей гнили земляники *Rhizopus stolonifer* Vuillemin (1902). В качестве показателя антигрибной активности использовали снижение прорастания спор *R. stolonifer* в присутствии вытяжки листьев брусники относительно контроля. Диапазон концентраций вытяжки составлял от 0,53 до 67,5 г/л в пересчете на сухой лист брусники, общее число вариантов концентраций вытяжки равно 8. Установлено, что вытяжка листьев брусники статистически значимо снижает прорастание спор *R. stolonifer* уже в концентрации 0,53 г/л в пересчете на сухой лист. Зависимость антигрибного эффекта от концентрации вытяжки носит характер кривой с насыщением с выходом на плато в районе концентрации 17 г/л в пересчете на сухой лист. Эта кривая может быть адекватно (коэффициент детерминации $R^2 = 0,997$) описана суммой двух логистических функций. Первая функция соответствует веществу, отвечающему за гибель более чем 60 % спор гриба. Теоретическая концентрация вытяжки, при которой происходит гибель половины указанного числа спор, для данного вещества составляет 0,54 г/л в пересчете на сухой лист. Вторая функция соответствует веществу, отвечающему за гибель более чем 20 % спор гриба. Теоретическая концентрация вытяжки, при которой происходит гибель половины указанного числа спор, для данного вещества составляет 8,23 г/л в пересчете на сухой лист. Несмотря на ярко выраженный антигрибный эффект вытяжки листа брусники, даже максимальная испытанная концентрация (67,5 г/л в пересчете на сухой лист) не обеспечивала 100 % гибель спор *R. stolonifer*. На основании результатов исследования можно рекомендовать водную вытяжку листа брусники в качестве дополнительного компонента препаратов для борьбы с *R. stolonifer*.

Ключевые слова: *Rhizopus stolonifer*, гниль земляники, *Vaccinium vitis-idaea*, вытяжка из листьев, антигрибной эффект.

Sergey V. Khizhnyak

Krasnoyarsk State Agrarian University, Professor at the Department of Ecology and Nature Management, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Krasnoyarsk, Russia
skhizhnyak@yandex.ru

Elena N. Eskova

Krasnoyarsk State Agrarian University, Associate Professor, Head of the Department of Ecology and Nature Management, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Krasnoyarsk, Russia
nikeskov@mail.ru

LINGONBERRY EXTRACTING LEAVES ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST THE STRAWBERRY ROT AGENT RHIZOPUS STOLONIFER

The aim of research is to study the antifungal properties of the water extract of the leaves of the lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* L. against the causative agent of flowing strawberry rot *Rhizopus stolonifer* Vuillemin (1902). The decrease in spore germination of *R. stolonifer* in the presence of extract of lingonberry leaves relative to control was used as an indicator of antifungal activity. The concentration range of the extract was from 0.53 to 67.5 g/l in terms of dry lingonberry leaf; the total number of options for extract concentrations was 8. It was found that the extract of lingonberry leaves statistically significantly reduces the germination of *R. stolonifer* spores already at a concentration of 0.53 g/l in terms of dry leaf. The dependence of the antifungal effect on the extract concentration has the character of a curve with saturation, reaching a plateau at a concentration of 17 g/l in terms of dry leaf. This curve can be adequately (coefficient of determination $R^2 = 0.997$) described by the sum of two logistic functions. The first function corresponds to the substance responsible for the death of more than 60 % of the spores of the fungus. The theoretical concentration of the extract, at which the death of half of the indicated number of spores occurs, for a given substance is 0.54 g/l in terms of dry leaf. The second function corresponds to the substance responsible for the death of more than 20 % of the spores of the fungus. The theoretical given substance is 8.23 g/l in terms of dry leaf. Despite the pronounced antifungal effect of the lingonberry leaf drawing, even the maximum tested concentration (67.5 g/l in terms of dry leaf) did not ensure 100 % death of *R. stolonifer* spores. Based on the results of the study, it is possible to recommend an aqueous extract of lingonberry leaves as an additional component of preparations for the control of *R. stolonifer*.

Keywords: *Rhizopus stolonifer*, strawberry rot, *Vaccinium vitis-idaea*, extract from leaves, antifungal effect.

Введение. Мицелиальный гриб *Rhizopus stolonifer* Vuillemin (1902) (отдел *Zygomycota*, класс *Zygomycetes*, порядок *Mucorales*, семейство *Mucoraceae*) является одним из наиболее распространенных возбудителей гнилей при хранении плодоовощной продукции. Благодаря формированию столонов, гриб способен к быстрой колонизации субстратов, что делает его одним из наиболее вредоносных возбудителей гнилей хранения [1, 2]. Относительно недавно *R. stolonifer* стал известен как возбудитель текущей гнили земляники садовой *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier (1785). При этом заболевании плоды земляники поражаются на растениях еще до созревания. На пораженных плодах появляются светлые пятна, цвет которых быстро меняется на бурый, затем плоды размокают, мацерируются, теряют сок и покрываются слоем мицелия и спорносящих структур гриба. Болезнь практически одновременно стала актуальной для всех производящих землянику регионов, при этом потери урожая могут достигать 50–90 % [3]. В 2009 г. данное заболевание впервые зафиксировано в Краснодарском крае, где оно уничтожило до 80 % урожая [4]. Попытки подобрать фунгициды, эффективные против данного заболевания и безопасные с точки зрения по-

ребителя, на сегодняшний момент не увенчались успехом. В этой связи зарубежными исследователями рассматриваются альтернативные методы борьбы с *R. stolonifer*. Так, в работе [5] продемонстрирована высокая антигрибная активность экстрактов бурой водоросли *Laminaria digitata* в отношении *R. stolonifer*. В работе [6] рассмотрена возможность борьбы с данным возбудителем с помощью эфирных масел *Eucalyptus staigeriana*, *Lippia sidoides* и *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Известно, что листья брусники содержат вещества, обладающие высокой антибактериальной активностью [7]. Ранее нами была показана высокая эффективность водного экстракта листа брусники в предотвращении микробиологической порчи папоротника-орляка соленого [8, 9]. Настоящее исследование посвящено оценке возможности использования водного экстракта листьев брусники против возбудителя гнили земляники *R. stolonifer*.

Цель исследования: изучение антигрибной активности водного экстракта листьев брусники в отношении *R. stolonifer*.

Задачи исследования: проверка наличия антигрибного эффекта водного экстракта листьев брусники в отношении *R. Stolonifer*; изучение зависимости антигрибной активности от концен-

трации экстракта; построение регрессионных моделей, описывающих зависимость антигрибного эффекта от концентрации экстракта.

Объекты и методы исследования. В качестве тест-объекта использован штамм *R.*

stolonifer, выделенный из пораженной текучей гнилью земляники садовой на гидропонной установке в Институте агроэкологических технологий ФГБОУ ВО Красноярский ГАУ (рис. 1, 2).

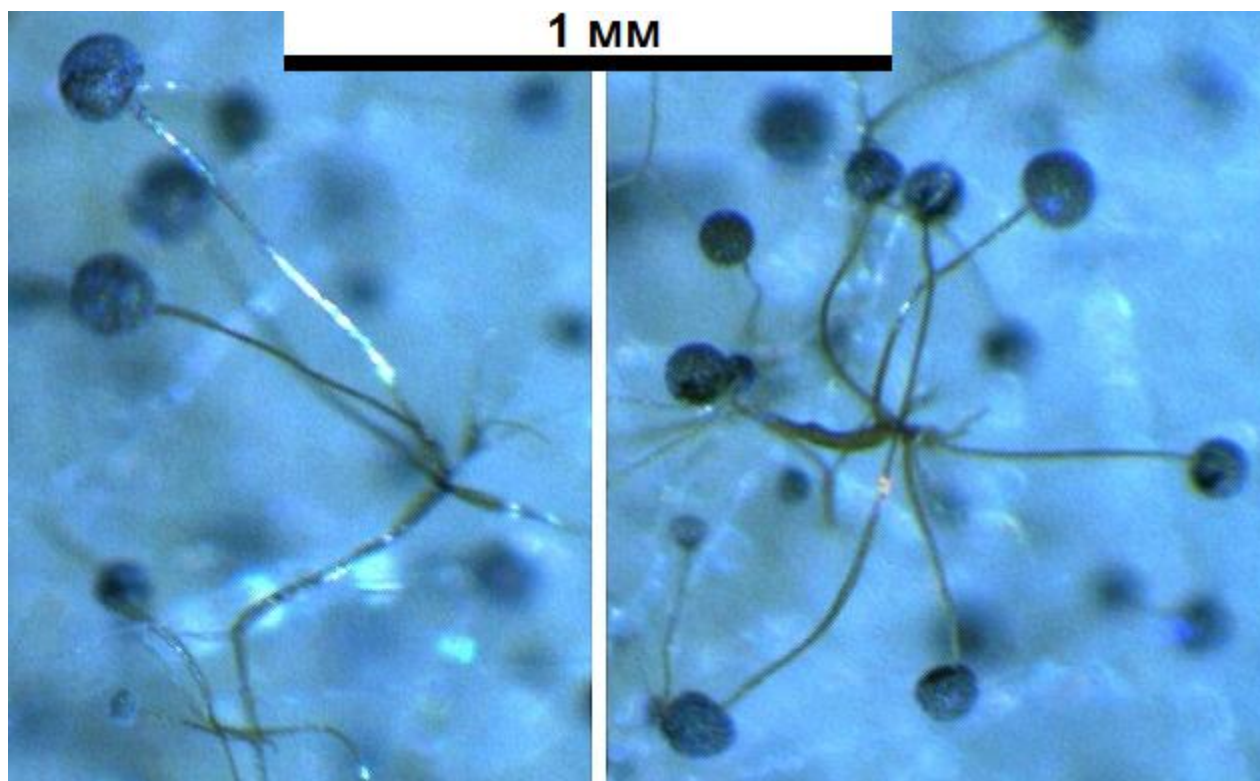


Рис. 1. Спорангии *R. stolonifer* (ширина линейки 1 мм)

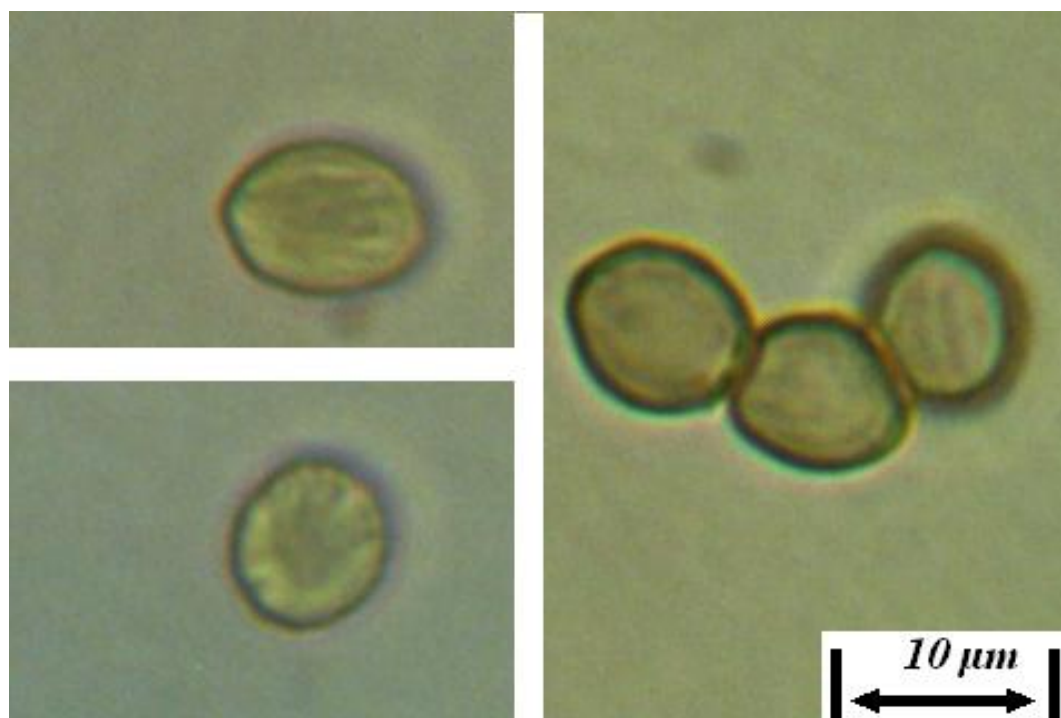


Рис. 2. Споры *R. stolonifer* (ширина линейки 10 мкм)

Для приготовления водного экстракта использовали лист брусники сухой производства «ФармаЦвет» (13 % влажность). Листья брусники в количестве 135 г/л настаивали в жидкой среде Чапека-Докса в течение 4,5 ч на водяной бане при 50 °С. Дозировка листьев и способ приготовления вытяжки были выбраны на основе предыдущих экспериментов по изучению антимикробных свойств листа брусники в отношении микроорганизмов, вызывающих порчу папоротника-орляка соленого.

Для проверки антигрибных свойств вытяжки листьев брусники использовали тест, основанный на прорастании спор [10]. Полученный настой смешивали с суспензией спор *R. stolonifer* в жидкой среде Чапека-Докса в соотношении 1:1,

после чего готовили серию разведений полученной смеси с использованием той же суспензией спор *R. stolonifer*. Контролем служила суспензия спор *R. stolonifer* в жидкой среде Чапека-Докса без добавления вытяжки листьев. Эксперимент проводили в плашках для иммуноферментного анализа, по 20 мкл суспензии в ячейке. После заполнения ячеек плашку инкубировали в течение 12 ч во влажной камере при температуре +24 °С, после чего подсчитывали число проросших и непроросших спор в каждом варианте. Подсчет проросших и непроросших спор проводили по микрофотографиям (рис. 3).

Общее число подсчитанных спор в вариантах составило от 359 до 944 шт. (табл. 1).



Рис. 3. Проросшая (1) и непроросшая (2) споры *R. stolonifer* (стрелкой показана проростковая гифа; ширина линейки 10 мкм)

Таблица 1

Схема эксперимента

Разведение исходной вытяжки, раз	Концентрация в пересчете на сухой лист брусники, г/л	Общее число подсчитанных спор, шт
Контроль	0	585
2	67,500	359
4	33,750	854
8	16,875	647
16	8,438	944
32	4,219	490
64	2,109	682
128	1,055	525
256	0,527	628

Микрофотосъемку выполняли с помощью микроскопа «Микмед-6» вар. 3, оснащенного цифровой камерой DCM-130E.

Статистическую значимость различий по прорастанию спор между вариантами опыта и контролем определяли на основе точного F-теста для таблиц 2 × 2 с использованием пакета StatSoft STATISTICA 6.0. Для множественного сравнения применяли критерий хи-квадрат. Подбор уравнений регрессии и определение коэффициентов в этих уравнениях проводили с

помощью модуля User-specified regression (Пользовательская регрессия), входящего в пакет StatSoft STATISTICA 6.0.

Результаты исследования. Водная вытяжка листьев брусники оказала ярко выраженный антигрибной эффект в отношении *R. stolonifer*. Статистически значимое снижение прорастания спор в сравнении с контролем отмечено даже при разведении исходной вытяжки в 256 раз (табл. 2).

Таблица 2

Влияние разных концентраций водной вытяжки листьев брусники на прорастание спор *R. Stolonifer*

Разведение исходной вытяжки, раз	Прорастание, % к контролю	Значимость различий с контролем р
Контроль	100,0	–
2	16,7	< 0,001
4	21,5	< 0,001
8	16,2	< 0,001
16	27,8	< 0,001
32	37,5	< 0,001
64	40,1	< 0,001
128	37,9	< 0,001
256	81,2	< 0,05

В то же время в интервале разведений исходной вытяжки в 2–8 раз доля выживших спор практически не меняется, варьируя в пределах 16,2–21,5 %. Сравнение этих вариантов по критерию хи-квадрат не выявило между ними статистически значимых различий.

Регрессионный анализ показал, что зависимость доли погибших спор *R. stolonifer* от концентрации вытяжки листьев брусники носит характер кривой с насыщением и адекватно (с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,997$) может быть описана суммой двух логистических функций F1 и F2, каждая из которых имеет следующий вид:

$$Y = Y_{\max} \frac{1}{1 + e^{k \cdot (X - X_0)}}$$

где Y – доля погибших спор, %; Y_{\max} – максимально возможная доля погибших спор, %; X – концентрация вытяжки, г/л в пересчете на сухой лист; X_0 – концентрация вытяжки, при которой доля погибших спор равна 1/2 от Y_{\max} ; k – коэффициент.

Результаты подбора параметров для функций F1 и F2 представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты подбора параметров для функций F1 и F2

Параметр	F1	F2
Y_{\max}	61,04177	20,80989
X_0	0,539532	8,228941
k	66,9231	0,739612

Можно предположить, что указанные функции соответствуют двум разным химическим соединениям с антифунгальной активностью, входящим в состав вытяжки. Первое соединение, которому соответствует функция F1, ответственно за гибель 61 % спор в эксперименте.

Второе соединение, которому соответствует функция F2, ответственно за гибель 20,8 % спор. Ниже представлены теоретические кривые для функций F1 и F2, а также кривая для суммы функций F1+F2 (рис. 4–6).

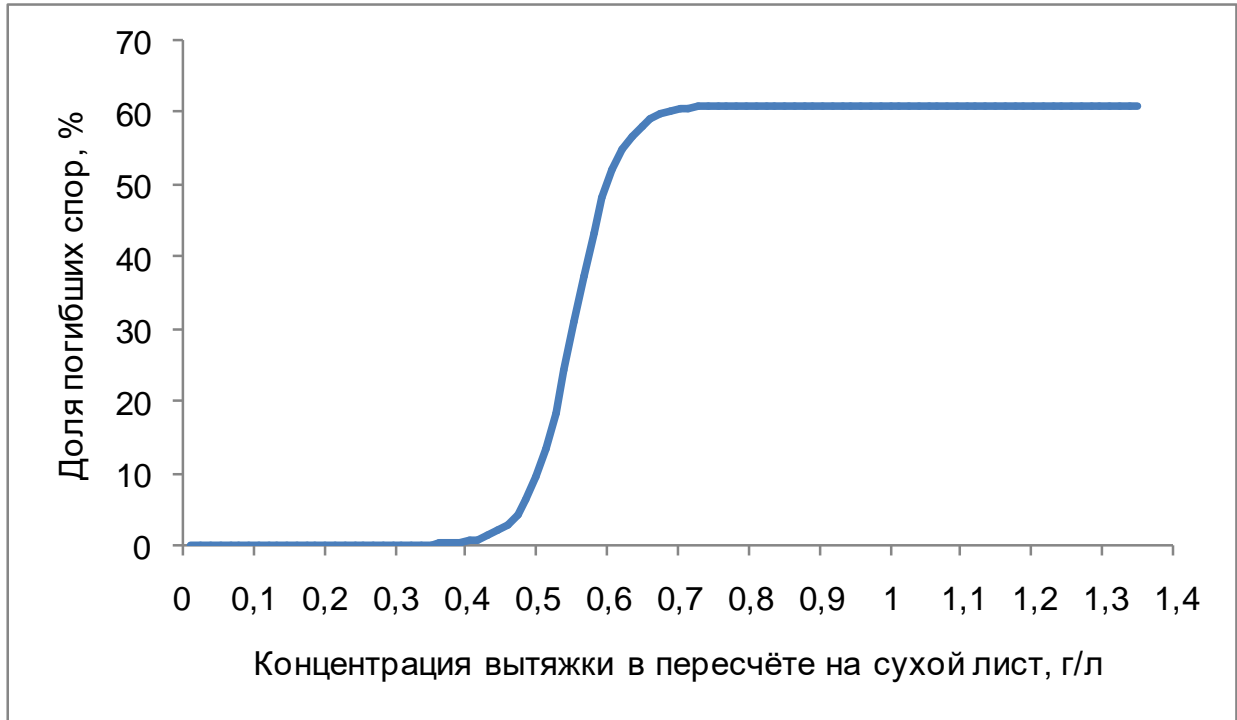


Рис. 4. Теоретическая кривая для функции F1

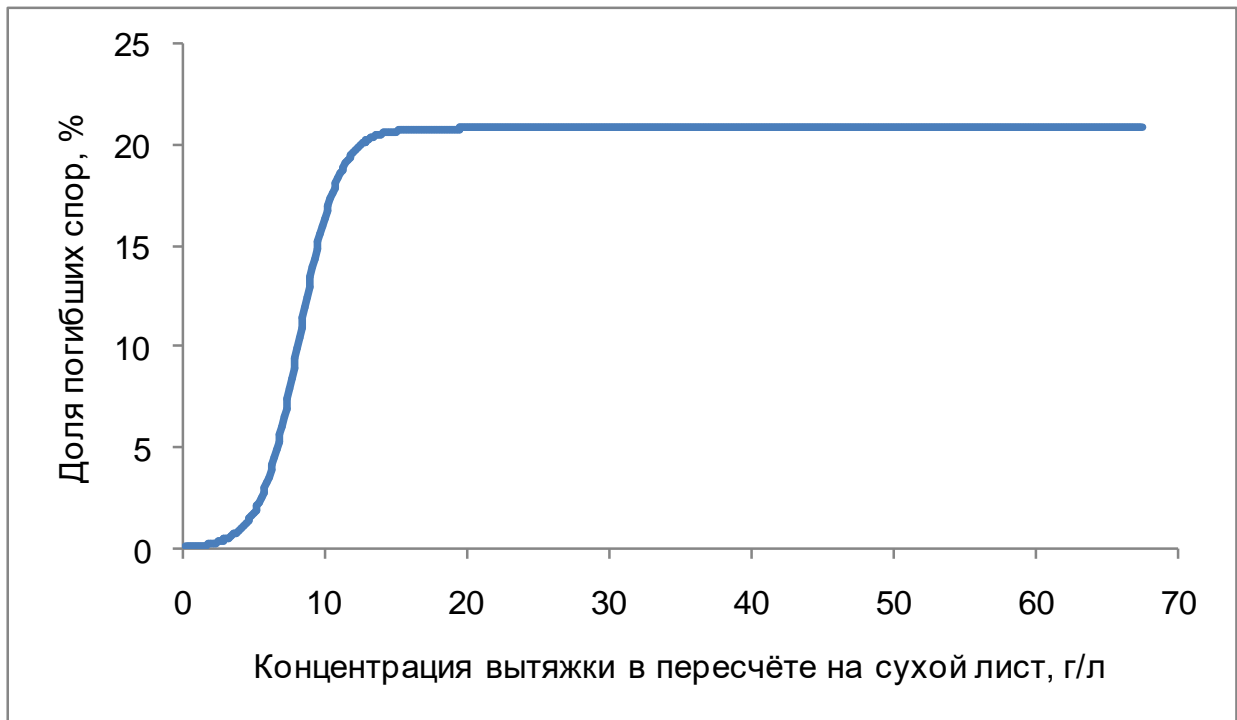


Рис. 5. Теоретическая кривая для функции F2

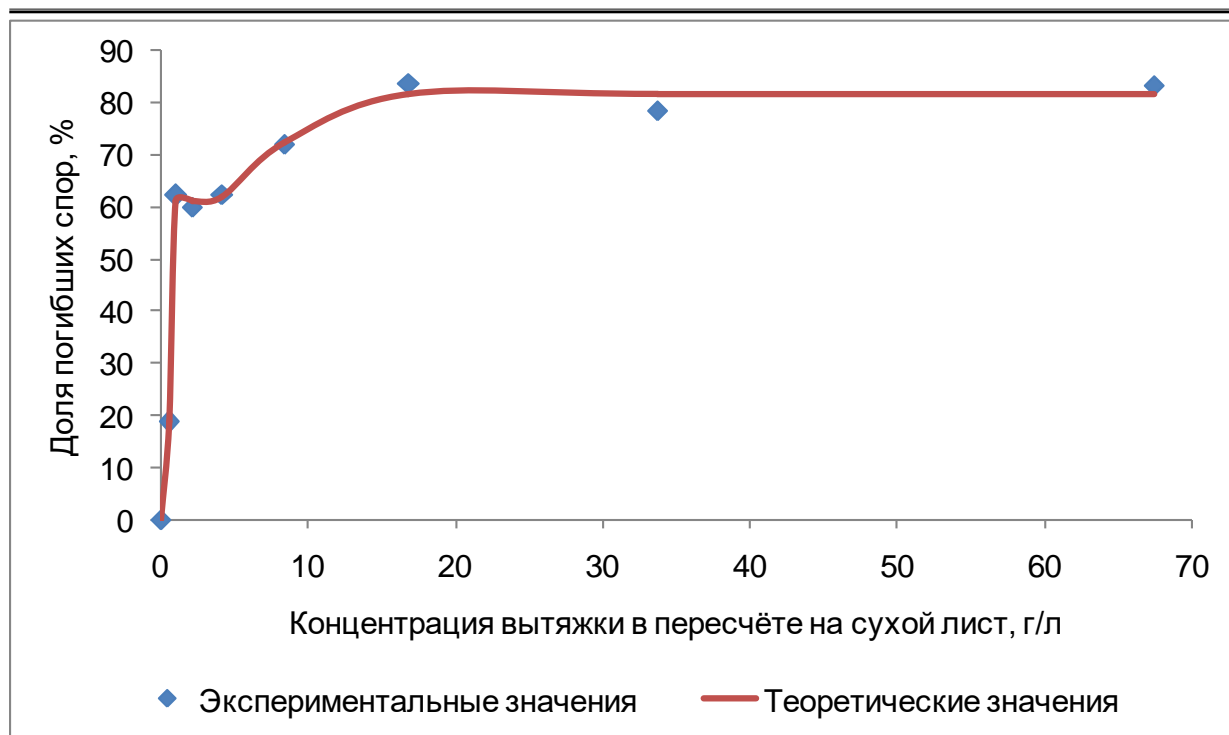


Рис. 6. Теоретическая кривая для суммы функций $F1+F2$ и экспериментальные значения

Следует отметить, что около 17 % спор выжили даже при максимальной испытанной концентрации вытяжки листьев брусники (67,5 г/л в пересчете на сухой лист), причем характер экспериментальной и теоретической зависимости говорит о том, что использовать вытяжку с концентрацией выше 17–20 г/л в пересчете на сухой лист не целесообразно.

Тем не менее, несмотря на отсутствие полного подавления *R. stolonifer* в нашем эксперименте, эффективность водной вытяжки листа брусники оказалась сопоставимой с эффективностью других природных антигрибных средств, изученных в работах [5] и [6].

Заключение. Изучение влияния водной вытяжки листа брусники на прорастание спор возбудителя гнили земляники *R. stolonifer* показало, что эта вытяжка оказывает статистически значимое ингибирующее воздействие на данный гриб уже в концентрации 0,53 г/л в пересчете на сухой лист. Максимальный антигрибный эффект достигается при концентрации вытяжки около 17 г/л в пересчете на сухой лист, после чего кривая «доза-эффект» выходит на плато. Регрессионный анализ показал, что наблюдаемая зависимость доли погибших спор от концентрации вытяжки адекватно описывается суммой двух логистических функций, что позволяет

предположить наличие в вытяжке двух разных веществ, обладающих антифунгальной активностью в отношении *R. stolonifer*. Несмотря на ярко выраженный антифунгальный эффект, вытяжка листа брусники не обеспечивает полного подавления *R. stolonifer*. В этой связи данную вытяжку можно рекомендовать в качестве дополнительного средства борьбы с *R. stolonifer* в сочетании с другими мерами по защите урожая от данного гриба.

Список источников

1. Baggio J.S., Hau B., Amorim L. Spatiotemporal analyses of rhizopus rot progress in peach fruit inoculated with *Rhizopus stolonifer* // Plant Pathology. 2017. Vol. 66, no. 9. P. 1452–1462.
2. Feliziani E., Romanazzi G. Postharvest Decay of Strawberry Fruit: Etiology, Epidemiology, and Disease Management // Journal of Berry Research. 2016. Vol. 6, no. 1. P. 47–63.
3. Lin C.P., Tsai J.N., Ann P.J., Chang J.T., Chen P.R. First report of rhizopus rot of strawberry fruit caused by *Rhizopus stolonifer* in Taiwan // Plant Disease 2017. Vol. 101, no. 1. P. 254–255.

4. Холод Н.А. Болезни земляники на юге России // Защита и карантин растений. 2013. № 10. С. 28–30.
5. Decorato U., Salimbeni R., Depretis A. Evaluation of an alternative means for controlling postharvest Rhizopus rot of strawberries // Adv. Hort. Sci., 2018.32(3) P. 325–334.
6. Oliveira J, Parisi M.C.M., Baggio J.S., Silva P.P.M., Paviani B., Spoto M.H.F., Gloria E.M. Control of Rhizopus stolonifer in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose // Int J Food Microbiol. 2019. № 292. P. 150–158.
7. Vučić D., Čomić L., Petković M., Stefanović O. Antibacterial effects of leaves of *Vaccinium vitis-idaea* L // Planta Medica. 2009. Vol. 75, no. 09. P. 1044.
8. Папоротник, консервированный с использованием брусники (*Vaccinium vitis-idaea*), – перспективный продукт для товарного бренда макрорегиона «Енисейская Сибирь» / С.В. Хижняк [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2020. № 12 (165). С. 201–208.
9. Khizhnyak S.V., Demidenko G.A., Tipsina N.N., Strupan E.A., Muchkina E.Ya. Natural antimicrobials for preservation of salty fern // 2020 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 548 082007.
10. Хижняк С.В., Пучкова Е.П., Петрушкина С.А. Экспресс-метод выявления штаммов-антагонистов для биологической защиты растений от фитопатогенных грибов // Приоритетные направления научно-технологического развития агропромышленного комплекса России: сб. мат-лов национальной науч.-практ. конф. Рязань, 2019. С. 590–594.
3. Lin C.P., Tsai J.N., Ann P.J., Chang J.T., Chen P.R. First report of rhizopus rot of strawberry fruit caused by *Rhizopus stolonifer* in Taiwan // Plant Disease 2017. Vol. 101, no. 1. P. 254–255.
4. Holod N.A. Bolezni zemlyaniki na yuge Rossii // Zashchita i karantin rastenij. 2013. № 10. S. 28–30.
5. Decorato U., Salimbeni R., Depretis A. Evaluation of an alternative means for controlling postharvest Rhizopus rot of strawberries // Adv. Hort. Sci., 2018.32(3) P. 325–334.
6. Oliveira J, Parisi M.C.M., Baggio J.S., Silva P.P.M., Paviani B., Spoto M.H.F., Gloria E.M. Control of Rhizopus stolonifer in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose // Int J Food Microbiol. 2019. № 292. P. 150–158.
7. Vučić D., Čomić L., Petković M., Stefanović O. Antibacterial effects of leaves of *Vaccinium vitis-idaea* L // Planta Medica. 2009. Vol. 75, no. 09. P. 1044.
8. Paporotnik, konservirovannyj s ispol'zovaniem brusniki (*Vaccinium vitis-idaea*), – perspektivnyj produkt dlya tovarnogo brenda makreregiona «Enisejskaya Sibir'» / S.V. Hizhnyak [i dr.] // Vestnik KrasGAU. 2020. № 12 (165). S. 201–208.
9. Khizhnyak S.V., Demidenko G.A., Tipsina N.N., Strupan E.A., Muchkina E.Ya. Natural antimicrobials for preservation of salty fern // 2020 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 548 082007.
10. Hizhnyak S.V., Puchkova E.P., Petrushkina S.A. `Ekspress-metod vyyavleniya shtammov-antagonistov dlya biologicheskoy zashchity rastenij ot fitopatogennyh gribov // Prioritetnye napravleniya nauchno-tehnologicheskogo razvitiya agropromyshlennogo kompleksa Rossii: sb. mat-lov nacional'noj nauch.-prakt. konf. Ryazan', 2019. S. 590–594.

References

1. Baggio J.S., Hau B., Amorim L. Spatiotemporal analyses of rhizopus rot progress in peach fruit inoculated with *Rhizopus stolonifer* // Plant Pathology. 2017. Vol. 66, no. 9. P. 1452–1462.
2. Feliziani E., Romanazzi G. Postharvest Decay of Strawberry Fruit: Etiology, Epidemiology,