

УДК 582.282.123.4+57.042.2+57.042.5

**ВЛИЯНИЕ ЭУПАРЕНА МУЛЬТИ И ДАФС-25 НА ПРОРАСТАНИЕ
КОНИДИЙ, БИОМАССУ И АЗОТИСТЫЙ ОБМЕН
ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* TIEGH.**

Полубояринов П. А.¹, Семенова Е. Ф.², Назаров В. В.²

¹*Пензенский государственный университет, Пенза, Россия*

²*Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь,
Республика Крым, Россия*

E-mail: sef1957@mail.ru

Исследовано ингибирование прорастания спор гриба *Aspergillus niger* Tiegh. фунгицидом Эупарен Мульти (10 мкг/мл) и селенорганическим препаратом ДАФС-25 (10 мкг/мл). Ингибирующее влияние препаратов уменьшается при введении в состав питательной среды аминокислоты цистеина (0,1 %), при этом отмечается стимуляция накопления мицелиальной массы в вариантах Эупарен Мульти + цистеин в 1,6 раза и ДАФС-25 + цистеин в 11,8 раза. При культивировании вегетативного мицелия *A. niger* отмечен распад препарата ДАФС-25 и выделение элементарного селена гифами гриба. Действие эупарена, в основном, проявляется в уменьшении содержания проламинов и в меньшей степени глютелинов, при этом количество альбуминов и глобулинов изменяется незначительно. Вероятно, увеличение концентрации тирозина – предшественника пигмента меланина является защитной реакцией гриба на действие таких ингибиторов, как эупарен и ДАФС-25.

Ключевые слова: Эупарен Мульти 500 ВГ, ДАФС-25, диацетофенонилселенид, сульфгидрильные группы, мицелий, цистеин, альбумины, глобулины, проламины, глютелины, тирозин.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение действия фунгицидов и развития устойчивости к ним является важным направлением в практике защиты растений. Тем не менее, механизм резистентности к ним во многих случаях не определен как для новых, так и для давно используемых препаратов. Существуют данные о механизмах действия фунгицидов [1, 2], при этом они известны лишь для немногих системных препаратов [3], а о способе действия контактных фунгицидов имеются лишь общие сведения [4].

Эупарен Мульти (действующее вещество толлилфлуанид 500 г/кг) – контактный фунгицид широкого спектра действия против парши и мучнистой росы на плодовых, серой гнили и оидиума на винограде, а также серой гнили на землянике, огурцах и томатах закрытого грунта. Относительно механизмов действия Эупарена Мульти (далее эупарен) известно, что он неспецифически ингибирует биохимические процессы, в которых принимают участие ферменты и коферменты, содержащие сульфгидрильные группы, тиолсодержащие клеточные компоненты [5]. Как и все ингибиторы SH-групп, он увеличивает водопроницаемость клеточных мембран, способствует «вытеканию» ионов калия из клетки. Также инактивирует

ферменты фосфорного превращения, ингибирует биосинтез цитрата из ацетата. При взаимодействии с клеточными тиолами образуется фосген, который реагирует с белками, аминокислотами и другими компонентами грибной клетки. В общем, механизм взаимодействия эупарена аналогичен описанному взаимодействию каптана с сульфгидрильными группами цистеина [6]. Следует отметить, что в результате реакции выделяется сероводород (H_2S).

В большей степени прорастание конидий серой гнили (*Botrytis cinerea* Pers.) ингибировалось эупареном, и в меньшей степени он влиял на мицелий. Возможно, что это связано с различной проницаемостью клеточных стенок конидий и мицелия гриба, так как прижизненный краситель родамин-123 способен проникать через клеточную стенку конидий, но не мицелия. Прорастание конидий как резистентных, так и чувствительных к эупарену штаммов *B. cinerea* ингибируется относительно низкими концентрациями фунгицида ($ED_{50} = 0,063-0,267$ мкг/мл), в отличие от мицелия, ингибирующая концентрация (IC) для которого составляет 3–81 мкг/мл [7, 8].

В ряде работ [9, 10] установлено фунгицидное действие относительно высоких концентраций селенорганического препарата ДАФС-25 (диацетофенонилселенид, 1,5-дифенил-3-селенапентадион-1,5) и исследован его распад на ацетофенон и элементарный селен под действием сульфгидрильных (тиольных) групп растущего мицелия грибов *Aspergillus niger* Tiegh. и *Botrytis cinerea* Pers. При этом элементарный селен адсорбируется на поверхности гиф грибов. Необходимым компонентом этой реакции является наличие веществ, содержащих сульфгидрильную группу: восстановленного глутатиона или цистеина. Препарат ДАФС-25 был синтезирован в НИИ химии СГУ им. Н.Г. Чернышевского и разрешен к применению в ветеринарии и в сельскохозяйственном производстве. Он нерастворим в воде, но хорошо растворяется в органических растворителях, жирах. ДАФС-25 обладает выраженной антиоксидантной, антиоксидантной, иммуномодулирующей активностью и успешно применяется в птицеводстве и животноводстве ряда регионов России [11].

Целью нашей работы является сравнительное изучение действия диацетофенонилселенида и эупарена на споры и мицелий *Aspergillus niger* Tiegh.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил штамм мицелиального гриба *Aspergillus niger* Tiegh. из коллекции кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, любезно предоставленный А. Н. Лихачевым.

Для оценки влияния препаратов на прорастание спор использовали споровую суспензию, которую получали следующим образом: кусочки сахарозного агара с 7-дневной культурой вносили в пробирки с жидкой питательной средой и взбалтывали не менее 5 мин. Полученная суспензия для освобождения от обрывков мицелия фильтровалась через стерильную вату. Подсчет конидий проводили в камере Горяева и разбавляли суспензию так, чтобы содержание спор в питательной среде составило 10^3 конидий/мл. Для оценки влияния препаратов на мицелиальный рост гриба в качестве инокулюма были использованы вырезанные из 7-дневной

культуры гриба блоки с вегетативным мицелием (диаметром 5 мм), взятые с края колонии на сахарозном агаре.

Селективностью и отсутствием необходимости стерилизации при применении лабильных к нагреванию веществ был определен выбор питательной среды для культивирования гриба *A. niger* (состав: сахароза – 10 %, NH_4NO_3 – 0,3 %, KH_2PO_4 – 0,2 %, MgSO_4 – 0,05 %, FeSO_4 – 0,01 %). Высокая концентрация сахара и кислая среда (за счет гидролиза KH_2PO_4) препятствовали росту бактерий. Культуру термостатировали при температуре +30 °С. ДАФС-25 и Эупарен Мульти растворяли в ацетоне и добавляли в питательную среду при культивировании гриба. Объем вносимого препарата рассчитывали, исходя из объема среды, для получения необходимой концентрации действующего вещества. В контрольные варианты также вносили растворитель в тех же объемах. Навеску цистеина гидрохлорида добавляли в питательную среду и 1 М раствором NaOH под контролем рН-метра доводили кислотность среды до исходного значения.

Для определения биомассы мицелий гриба на 15-е сутки культивирования отделяли от культуральной жидкости фильтрованием на воронке Бюхнера с целлюлозным фильтром и промывали дистиллированной водой. Избыток влаги удаляли при помощи фильтровальной бумаги и взвешивали. Затем мицелий растирали в ступке с кварцевым песком и центрифугировали. Белки экстрагировали по методу Ермакова-Дурыниной [12]. Содержание отдельных фракций белков определяли по методу Bradford'a [13]. Анализ общего азота осуществляли методом Кьельдаля по стандартной методике. Анализ аминокислотного состава проводили путем кислотного гидролиза порошка сухого мицелия при температуре 110 °С в течение 14 ч с последующим определением в системе капиллярного электрофореза «Капель 105 М» согласно стандартной методике. Микроскопическое изучение микоматериалов было проведено с применением микроскопа Levenhuk D320L при увеличении 10х–20х.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс прорастания конидий при поверхностном культивировании на сахарозной среде занимает 8–10 часов. Первые 5–6 часов конидиям свойственен сферический рост, который называют стадией I или набуханием, при этом конидия увеличивается в диаметре в 3–4 раза. Стадия II в процессе прорастания занимает следующие 4–5 часов. В это время происходит образование ростковой трубки, которая имеет характерный для грибов апикальный рост. Для исследуемого гриба типично образование одной ростковой трубки (рис. 1). В варианте с препаратом ДАФС-25 (10^{-2} г/л), как и в варианте с эупареном (10 мкг/мл), прорастания конидий не происходит (рис. 2, 3).

Из литературы [14] известно, что действие тиольных ядов нивелируется добавлением веществ, содержащих сульфгидрильные группы, например, цистеином. В связи с этим для выяснения механизма действия препарата ДАФС-25 на прорастание конидий гриба *A. niger* в питательную среду был добавлен цистеин. Эта аминокислота на прорастание конидий не оказывала влияния (рис. 4). В вариантах опыта, где цистеин был добавлен в питательную среду с ДАФС-25 и

эупареном, он практически полностью снимал ингибирование прорастания конидий (рис. 5, 6).



Рис. 1. Формирование ростковой трубки конидиями гриба *A. niger* в жидкой питательной среде.



Рис. 2. Отсутствие прорастания конидий *A. niger* в среде с препаратом ДАФС-25 (10^{-2} г/л).

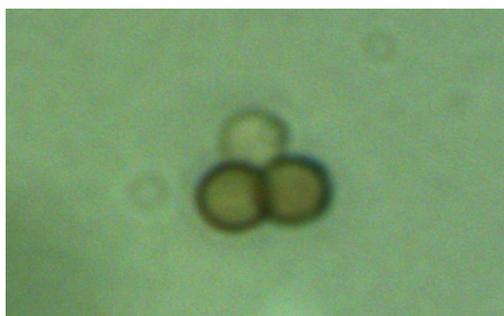


Рис. 3. Отсутствие прорастания конидий *A. niger* в среде с Эупареном (10 мкг/мл).



Рис. 4. Формирование ростковой трубки конидиями гриба *A. niger* в жидкой питательной среде с цистеином (0,1 %).



Рис. 5. Прорастание конидий в питательной среде с эупареном (10 мкг/мл) + цистеин (0,1 %).



Рис. 6. Формирование ростковой трубки конидиями гриба *A. niger* в жидкой питательной среде с ДАФС-25 (10^{-2} г/л) + цистеин (0,1 %).

Таким образом, можно предположить, что фунгицид эупарен и селенорганический препарат ДАФС-25 имеют схожий механизм действия, инактивируя сульфгидрильные группы конидий гриба и тем самым ингибируя их прорастание. Цистеин при добавлении в среду, содержащую ингибиторы, выступает

в роли антидота, снимая ингибирование. Вероятно, цистеин взаимодействует с ДАФС-25 по аналогии с восстановленным глутатионом [11]. В результате первой реакции (рис. 7а) образуется ацетофенон и S-(ацетофенилселенил)цистеина.

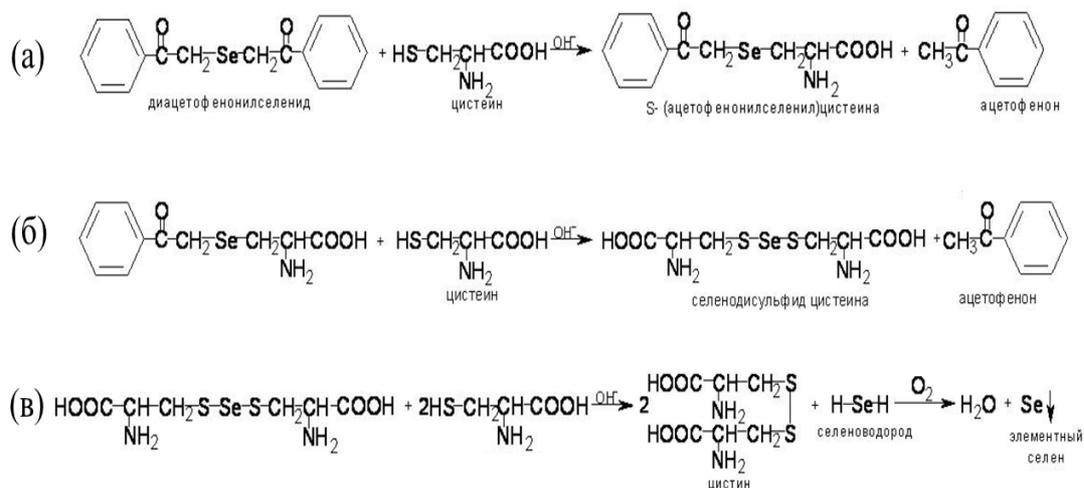


Рис. 7. Образование элементарного селена в реакциях ДАФС-25 с цистеином (пояснения в тексте).

Следующим этапом является образование еще одной молекулы ацетофенона и селенодисульфида цистеина (рис. 7б). При избытке цистеина конечной стадией является образование селеноводорода и цистина, а образовавшийся селеноводород как сильный восстановитель может быть окислен как кислородом воздуха, так и цистином до элементарного селена (рис. 7в). В результате этой реакции ДАФС-25 переводится цистеином в неактивное состояние (распадается на ацетофенон и элементарный селен) и функции сульфгидрильных групп им уже не блокируются.

Влияние препарата ДАФС-25 и эупарена на рост мицелиальной массы *A. niger* представлено в таблице 1. Из полученных данных следует, что ДАФС-25 и эупарен полностью ингибируют рост мицелия *A. niger*. Добавление цистеина в питательную среду незначительно стимулирует накопление биомассы (на 18,9 %). Также цистеин полностью нейтрализует ингибирующее действие фунгицида эупарена на споры, и накопление мицелиальной массы превосходит контроль на 57 %. В варианте опыта, где цистеин был добавлен к раствору с селенорганическим препаратом ДАФС-25, наблюдалась значительная стимуляция роста мицелия, которая превосходила контроль в 11,8 раз, то есть более чем на порядок. Ранее [9] отмечен распад селенорганического препарата ДАФС-25 и выделение элементарного селена гифами мицелия поверхностной культуры *A. niger*, где в качестве инокулята использовали фрагменты вегетативного мицелия (рис. 8, 9). Образование элементарного селена было подтверждено с помощью качественной реакции Файглей–Веста [11].

Таблица 1
Влияние ДАФС-25 и эупарена на накопление массы мицелия (воздушно-сухого, г/л) *A. niger* при инокуляции питательной среды суспензией конидий

Вариант опыта / Статистический показатель	Контроль	ДАФС-25	Эупарен	Цистеин	Эупарен + цистеин	ДАФС-25 + цистеин
Среднее арифметическое	3,521	0	0	4,187	5,530	41,339
Стандартное отклонение	0,300	0	0	0,560	0,130	0,602

Также при инокуляции вегетативным мицелием накопление биомассы носило иной характер, чем в опыте с инокуляцией суспензией конидий: биомасса накапливалась как в вариантах с чистыми ингибиторами (эупареном и ДАФС-25), так и в вариантах с добавлением цистеина в качестве антидота (табл. 2). Накопление биомассы мицелия в вариантах с ДАФС-25 и ДАФС-25 + цистеин превосходило контроль в 16,1 и 14,2 раза, соответственно, тогда как в вариантах с эупареном и эупареном + цистеином масса мицелия была больше контрольной в 1,4 и 1,5 раза, соответственно. Цистеин стимулировал рост гриба незначительно.

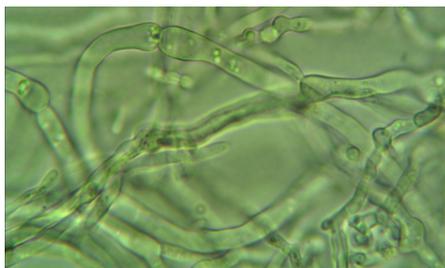


Рис. 8. Мицелий *A. niger* в контрольном варианте.



Рис. 9. Мицелий *A. niger* в опытном варианте с ДАФС-25 – выделение элементарного селена гифами.

Из полученных данных следует, что различия в действии фунгицида эупарена и селенорганического препарата ДАФС-25 на конидии и мицелий гриба связаны с различным содержанием сульфгидрильных групп в мицелии и прорастающих конидиях. Мы полагаем, что конидии в отличие от мицелия содержат малое количество сульфгидрильных групп и более чувствительны к действию препаратов, которые их ингибируют. Сульфгидрильные группы мицелия делают его более устойчивым к действию эупарена и ДАФС-25, в отличие от конидий, прорастание которых становится возможным только в присутствии антидота – цистеина. Это важно учитывать в практике защиты растений, так как обработка мицелиальных форм фитопатогенов фунгицидами, имеющими схожий механизм действия, будет малоэффективна, и наоборот – в отношении конидий. Эффект стимуляции накопления мицелиальной массы в вариантах с ДАФС-25, по-видимому, связан с образованием микрочастиц элементного селена и практически не проявляется в вариантах с эупареном. В научной литературе [15] известно о стимулирующем действии неорганических соединений селена на биомассу грибов, что согласуется с полученными нами данными.

Таблица 2

Влияние ДАФС-25 и эупарена на накопление воздушно-сухого мицелия (г/л) *A. niger* при инокуляции питательной среды фрагментами вегетативного мицелия

Вариант опыта/ Статистический показатель	Контроль	ДАФС- 25	Эупарен	Цистеин	Эупарен + цистеин	ДАФС- 25 + цистеин
Среднее арифметическое	2,400	3,862	3,420	2,700	3,510	33,960
Стандартное отклонение	0,300	0,167	0,280	0,540	0,530	2,260

Оценить роль сульфгидрильных групп в деструкции ксенобиотика селенорганической природы (ДАФС-25) и фунгицида эупарена можно путем анализа изменений состава белков в мицелии гриба, происходящих в присутствии препаратов в среде культивирования. Известно, что суммарный белок включает альбумины и проламины – преимущественно низкомолекулярные, водорастворимые и спирторастворимые белки, глобулины – белки, растворимые в растворах солей и вместе с первыми двумя группами выполняющие ферментативные, защитные и др. важнейшие функции в организме. Последнюю группу так называемых запасных высокомолекулярных белков составляют целочерастворимые белки – глютелины.

Представленные в таблице 3 результаты исследования свидетельствуют, что из общей суммы белков мицелия *A. niger* наибольшую часть составляют альбумины и глютелины, далее следуют глобулины и проламины. Цистеин очень слабо влияет на количественные изменения белков мицелия, незначительно уменьшая фракцию

глобулинов и увеличивая фракцию проламинов. Сочетание эупарена и цистеина и, особенно, ДАФС-25 и цистеина оказывает сильное влияние на фракции белков, снижая общее количество белков всех фракций на 18 % и 53,3 %, соответственно. Следует отметить, что уменьшение содержания белков совпадает с увеличением накопления биомассы гриба *A. niger*.

Таблица 3
Содержание фракций белков в мицелии (воздушно-сухом, мкг/100 мг) *A. niger* при инокуляции питательной среды суспензией конидий

Варианты / Фракции	Контроль	Цистеин	Эупарен + цистеин	ДАФС-25 + цистеин
Альбумины	16,24±1,29	13,02±0,78	11,06±0,88	5,66±0,57
Глобулины	6,28±0,06	4,32±0,23	4,88±0,18	3,12±0,12
Проламины	4,60±0,17	7,88±0,11	4,40±0,24	3,12±0,05
Глутелины	16,36±0,02	16,52±0,33	15,10±0,56	8,20±0,74
Белки (суммарно)	43,04±1,54	41,74±1,45	35,44±1,86	20,1±1,48

Также значительно отличаются по вариантам и белковые фракции гриба *A. niger* (табл. 4), полученные при инокуляции питательной среды фрагментами вегетативного мицелия. Значительное уменьшение суммы белков в мицелии по сравнению с контролем происходило в вариантах с добавлением ДАФС-25 и ДАФС-25 + цистеин. В варианте с ДАФС-25 увеличивалось количество альбуминов и уменьшалось количество проламинов, глутелинов и незначительно глобулинов. В варианте ДАФС-25 + цистеин уменьшалась только фракция глутелинов. Действие эупарена, в основном, проявлялось в уменьшении количества проламинов и в меньшей степени глутелинов, при этом количество альбуминов и глобулинов изменялось мало.

Таблица 4
Содержание фракций белков в мицелии (воздушно-сухом, мкг/100 мг) *A. niger* при инокуляции питательной среды фрагментами вегетативного мицелия

Варианты / Фракции	Контроль	ДАФС-25	Эупарен	Цистеин	Эупарен + цистеин	ДАФС-25 + цистеин
Альбумины	4,4±0,1	10,1±0,4	5,7±0,46	5,2±0,5	3,5±0,05	4,9±0,2
Глобулины	6,1±0,3	4,3±0,22	8,1±0,1	6,0±0,1	6,0±0,2	6,0±0,15
Проламины	13,6±0,3	1,9±0,1	6,5±0,26	9,6±0,86	1,8±0,03	15,9±0,5
Глутелины	29,6±0,5	5,9±0,18	23,1±1,62	32,8±1,96	47,0±1,3	12,3±0,35
Белки (суммарно)	53,7±1,2	22,2±0,9	43,4±2,44	53,6±3,42	58,3±1,58	39,1±1,2

Анализ в мицелии общего азота показал незначительное различие в его содержании. Так, в мицелии контрольного варианта оно составило 3,68 %, белка 23 % (коэффициент пересчета $N \times 6.25$), а в варианте с добавлением эупарена – азота 3,93 % и белка 24,6 %, с добавлением ДАФС-25 – 3,85 % и 24,1 %, соответственно. Однако следует отметить, что азот в мицелии может быть включен не только в белки, но и в хитин и другие азотистые соединения, а различия в количественном содержании белков в опытах объясняются, по всей вероятности, культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими изменениями клеточных стенок под действием препаратов.

Интерес к изучению аминокислот у различных видов грибов вызван тем, что они входят в состав токсинов, пигментов и других биологически активных соединений. Аминокислотный состав мицелия *A. niger*, по-видимому, жестко детерминируется генетически и различия между вариантами опыта незначительны (табл. 5). Только содержание тирозина в варианте с эупареном превышает контроль на 75 %, а в варианте с ДАФС-25 – на 58 %. Его количество снижено в варианте ДАФС-25 + цистеин на 51 %, в других вариантах отличия также незначительны. Известно, что аминокислота тирозин при участии фермента тирозиназы (К. Ф. 1.10.3.1.) последовательно окисляется через промежуточные продукты, окрашенные в красный цвет, в черный азотсодержащий пигмент меланин. В литературе представлены многочисленные данные о роли меланинов в повышении устойчивости микроорганизмов к негативному воздействию окружающей среды, в том числе отмечена роль меланинов в защите клеток грибов от химического и биологического разрушения в почве [16]. Вероятно, что увеличение концентрации тирозина – предшественника пигмента меланина в мицелии – является защитной реакцией гриба на действие таких ингибиторов, как эупарен и ДАФС-25. Добавление антидота (цистеина), по всей видимости, существенно снижает уровень синтеза аминокислоты тирозина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что препараты ДАФС-25 и эупарен имеют схожий механизм действия и ингибируют прорастание конидий *A. niger*.
2. Ингибирующее действие эупарена и ДАФС-25 нивелируется цистеином, который является антидотом.
3. В вариантах опыта с препаратом ДАФС-25 и ДАФС-25 + цистеин наблюдалась значительная стимуляция роста мицелия, по-видимому, микрочастицами элементного селена, которая превосходила контроль в 11,8–16,1 раза, на фоне снижения содержания всех фракций экстрагируемых белков.
4. В вариантах с эупареном и ДАФС-25 увеличивается концентрация тирозина, что связано с образованием защитного пигмента меланина, субстратом для биосинтеза которого служит эта аминокислота.

Таблица 5

Содержание аминокислот (%) в гидролизате порошка мицелия *A. niger*

Аминокислота	Контроль	Эупарен	ДАФС-25	Цистеин	ДАФС-25+ цистеин	Эупарен + цистеин
Аргинин	12,74± 1,72	11,72± 1,26	11,75± 0,47	13,06± 1,29	15,87± 1,59	14,02± 0,84
Лизин	6,32±0,34	5,71±0,11	6,85± 0,14	6,58±0,13	5,77± 0,52	6,81±0,34
Тирозин	2,40±0,11	4,20±0,22	3,79± 0,05	2,25±0,02	1,23± 0,08	2,52±0,15
Фенил-аланин	2,53±0,08	2,40±0,07	2,93± 0,17	2,56±0,20	3,07± 0,12	2,39±0,26
Гистидин	4,46±0,22	3,92±0,15	4,93± 0,14	4,52±0,50	4,78± 0,24	4,32±0,25
Лейцин + Изолейцин	4,51±0,20	5,13±0,46	6,23± 0,43	6,19±0,41	6,24± 0,06	5,94±0,12
Метионин	1,24±0,04	1,12±0,01	1,81± 0,02	1,03±0,04	0,89± 0,03	1,58±0,09
Валин	5,43±0,11	5,35±0,05	6,32± 0,06	5,81±0,17	5,52± 0,50	5,88±0,53
Пролин	4,56±0,16	3,90±0,19	4,88± 0,24	5,15±0,56	4,16± 0,21	5,08±0,10
Треонин	6,44±0,13	6,22±0,50	7,87± 0,16	6,65±0,06	7,14± 0,42	6,78±0,54
Серин	5,45±0,44	5,11±0,56	6,07 0,12	6,26±0,62	6,15± 0,17	6,14±0,43
Аланин	7,17±0,11	7,04±0,07	7,93± 0,79	7,10±0,14	6,83± 0,68	6,49±0,24
Глицин	5,22±0,37	4,62±0,09	5,58± 0,33	5,75±0,19	5,1± 0,22	5,41±0,34
Сумма амино- кислот	68,47± 4,03	66,44± 3,74	76,94± 3,12	72,91± 4,33	72,75± 4,84	73,36± 4,23

Список литературы

1. Deising H. B. Mechanisms and significance of fungicide resistance / H. B. Deising, S. Reimann, S. F. Pascholati // Brazilian Journal of Microbiology. – 2008. – No 39. – P. 286–295.
2. Yang C. Fungicide: modes of action and possible impact on non-target microorganisms / C. Yang, C. Hamel, V. Vujanovic, Y. T. Gan // Ecology. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-8. doi: 10.5402/2011/130289
3. Steel C. C. The physiological basis of resistance to dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea* / C. C. Steel, N. G. Nair // Pesticide Biochemistry and Physiology – 1993. – Vol. 47, No 1. – P. 60–68.

4. Yoshida M. Effects of fungicides on channels in the fungal membrane / M. Yoshida, M. Yokimoto // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 1993. – Vol. 47, No 3. – P. 171–177.
5. Гольшин Н. М. Механизмы действия фунгицидов / Н. М. Гольшин // *Защита растений*. – 1990. – № 11. – С. 13–15.
6. Мельников Н. Н. Пестициды и окружающая среда / Н. Н. Мельников, А. И. Волков, О. А. Короткова – М.: Химия, 1977. – 240 с.
7. Choi G. J. Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and resistant isolates of *Botrytis cinerea* / G. J. Choi, H. J. Lee, K. Y. Cho // *Pesticide, Biochemistry and Physiology*. – 1996. – Vol. 55, No 1. – P. 29–39.
8. Kretschmer M. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany / M. Kretschmer, M. Hahn // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2008. – Vol. 115, No 5. – P. 214–219.
9. Poluboyarinov P. A. Elemental selenium formation upon destruction of the organoselenium compound DAFS25 molecule by growing fungal mycelium / P. A. Poluboyarinov, V. A. Vikhрева, P. P. Leshchenko, A. V. Apirovskii, A. N. Likhachev // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2009. – Vol. 64, No 4. – P. 164–168.
10. Tsivileva O. M. Biodegradation of an organoselenium compound to elemental selenium by *Lentinula edodes* (shiitake) mushroom / O. M. Tsivileva, E. A. Loshchinina, A. N. Pankratov, M. M. Burashnikova, N. A. Yurasov, N. N. Bylinkina, I. A. Kazarinov, V. E. Nikitina // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2012. – Vol. 149, No 1. – P. 97–101.
11. Poluboyarinov P. A. Qualitative reaction for cysteine, reduced glutathione, and diacetophenonyl selenide / P. A. Poluboyarinov, P. P. Leshchenko // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 68, No 11. – P. 949–952.
12. Минеев В. Г. Практикум по агрохимии / В. Г. Минеев, В. Г. Сычев, О. А. Амелянчик, Т. Н. Большева, Н. Ф. Гомонова, Е. П. Дурынина, В. С. Егоров, Е. В. Егорова, Н. Л. Едемская, Е. А. Карпова, В. Г. Прижукова. – М.: Изд-во МГУ, 2001. – 689 с.
13. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – No 72. – P. 248–254.
14. Ballatori N. N-acetylcysteine as an antidote in methylmercury poisoning / N. Ballatori, M. W. Lieberman, W. Wang // *Environ. Health Perspect.* – 1998. – Vol. 106, No 5. – P. 267–271.
15. Блинохватов А. Ф. Влияние соединений селена на рост и развитие грибов. I. Микромицеты / А. Ф. Блинохватов, Г. В. Денисова, А. И. Иванов, Д. Ю. Ильин // *Микология и фитопатология*. – 2000. – Т. 34, № 5. – С.42–46.
16. Plonka P. M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects / P. M. Plonka, M. Grabacka // *Acta Biochimica Polonica*. – 2006. – Vol. 53, No 3. – P. 429–443.

INFLUENCE OF FUNGICIDE EUPAREN MULTI AND ORGANOSELENIUM PREPARATION DAPS-25 ON INTERGROWTH OF CONIDIA, BIOMASS AND NITROGEN METABOLISM OF *ASPERGILLUS NIGER* TIEGH. FUNGUS

Poluboyarinov P. A.¹, Semenova E. F.², Nazarov V. V.²

¹*Penza State University, Penza, Russia*

²*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation*

E-mail: sef1957@mail.ru

The inhibition of spore germination of the fungus *Aspergillus niger* Tiegh. by the fungicide Euparen Multi (10 µg/ml) and the organic selenium preparation DAPS-25 (10 µg/ml) was studied. The inhibiting influence of the preparations decreased after

adding amino acid cysteine (0,1 %) into a medium. Under these circumstances the mycelial mass accumulation increased in 1.6 times for samples, containing Euparen Multi + cysteine, and in 11,8 times for samples, containing Euparen Multi + cysteine. The combinations of Euparen Multi with cysteine and, especially, DAPS-25 with cysteine decreased the content of albumins, globulins, prolamins, glutelins, and the total protein amount by 18,0 % and 53,3 %, respectively. When the vegetative mycelium of *A. niger* was cultured, the degradation of DAPS-25 and the elemental selenium release were found. The biomass accumulation occurred both in the samples only with Euparen or DAPS-25 and in the samples with an antidote (cysteine). The mycelial mass in the samples with DAPS-25 and DAPS-25 + cysteine exceeded the control in 16,1 and 14,2 times, respectively, whereas it was significantly lower in the samples with Euparen and Euparen + cysteine and exceeded the control in 1,4 and 1,5 times, respectively. The significant protein decrease in the mycelium in comparison with the control was found for the samples with DAPS-25 and DAPS-25 + cysteine. In the samples with DAPS-25, the quantity of albumins was increased, and the quantity of prolamins, glutelins, and globulins was decreased. In the samples with DAPS-25 + cysteine, there was a drop only for the glutelin fraction. The Euparen action was mainly shown as a decline in the prolamin and glutelin content. At the same time, the quantity of albumins and globulins had no significant changes. The amino acid analysis of the mycelium of *A. niger* revealed that for the samples with Euparen the tyrosine content was higher than for the control by 75 %, and for the samples with DAPS-25 – by 58 %. The increase in the concentration of tyrosine, which is a precursor for melanin, might be the fungal defense reaction against the effects of such inhibitors as Euparen and DAPS-25. The addition of the antidote (cysteine) decreased the tyrosine synthesis level because of the absence of its necessity.

Keywords: Euparen Multi 500 VG, DAPS-25, diacetophenonyl selenide, sulfhydryl groups, mycelium, cysteine, albumins, globulins, prolamins, glutelins, tyrosine.

References

1. Deising H. B., Reimann S., Pascholati S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance, *Brazilian Journal of Microbiology*, **39**, 286 (2008).
2. Yang C., Hamel C., Vujanovic V., Gan Y. T. Fungicide: modes of action and possible impact on non-target microorganisms, *Ecology*, **2011**, doi: 10.5402/2011/130289 (2011).
3. Steel C. C., Nair N. G. The physiological basis of resistance to dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **47**(1), 60 (1993).
4. Yoshida M., Yokimoto M. Effects of fungicides on channels in the fungal membrane, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **47**(3), 171 (1993).
5. Golyshin N. M. Mechanisms of fungicide action, *Zashchita rasteniy*, **11**, 13 (1990). (in Russ.)
6. Mel'nikov N. N., Volkov A. I., Korotkova O. A. *Pesticides and environment.*, 240 p. (Moscow, Khimiya, 1977). (in Russ.)
7. Choi G. J., Lee H. J., Cho K. Y. Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and resistant isolates of *Botrytis cinerea*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **55**(1), 29 (1996).
8. Kretschmer M., Hahn M. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany, *Journal of Plant Diseases and Protection*, **115**(5), 214 (2008).
9. Poluboyarinov P. A., Vikhreva V. A., Leshchenko P. P., Apirovskii A. V., Likhachev A. N. Elemental selenium formation upon destruction of the organoselenium compound DAFS25 molecule by growing fungal mycelium, *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, **64**(4), 164 (2009).

10. Tsivileva O. M., Loshchinina E. A., Pankratov A. N., Burashnikova M. M., Yurasov N. A., Bylinkina N. N., Kazarinov I. A., Nikitina V. E. Biodegradation of an organoselenium compound to elemental selenium by *Lentinula edodes* (shiitake) mushroom, *Biol. Trace Elem. Res.*, **149**(1), 97 (2012).
11. Poluboyarinov P. A., Leshchenko P. P. Qualitative reaction for cysteine, reduced glutathione, and diacetophenonyl selenide, *Journal of Analytical Chemistry*, **68**(11), 949 (2013).
12. Mineev V. G., Sychev V. G., Amel'yanchik O. A., Bolysheva T. N., Gomonova N. F., Durygina E. P., Egorov V. S., Egorova E. V., Elemskaya N. L., Karpova E. A., Prizhukova V. G. *Manual on agrochemistry*, 689 p. (Moscow, Izdatel'stvo MGU, 2001). (in Russ.)
13. Ballatori N., Lieberman M. W., Wang W. N-acetylcysteine as an antidote in methylmercury poisoning, *Environ. Health Perspect.*, **106**(5), 267 (1998).
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
15. Blinokhvatov A. F., Denisova G. V., Ivanov A. I., Il'in D. Yu. Influence of selenium compounds on fungal growth and development. I. Micromycetes, *Mikologiya i fitopatologiya*, **34**(5), 42 (2000). (in Russ.)
16. Plonka P. M., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects, *Acta Biochimica Polonica*, **53**(3), 429 (2006).