

На правах рукописи

Сёмина Юлия Викторовна

**ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
НЕПАТОГЕННОГО ИЗОЛЯТА FS-94 (*FUSARIUM SAMBUCINUM*) И ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СЕПТОРИОЗА
ПШЕНИЦЫ (*STAGONOSPORA NODORUM*) И ДРУГИХ
ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ**

Специальность 06.01.07- Защита растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2013

Диссертационная работа выполнена в лабораториях патофизиологии и молекулярной биологии ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии Россельхозакадемии.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Щербакова Лариса Александровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
заведующая лабораторией фитопаразитологии
Института проблем экологии и эволюции
им А. Н. Северцова РАН
Зиновьева Светлана Васильевна

кандидат биологических наук, ведущий
научный сотрудник кафедры микологии и
альгологии биологического факультета
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова
Александрова Алина Витальевна

Ведущая организация: **Российский институт дружбы народов**

Защита состоится « 4 » декабря 2013 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.04 при ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К. А. Тимирязева» по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49 (тел./факс 8-499-976-24-92).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К. А. Тимирязева.

Автореферат разослан « » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Смирнов А. Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Селекция на устойчивость к фитопатогенам и обработка пестицидами являются надежными методами защиты растений от болезней, однако во всем мире продолжает сохраняться тенденция увеличения потерь урожая многих экономически важных сельскохозяйственных культур от различных фитопатогенных микроорганизмов, среди которых лидируют фитопатогенные грибы. Несмотря на то, что применение фунгицидов весьма существенно снижает потери урожая, особенно в случаях отсутствия высокоустойчивых сортов, в настоящее время становится очевидным, что этот эффективный способ защиты растений от болезней связан с целым рядом нежелательных последствий. В частности, многие пестициды не полностью разрушаются в природе, и их токсичные остатки могут включаться в пищевые цепи (Choudary et al., 2007). Интенсивное использование пестицидов в сельском хозяйстве приводит к насыщению биосферы веществами, опасными для человека и сельскохозяйственных животных, вредит полезной флоре и фауне, вызывает появление резистентных популяций возбудителей заболеваний, а также массовое размножение видов, ранее не представлявших серьезной опасности (Sharma and Parihar, 2010). В результате возникает необходимость постоянного увеличения норм и кратности обработок пестицидами, а их применение иногда становится экономически невыгодным. В связи с этим в настоящее время первостепенное значение приобретает вопрос о поиске и включении в систему интегрированной защиты растений альтернативных или дополнительных методов, более отвечающих современным экологическим требованиям. Развитие таких методов и внедрение их в сельскохозяйственное производство может способствовать сокращению применения химических препаратов, что в целом позволит сделать систему защиты растений более экологичной и безопасной.

Одним из подходов к разработке биологических средств защиты растений является использование продуктов метаболизма микробных антагонистов, в том числе метаболитов непатогенных изолятов фузариевых грибов (Дорофеев и др., 2001; Fravel et al., 2003; Щербакова и др., 2006). Так, ранее было установлено, что непатогенный и нетоксиногенный изолят FS-94 гриба *Fusarium sambucinum* является продуцентом внутриклеточных метаболитов, обладающих защитными свойствами против ряда фитопатогенных грибов (Щербакова и др., 2006), в том числе и против возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* (Shcherbakova et al., 2012). Представлялось целесообразным выяснить, способен ли данный изолят выделять в культуральную жидкость метаболиты, защищающие растения пшеницы от этого вредоносного патогена, и, если таковые будут обнаружены в ее составе,

исследовать их протекторные свойства против *S. nodorum* более подробно, а также оценить их эффект в отношении других фитопатогенных грибов. Кроме того, выделение внутриклеточных метаболитов, препятствовавших развитию септориоза, из биомассы *F. sambucinum* требовало достаточно сложных процедур выделения и очистки (Shcherbakova et al., 2012), в то время как культуральная жидкость представляла бы собой гораздо более доступный источник продуктов метаболизма этого биоагента.

Дополнительную актуальность данной работе придает выбор в качестве основных объектов исследования, помимо возбудителя септориоза, вредоносность которого в последние годы возрастает (Назарова и др., 2008; Назарова, 2010), таких грибов как *Alternaria radicina*, патогена моркови и других зонтичных, а также *Bipolaris sorokiniana*, патогена ячменя и других злаковых. Против *A. radicina* применяется ограниченное количество фунгицидов и биопрепаратов, кроме того, отсутствуют полностью устойчивые к нему сорта моркови (Krämer et al., 2009). Число эффективных биопрепаратов против *B. sorokiniana* в настоящее время также весьма ограничено. В связи с этим существует необходимость разработки дополнительных средств для интегрированной защиты злаковых и овощных культур от этих фитопатогенов.

Цели и задачи исследований. Целью исследований была оценка способности внеклеточных метаболитов изолята FS-94 гриба *Fusarium sambucinum* Fuckel. защищать растения пшеницы от септориоза (*Stagonospora nodorum*), а также другие растения от болезней грибной этиологии.

В задачи исследований входило:

1. Изучение способности изолята FS-94 продуцировать внеклеточные метаболиты с антисепториозной активностью.
2. Исследование влияния экзометаболитов на *S. nodorum* и изучение защитных механизмов, которые эти метаболиты индуцируют в растениях пшеницы.
3. Оценка возможности использования внеклеточных метаболитов FS-94 против других фитопатогенных грибов, в том числе возбудителей альтернариоза моркови и гельминтоспориоза ячменя.
4. Первичная биохимическая характеристика и определение природы метаболитов, ответственных за защитное действие.
5. Проверка защитного эффекта исследуемых метаболитов изолята FS-94 против *S. nodorum* на растениях пшеницы в полевых условиях.

Научная новизна исследований. Впервые установлено, что метаболиты, секретируемые изолятом FS-94 гриба *F. sambucinum*, подавляют развитие ряда фитопатогенных грибов. Показано, что защитный эффект этих метаболитов в отношении возбудителей септориоза пшеницы (*S. nodorum*) и альтернариоза

моркови (*A. radicina*) основан как на их способности подавлять прорастание спор этих фитопатогенов, так и на индуцировании к ним устойчивости растений. Продемонстрировано, что исследуемые метаболиты являются элиситорами системной приобретенной устойчивости (SAR) и активируют сигнальные системы растений пшеницы, в том числе салицилат-зависимую сигнальную систему. Впервые обнаружено, что экзометаболиты изолята FS-94 обладают свойствами сенсбилизаторов, усиливающих чувствительность *S. nodorum* к азоловым фунгицидам и пролонгирующих действие последних. Впервые показано, что фракция внеклеточных метаболитов с максимальной антисепториозной активностью имеет белковую природу.

Практическая значимость работы. В полевых условиях показана эффективность защитного действия экзометаболитов изолята FS-94 от одного из возбудителей септориоза пшеницы - *S. nodorum*. Продемонстрировано, что обработка растений промышленным фунгицидом Фоликур БТ совместно с фильтратом культуральной жидкости позволяет в пять раз снизить дозу фунгицида без потери его защитного эффекта. Получены данные, показывающие, что внеклеточные метаболиты FS-94 могут служить основой для создания биопрепаратов комплексного действия против ряда фитопатогенных грибов, сочетающих в себе свойства биопестицидов и индукторов устойчивости. Способность метаболитов FS-94 индуцировать в растениях неспецифическую устойчивость открывает принципиальную возможность их использования на различных растениях против ряда фитопатогенных грибов. На основе полученных данных подготовлена и подана заявка на международный патент по системе PCT.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на V и VI совещаниях Международной Организации по Биоконтролю (IOBC-WPRS) "Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases" в 2009 г. (Испания) и в 2013 г. (Франция); на Международной конференции "PR-proteins and Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases" в 2011 г. (Швейцария); на Международной научно-практической конференции «Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика» в 2012 (ГНУ ВНИИФ, Московская обл.); на III Всероссийской и международной конференции «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» в 2012 (Санкт-Петербург) и на XVII Международном симпозиуме "Modern Fungicides and Antifungal Compounds" в 2013 г. (Германия).

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных исследований, результаты которых получены исключительно самим автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Публикации по теме диссертации. По результатам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 статьи в российских рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ, а 3 статьи в иностранных изданиях, включенных в базы Web of Science и PubMed.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Материал изложен на 129 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 41 рисунок. Список литературы включает 154 работы, в том числе 140 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Обоснована актуальность темы исследования, сформулированы основная цель и задачи исследования.

Глава I. Обзор литературы. На основе анализа публикаций дана характеристика альтернативных химическому методу способов защиты растений от болезней, развивающихся в настоящее время. Рассмотрены возможности иммунизации растений неспецифическими элиситорами грибов, в частности экзометаболитами грибного происхождения, такими как экстрацеллюлярные ферменты и антимикробные пептиды. Уделено внимание перспективам использования культуральных фильтратов грибов в качестве биофунгицидов при борьбе с болезнями растений, а также использования их в смеси с коммерческими фунгицидами с целью снижения доз последних.

Глава II. Материалы и методы. Работа была выполнена в 2009-2013 гг. в лабораториях патофитофизиологии и молекулярной биологии ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (ВНИИФ) Россельхозакадемии. Непатогенный и нетоксиногенный изолят FS-94 *Fusarium sambucinum*, а также фитопатогенные изоляты грибов *Stagonospora nodorum*, *Septoria tritici*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* были получены из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ. Изоляты *Alternaria radicina* и *Alternaria dauci* были любезно предоставлены доктором Р. Кремером из Института садоводства (Institute of Horticultural Crops) в Кведлинбурге (Германия).

Культуральную жидкость (КЖ) изолята FS-94 получали методом глубинного культивирования гриба на жидкой мелассо-сахарозно-аммонийной среде (МСА), способствовавшей образованию целевых метаболитов, которая была подобрана на первом этапе исследований. Данную среду инокулировали суточной посевной культурой изолята (10 мл на 100 мл МСА-среды) и проводили ферментацию в течение 48 часов при 220 об/мин и 25 °С. Отделенную от биомассы КЖ пропускали через многослойный фильтр GF/A (Whatman), а затем - через стерильный фильтр Millipore (0,22 мкм).

Получение высокомолекулярной фракции (ВМФ) и разделение фильтрата КЖ (ФКЖ) на фракции, содержащие вещества, различающиеся по номинально отсекаемой молекулярной массе (НОММ), выполняли методом ультрафильтрации, центрифугируя ФКЖ в пробирках Amicon Ultra (Millipore) с селективными мембранами, обеспечивающими фракционирование веществ по НОММ 50, 30 и 5 кДа.

Для оценки фунгицидной активности экзометаболитов споры *S. nodorum*, *S. tritici*, *A. radicina*, *A. dauci*, *A. alternata* и *B. sorokiniana* суспендировали в исходных или подвергнутых фракционированию ФКЖ. Суспензии наносили на тонкий слой 1 % водного агара, подсчитывали под микроскопом число проросших спор и наблюдали за изменением их морфологии.

Для выявления эффекта сенсibilизации (повышения чувствительности) *S. nodorum* к фунгицидам оценивали радиальный рост колоний гриба на агаризованных средах, в которые Дивиденд или Фоликур были добавлены как индивидуальные добавки или вместе с ФКЖ.

Для оценки индуцирующей и фунгицидной активности экзометаболитов на изолированных листьях пшеницы и вегетирующих растениях использовали модифицированную методику Пыжиковой (Пыжикова и др., 1989).

Анализ способности метаболитов FS-94 защищать растения моркови от альтернариоза изучали на изолированных черешках и высечках из корневых дисков. ВМФ наносили на участки флоэмы корневых дисков или на нижнюю часть черешка. Через сутки метаболиты удаляли и наносили споровую суспензию *A. radicina* (5×10^5 спор/мл). Если экзометаболиты FS-94 применяли одновременно с инокуляцией корневых дисков и черешков патогеном, суспензию спор *A. radicina* готовили в тестируемой фракции метаболитов. Учеты интенсивности развития альтернариоза осуществляли с помощью Digital Analysis System, разработанной компанией LemnaTec, Германия (Nothnagel and Krämer, 2007; Krämer et al., 2008). Определение антигенов *A. radicina* в инфицированных черешках проводили методом DAS-ELISA. При этом использовали поликлональные кроличьи антитела и их конъюгаты со щелочной фосфатазой, полученные из Института садоводства (Германия).

Исходные культуры клеток пшеницы (сорта Энита и Мироновская 808) и риса (линия OS) были получены из Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН. Измерение экстрацеллюлярного pH суспензионной культуры клеток выполняли по методике первичного скрининга индукторов устойчивости растений к фитопатогенам (Щербакова и Кромина, 2008).

Экстракцию и анализ содержания салициловой кислоты в листьях пшеницы проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя разработанную ранее методику (Shcherbakova et al., 2011).

Влияние термообработки, pH среды и ферментативного гидролиза на активность экзометаболитов проверяли по способности ингибировать прорастание спор *S. nodorum* и индуцировать устойчивость растений пшеницы к септориозу. Термообработку осуществляли, инкубируя ФКЖ на водяной бане при 100 °С в течение 15 мин. Влияние pH исследовали после подщелачивания фильтрата Трис-НСl буфером до pH 8,0, а ферментативный гидролиз проводили, инкубируя ФКЖ с протеиназой К в 30 мМ Трис-НСl буфере, pH 8,0 при 37 °С в течение 4 часов. Ферментативную реакцию тормозили фенолметилсульфонилфторидом в конечной концентрации 1 мМ. Контрольный образец ФКЖ, содержащий все указанные компоненты, кроме протеиназы, инкубировали в тех же условиях. Образцы охлаждали и доводили их pH до 4,5 или 5,0 с помощью 0,1 н HCl.

Эксклюзионную гель-хроматографию ВМФ проводили на колонке Sepharacyl S200HR (GE Healthcare). Элюцию вели 50 мМ NaH₂PO₄, pH 5,0, содержащим 0,155 М NaCl (90 мл/час), фиксируя поглощение суб-фракций при 214 нм. Биологическую активность суб-фракций тестировали, определяя их способность тормозить прорастание спор *S. nodorum*.

Для выявления аминокислот в составе ВМФ ее гидролизовали в 6 н HCl при 110 °С в течение 24 час и разделяли гидролизаты с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах силикагеля в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5); пластины окрашивали нингидрином.

Определение молекулярных масс пептидов наиболее активной белковой фракции было выполнено при участии сотрудников Института биоорганической химии РАН с помощью матричной ассоциированной лазерной десорбционной/ионизационной (МАЛДИ) масс-спектрометрии на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex, оснащенном УФ-лазером (337 нм) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы использовали синапиновую кислоту. Масс-спектры анализировали с помощью программы Bruker Data Analysis for TOF.

Мелкоделяночные полевые опыты проводили на территории ВНИИФ (Московская область) в 2012 и 2013 гг. на искусственном инфекционном фоне. Схема полевого опыта 2012 г. помимо контроля включала опрыскивание растений на стадии конец кущения – начало выхода в трубку фильтратом КЖ (200 мл на делянку) и фунгицидом Фоликур БТ, КЭ в норме 1 л/га (далее «Фоликур, норма»). В 2013 году к указанным вариантам было добавлено опрыскивание Фоликуром БТ в пятикратно меньшей дозе (далее «Фоликур, 1/5 нормы») и смесью фильтрата КЖ с Фоликуром, 1/5 нормы. Интенсивность развития септориоза оценивали по шкале Джеймса (Санин и др., 2002).

Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 6.0 (SoftStat), с помощью которой рассчитывали указанные в таблицах и на рисунках ошибку среднего арифметического или стандартное отклонение, а также определяли достоверность различий (p) с помощью t -теста для независимых переменных. Во всех представленных экспериментах $p \leq 0,05$.

Глава III. Результаты и обсуждение

1. Изучение способности изолята FS-94 продуцировать метаболиты с антисепториозной активностью

Для подбора питательных сред, стимулирующих у изолята FS-94 биосинтез экзометаболитов, препятствующих развитию *S. nodorum*, была протестирована антисепториозная активность ФКЖ, полученных после роста гриба в идентичных условиях культивирования на питательных средах различного состава, десять из которых представляли собой модификации по источникам азота и углерода мелассо-пептонной среды (табл. 1, среда 1), разработанной ранее для получения внутриклеточных метаболитов с антисепториозной активностью.

Таблица 1

Влияние состава питательных сред на способность изолята FS-94 продуцировать экстрацеллюлярные метаболиты, препятствующие развитию *S. nodorum* на изолированных листьях пшеницы

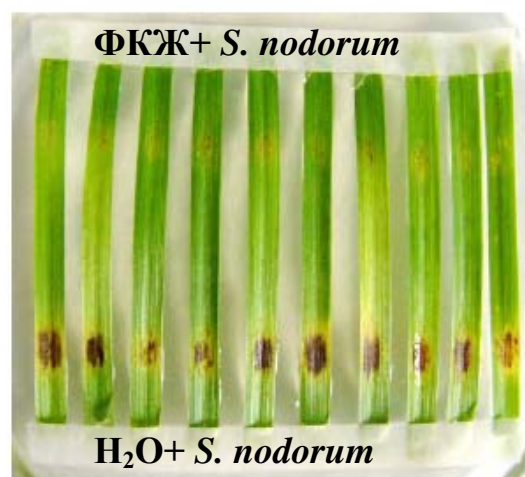
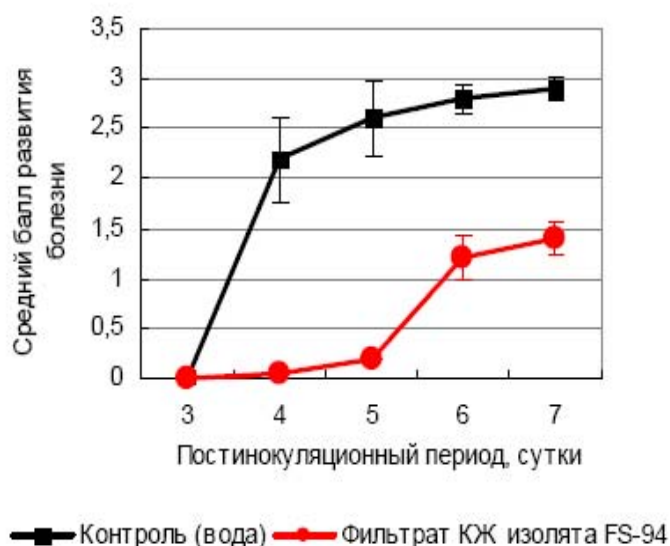
№	Компоненты среды, использованные в качестве источников углерода и азота, г/л*					рН**	Подавление развития болезни фильтратом КЖ, %	
	меласса	сахароза	пептон	(NH ₄) ₂ SO ₄	аспарагин		неразведенным	разведенным в 10 раз
1	60	-	0,8	-	-	7,6	2	-
2	20	20	0,8	-	-	7,0	0	-
3	20	20	0,1	1,5	-	5,2	74	2
4	20	20	-	1,5	-	5,4	90	0
5	-	20	-	1,5	-	2,5	1	-
6	-	30	-	1,0	-	2,0	2	-
7	40	-	-	1,0	-	7,3	0	-
8	10	20	-	1,0	-	4,0	100	96
9	-	30	-	-	10	5,7	52	40
10	-	30	-	1,0	-	2,0	2	-
11	15	15	-	1,0	-	6,9	0	-

* Помимо указанных компонентов все среды содержали (г/л) MgSO₄ – 0,2 и КН₂РО₄ – 0,5.

** Значение рН культуральной жидкости в конце культивирования.

Результаты исследований показали, что при культивировании на 4 питательных средах грибок секретирует в КЖ метаболиты, препятствующие развитию септориоза (табл. 1, среды 3, 4, 8, 9). Способность ФКЖ защищать растения пшеницы от септориоза зависела от того, какие источники азота и углерода были добавлены в среду, регулировалась их концентрацией и реализовывалась только в том случае, если pH среды в конце культивирования составлял от 4,0 до 5,7. Фильтраты со щелочным pH не приобретали эту активность после их химического подкисления до указанных выше значений. Максимальный защитный эффект был получен после выращивания изолята на среде № 8. ФКЖ, полученные после роста гриба на трех других средах, стимулирующих антисепториозную активность, теряли или снижали ее после разведения (таб. 1). Поэтому в качестве источника целевых метаболитов была выбрана среда № 8 (МСА-среда).

В опытах *in vitro* было обнаружено, что ФКЖ, полученные после роста FS-94 на этой среде, подавляли прорастание спор *S. nodorum*, причем их ингибирующий эффект сохранялся вплоть до разведения фильтрата в 200 раз. Однако, защитный эффект метаболитов исследуемого изолята на растениях пшеницы был связан не только с их фунгицидными свойствами, поскольку он проявлялся при отсутствии контакта с патогеном. Так, предобработка ФКЖ изолированных листьев пшеницы сорта Мироновская 808, когда его наносили за сутки до инокуляции и перед нанесением спор тщательно удаляли с листьев, существенно снижала степень поражения септориозом (рис. 1).



А

Б

Рис. 1. Развитие септориоза на изолированных листьях пшеницы, обработанных ФКЖ (10 мкл/лист) за сутки до инокуляции *S. nodorum* (А) и фото развития симптомов (Б)

2. Выделение из ФКЖ фракции высокомолекулярных метаболитов с антисепториозной активностью

При культивировании *in vitro* грибы-микросциеты выделяют в среду роста различные вещества, например, пигменты, олигосахариды, антимикробные пептиды, литические ферменты и другие белки (Iida *et al.*, 1995; Ng, 2004). Если эффект ФКЖ изолята FS-94 против *S. nodorum* связан с присутствием в ее составе последних, защитная активность фильтрата должна быть ассоциирована с его высокомолекулярной фракцией. Для проверки данного предположения был проведен анализ распределения антисепториозной активности в различных по НОММ фракциях ФКЖ. Полученные данные показали, что искомая активность сосредоточена во фракции веществ ≥ 30 кДа, поскольку фракции с НОММ менее 30 кДа не подавляли ни развитие болезни на изолированных листьях пшеницы, ни прорастание спор патогена. Фракция с НОММ от 30 до 50 кДа не подавляла прорастание спор *S. nodorum*, но проявляла защитную активность на изолированных листьях пшеницы. Таким образом, фракция с НОММ ≥ 30 кДа содержала метаболиты, обладавшие как фунгицидным действием, так и способностью индуцировать устойчивость к септориозу, и при их совместном действии происходило полное подавление заболевания. Высокая активность и присутствие метаболитов с разным механизмом действия послужили причиной выбора высокомолекулярной фракции с НОММ 30 кДа (далее в тексте ВМФ) для дальнейших исследований.

3. Исследование возможности использования ФКЖ и ВМФ изолята FS-94 против других фитопатогенных грибов

3.1. Сравнительная фунгицидная эффективность экзометаболитов *in vitro*

Оценка фунгицидного действия экзометаболитов изолята FS-94 в отношении таких фитопатогенов как *S. tritici*, *A. radicina*, *A. dauci*, *A. alternata* и *B. sorokiniana* показала, что чувствительность этих возбудителей к метаболитам FS-94 была ниже, чем у *S. nodorum* и значительно варьировала. Так, ФКЖ статистически значимо ингибировал прорастание спор *S. tritici* до его пятидесятикратного разведения, а спор *A. radicina*, *A. dauci* и *A. alternata* лишь до пятикратного разведения включительно. Прорастание спор *B. sorokiniana* не подавлял даже неразведенный фильтрат. Достоверное торможение прорастания спор у данного гриба было достигнуто только при применении ВМФ, которая полностью ингибировала прорастание спор при разведении в два раза. Таким образом, полученные данные показали, что из всех исследуемых нами грибов наиболее чувствительными оказались такие фитопатогены как *S. nodorum* и *S. tritici*, исследованные виды рода *Alternaria* занимали промежуточное положение, а наименее чувствительным оказался *B. sorokiniana*.

ФКЖ оказывал ингибирующее действие не только на прорастание спор, но и на радиальный рост мицелия *S. nodorum*, *S. tritici* и *B. sorokiniana*. Так, при культивировании этих грибов на среде, содержащей ФКЖ в концентрации 100 мкл/мл, наблюдалось заметное сокращение среднего диаметра колоний. Обнаруженный эффект фильтрата в отношении *S. nodorum* и *S. tritici* был стабильным и лишь незначительно изменялся к концу культивирования. В отличие от этого, ингибирующее влияние ФКЖ на рост мицелия *B. sorokiniana* постепенно ослабевало, однако, различия с контролем сохранялись вплоть до завершения наблюдений.

3.2. Исследование возможности сенсibilизации *S. nodorum* к Фоликуру и Дивиденду внеклеточными метаболитами изолята FS-94

Дальнейшие эксперименты показали, что внеклеточные метаболиты изолята FS-94 не только ограничивают рост и ингибируют прорастание спор *S. nodorum*, но и обладают способностью повышать чувствительность этого патогена к Дивиденду и Фоликуру. Поскольку отмечено, что промышленные концентрации коммерческих фунгицидов и высокие концентрации природных антифунгальных соединений, эффективно подавляющие рост патогенов *in vitro*, препятствуют выявлению сенсibilизирующего эффекта (Dzhavakhiya et al., 2012; Campbell et al., 2012), в наших экспериментах Дивиденд, Фоликур и ФКЖ были использованы в концентрациях 0,01 ppm, 0,25 ppm и 20 мкл/мл, соответственно, при которых торможение роста *S. nodorum* было незначительным (рис. 2).

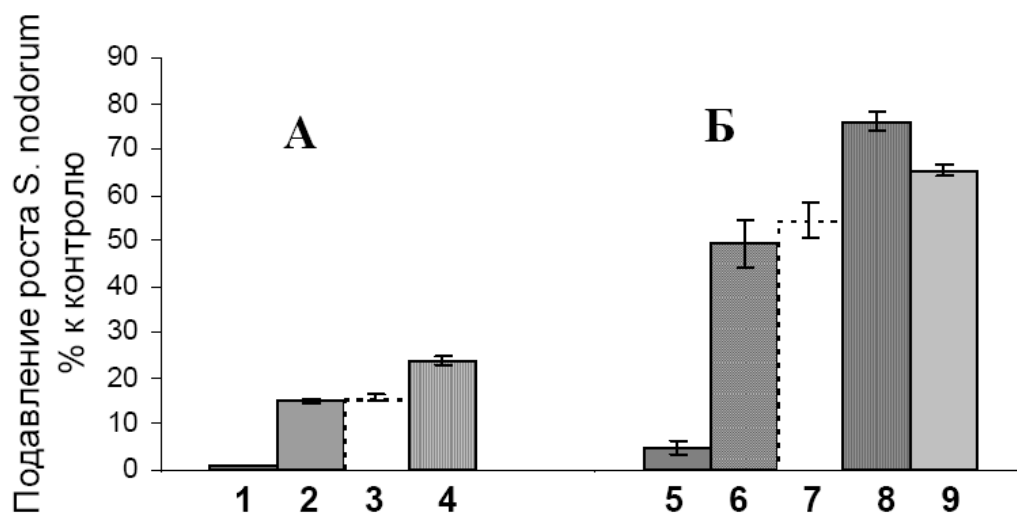


Рис. 2. Подавление роста *S. nodorum* на КГА в присутствии ФКЖ, 20 мкл/мл (1, 5); Дивиденда, 0,01 ppm (2); Дивиденда, 0,01 ppm + ФКЖ (4); Фоликура, 0,25 ppm (6) и 0,5 ppm (9); Фоликура, 0,25 ppm + ФКЖ (8). Уровень ожидаемого аддитивного эффекта (арифметическая сумма) от применения Дивиденда совместно с ФКЖ (3) и Фоликура совместно с ФКЖ (7)

Так, под влиянием ФКЖ торможение роста колоний гриба составляло 1,5% и 6,5% на 9 и 20 сутки, соответственно, а фунгицидный эффект Дивиденда и Фоликура не превышал 15% и 45%. Однако, совместное применение фунгицидов и ФКЖ приводило к значительному усилению их действия против данного патогена, существенно снижая скорость его роста (рис. 2). Более того, при совместном внесении Дивиденда и ФКЖ наблюдался хорошо выраженный синергизм, в этом случае реальный рост-ингибирующий эффект достоверно превосходил ожидаемый аддитивный эффект, рассчитанный как арифметическая сумма процентов торможения в случае раздельного воздействия ФКЖ и Дивиденда (рис. 2, А). Комбинирование ФКЖ с Фоликуром также повышало чувствительность *S. nodorum* к данному фунгициду и сопровождалось синергизмом (рис. 2, Б). В последнем случае совместное применение обеспечивало даже более высокий уровень антисепториозного эффекта (торможение 76,1 %), чем вдвое большая концентрация Фоликура при его индивидуальном использовании (торможение 65,4 %).

Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболиты, содержащиеся в культуральной жидкости *F. sambucinum*, представляют определенный интерес с точки зрения возможного использования их в качестве сенсibiliзирующих агентов, по крайней мере, в отношении *S. nodorum*. Кроме того, их применение на растениях совместно с исследованными фунгицидами, вероятно, позволило бы снизить дозы и нормы расхода последних, сохраняя при этом желаемый уровень защитного эффекта.

3.3. Изучение защитного действия экзометаболитов *in vivo* с использованием трех патосистем

Пшеница – *S. nodorum*. Описанные выше эксперименты, в которых исследовали способность ФКЖ и присутствующих в нем высокомолекулярных метаболитов стимулировать локальную устойчивость растений к *S. nodorum*, были проведены на изолированных листьях пшеницы сорта Мироновская 808. Необходимо было убедиться, что ФКЖ и (или) ВМФ индуцируют устойчивость у вегетирующих растений. Кроме того, следовало проверить, не является ли обнаруженный защитный эффект сортоспецифичным, поскольку хорошо известно, что сортовая устойчивость легко преодолевается новыми расами патогена. С практической и теоретической точек зрения было также важно установить, происходит ли под влиянием метаболитов изолята FS-94 индукция системной устойчивости к *S. nodorum*, а также исследовать характер их защитного действия в других патосистемах.

Опыты, проведенные одновременно на сорте Мироновская 808 и 10 других сортах пшеницы, показали, что ВМФ индуцировала локальную

устойчивость в листьях всех этих сортов (рис 3). Следовательно, устойчивость к септориозу листьев, вызванная высокомолекулярными метаболитами изолята FS-94, не определялась спецификой того или иного сорта.

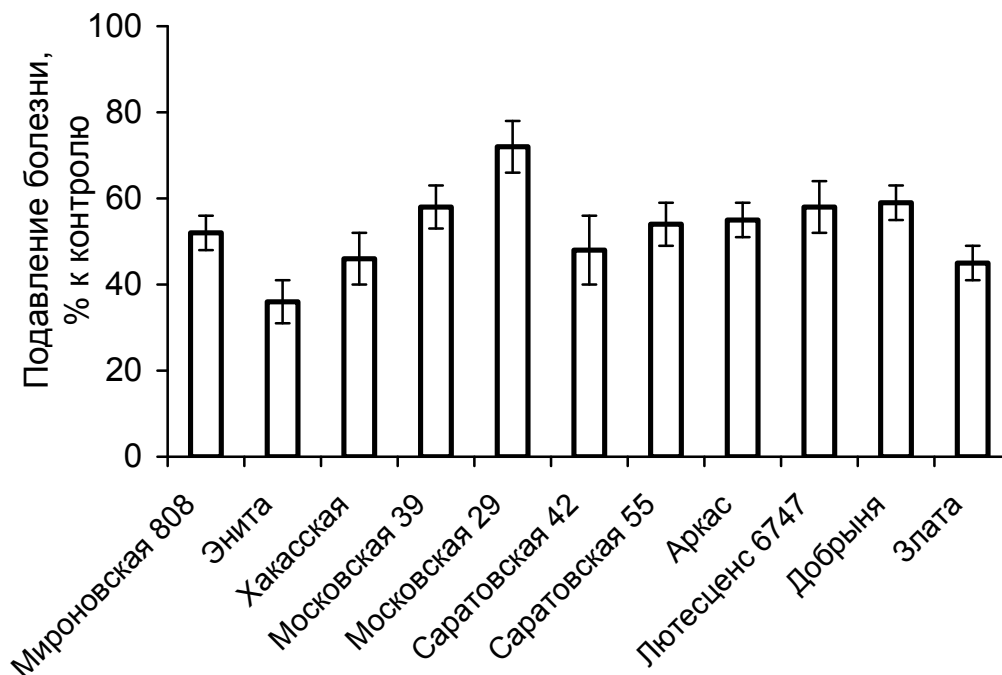


Рис. 3. Биологическая эффективность подавления развития септориоза на изолированных листьях различных сортов пшеницы после их предварительной обработки одним и тем же препаратом ВМФ (10 мкл/лист)

Для того чтобы выяснить, способны ли экстрацеллюлярные метаболиты вызывать системную устойчивость у вегетирующих растений пшеницы, были проведены эксперименты с применением различных вариантов обработки листьев. ВМФ наносили на листья растений, через сутки капли снимали и наносили суспензию спор *S. nodorum* непосредственно в место нанесения фракции или на необработанные участки листа. Подавление симптомов происходило не только в месте нанесения экзометаболитов, но также и на необработанных фракцией частях обработанных листьев (рис. 4, А, Б). Кроме того, было обнаружено, что метаболиты способны индуцировать в растениях пшеницы системную устойчивость. Так, значительное снижение степени развития септориоза отмечали, когда ВМФ была нанесена на листья первого яруса растений пшеницы, а суспензия спор патогена - на листья второго яруса. (Рис. 4, В). Следует подчеркнуть, что локальный защитный эффект наблюдался как на изолированных листьях пшеницы, так и на целых растениях, в то время как системная устойчивость - только на вегетирующих растениях.

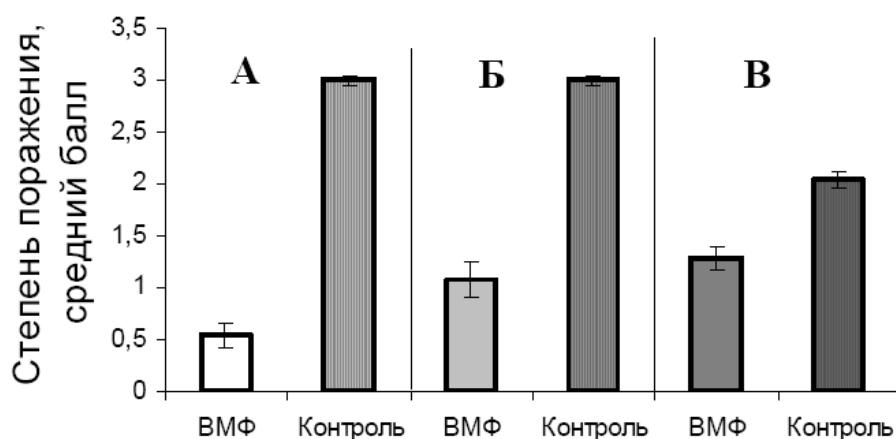


Рис. 4. Подавление развития септориоза на вегетирующих растениях пшеницы при инокуляции листьев суспензией спор *S. nodorum* в месте их предварительной обработки ВМФ (А), после инокуляции необработанных участков на листьях, обработанных этой фракцией (Б) и инокуляции необработанных листьев верхнего яруса после обработки листа нижнего яруса (В). Концентрация ВМФ в каждом варианте обработки 30 мкл/лист

Ячмень - *B. sorokiniana*. В опытах с прединокуляционной обработкой ВМФ изолированных листьев ячменя сорта Зазерский 85 не было выявлено способности индуцировать локальную устойчивость. Можно предположить, что отсутствие индуцирующей активности в системе ячмень - *B. sorokiniana* вероятно связано как с особенностями данного вида злаковых и достаточно высокой восприимчивостью сорта к листовым пятнистостям, так и с особенностями патогена. При нанесении ВМФ одновременно с суспензией спор патогена было отмечено значительное (по визуальной оценке почти двухкратное) уменьшение размеров некрозов.

Морковь - *A. radicina*. В ходе экспериментов по изучению способности метаболитов индуцировать устойчивость растений моркови к альтернариозу было обнаружено значительное ослабление симптомов заболевания на подвергнутых прединокуляционной обработке черешках низковосприимчивого (Gonsun No. 2) и высоковосприимчивых (Senta, Amst. Master и Nantes Normu) сортов (рис. 5, А). К 7 суткам после нанесения спор патогена площадь поражения черешков сорта Gonsun и сорта Amst. Master, по сравнению с контролем, сокращалась более чем в полтора, а черешков сортов Senta и Nantes Normu - почти в три раза. Нанесение на черешки моркови суспензии спор *A. radicina* одновременно с фракцией метаболитов также препятствовало развитию заболевания. В этом случае максимальный защитный эффект на черешках достигался также через 7 суток после инокуляции и был наиболее заметен на восприимчивых сортах. Иммуноферментный анализ сока контрольных и обработанных ВМФ за сутки до инокуляции патогеном

черешков моркови подтвердил данные фитопатологических опытов и свидетельствовал о том, что содержание антигенов гриба в предобработанных черешках было существенно ниже, чем в контрольных (рис. 5, Б).

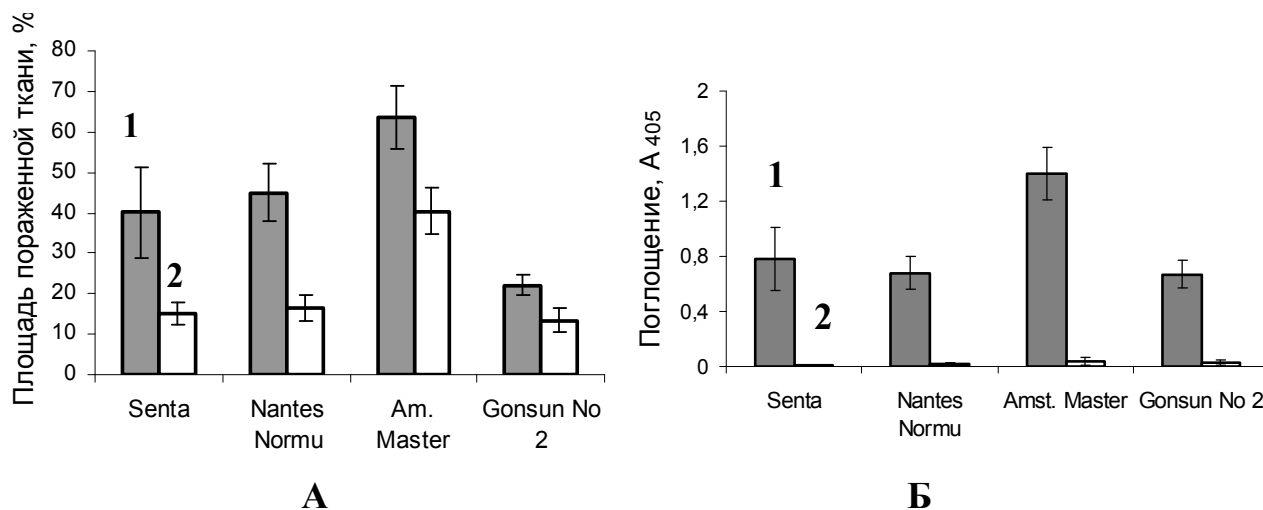


Рис. 5. Развитие *A. radicina* на изолированных черешках моркови различных по восприимчивости сортов (А) и содержание грибных антигенов в соке черешков (Б) после нанесения ВМФ за сутки до инокуляции патогеном. 1 - Контроль (вода); 2 – черешки, обработанные ВМФ (10 мкл на черешок)

Предварительное нанесение ВМФ на поверхность высечек из корнеплодов двух высоковосприимчивых сортов приводило к достоверному сдерживанию развития альтернариоза (Рис. 6).

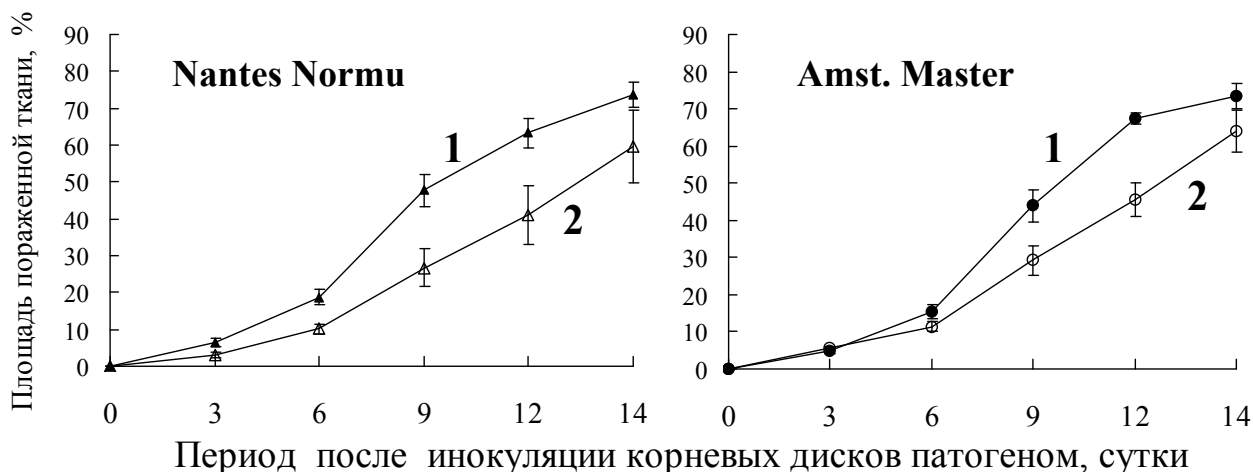


Рис. 6. Динамика развития альтернариоза на дисках корней высоковосприимчивых сортов моркови, не обработанных (1) и обработанных (2) ВМФ (10 мкл на диск) за сутки до инокуляции патогеном

Нанесение ВМФ на корневые диски одновременно с заражением их *A. radicina* вызывало значительное ослабление симптомов альтернариоза у всех исследованных сортов моркови. У высоковосприимчивых сортов Senta, Nantes Normu и Amst. Master поражение контрольных дисков составляло от 50 до 69 %, в то время как после нанесения спор гриба совместно с ВМФ было поражено от 14 до 27% поверхности дисков. Контрольные диски корнеплодов низковосприимчивого сорта Gonsun No. 2 были поражены на 36 или 52 %, а процент поражения ткани дисков, обработанных ВМФ, был втрое или вдвое меньше. У всех сортов, независимо от их уровня восприимчивости, развитие болезни на обработанных дисках происходило медленнее, чем на контрольных. Разница с контролем сохранялась вплоть до 12 дня на высоковосприимчивых сортах и в течение всего периода наблюдений на низковосприимчивом сорте Gonsun No. 2.

Результаты экспериментов с использованием трех различных патосистем подтвердили, что защитные свойства ФКЖ и его ВМФ не ограничиваются биоцидным действием и связаны с их способностью индуцировать локальную и системную устойчивость в растениях. Возникает вопрос о том, какие именно из возможных защитных механизмов принимают участие в развитии этих типов устойчивости в ответ на обработку экстрацеллюлярными метаболитами гриба.

4. Исследование защитных механизмов растений пшеницы, ответственных за развитие устойчивости к *S. nodorum*, индуцированной экзометаболитами изолята FS-94

4.1. Активация протонной сигнальной системы клеток пшеницы

Поскольку экстрацеллюлярные метаболиты изолята FS-94 обладают способностью индуцировать устойчивость растений пшеницы и моркови, которые относятся не только к разным семействам, но и к разным классам, можно предположить, что метаболиты активируют неспецифические защитные механизмы, общие для филогенетически отдаленных растений. Одним из таких механизмов, запускающих каскад защитных реакций, является ответ растительных клеток на ранних стадиях их взаимодействия с патогеном, который проявляется в изменении обмена ионов K^+ и H^+ и связан с активацией протонной сигнальной системы растения (Тарчевский, 2000). В суспензионной культуре клеток растений этот эффект можно обнаружить уже через несколько минут после их контакта с потенциальным элиситором устойчивости по обратимому изменению pH инкубационной среды (Felix and Boller, 2003). Этот подход был использован для того, чтобы выяснить, способен ли ВМФ функционировать как элиситор неспецифических защитных ответов растений.

Добавление ВМФ в суспензионную культуру клеток яровой пшеницы сорта Энита приводило к их активной ответной реакции (рис. 7).

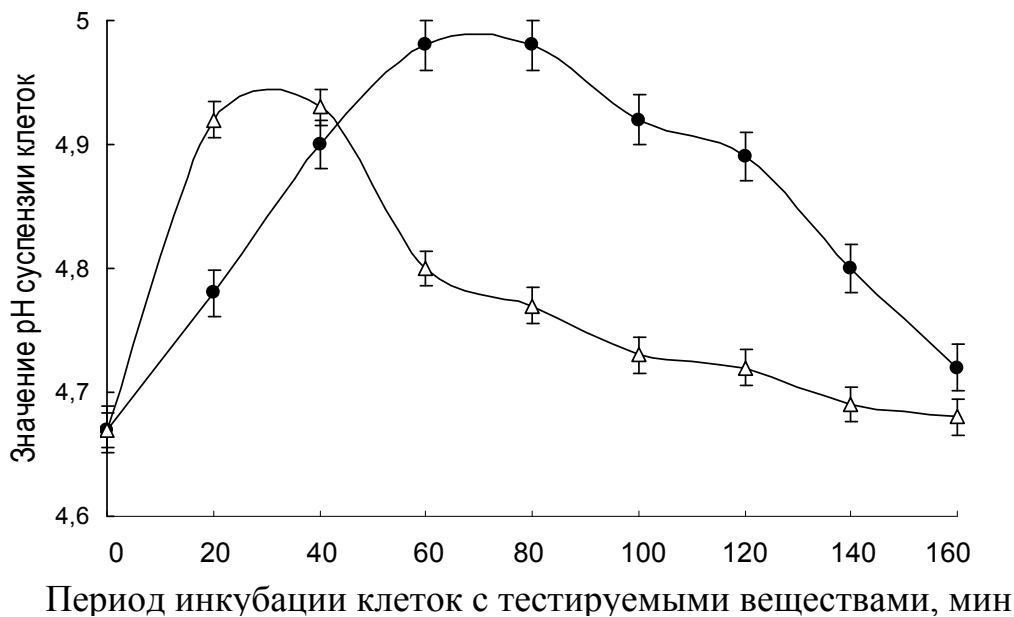


Рис. 7. Изменение pH суспензионной культуры клеток пшеницы сорта Энита в ответ на добавление VMФ. 1 – хитозан, 12,5 мкл/мл, 2 – VMФ, 12,5 мкл/мл

Изменение pH в суспензии начиналось через 7-10 минут. Максимальное значение Δ pH достигалось через 60 минут, а возврат к исходному уровню pH инкубационной среды наступал примерно через 2 ч 40 минут. Хотя реакция клеток пшеницы на хитозан была более быстрой, интенсивность их ответа на экзометаболиты FS-94 превосходила ($p=0,05$) реакцию на этот типичный элиситор. Аналогичная элиситорная активность VMФ была обнаружена в опытах с культурами клеток пшеницы сорта Мироновская 808 и риса линии OS.

4.2. Активация салицилат-зависимой сигнальной системы растений пшеницы

Известно, что салициловая кислота (СК) является одной из основных сигнальных молекул системной приобретенной устойчивости (SAR). Развитие этого типа устойчивости в растительных тканях, удаленных от места первичного проникновения патогена или обработки элиситорами, сопряжено с накоплением в них свободной СК.

Результаты количественного анализа СК в листьях второго яруса после нанесения VMФ на листья первого яруса растений пшеницы показали, что ее содержание возрастает уже через 24 часа. Через 48 часов после обработки нижних листьев пшеницы этой фракцией содержание СК в верхних листьях увеличилось почти в 6 раз по сравнению с необработанным контролем (рис. 8).

Обнаружение элиситорной активности у экзометаболитов FS-94 подтверждает предположение, основанное на результатах опытов с предобработкой тканей моркови и листьев пшеницы о том, что защитный эффект может состоять в индуцировании устойчивости растений.

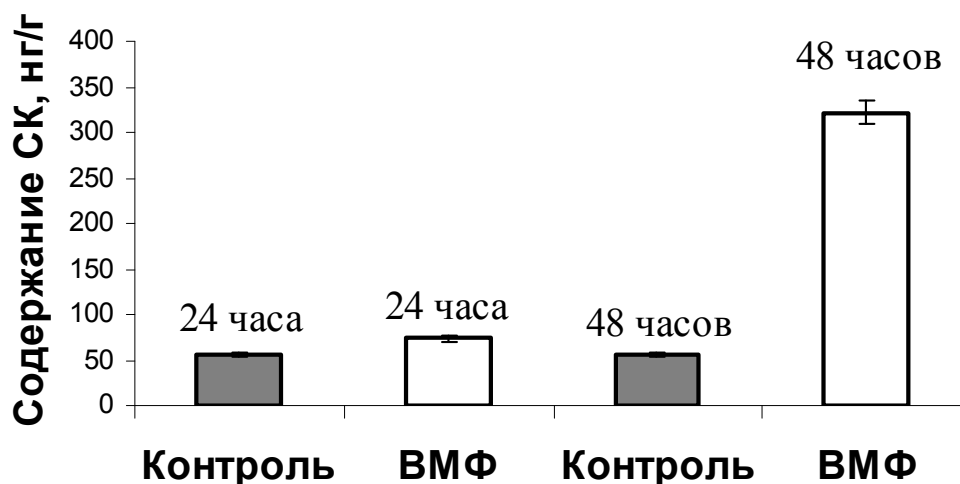


Рис. 8. Содержание свободной салициловой кислоты (СК) в листьях пшеницы после их обработки водой (контроль), через сутки и через двое суток после их обработки ВМФ (30 мкл/лист)

Под влиянием метаболитов развивается как локальная (в тканях изолированных листьев пшеницы, черешках и корневых дисках моркови), так и системная (у вегетирующих растений пшеницы) устойчивость к фитопатогенам. Механизмами индуцированной устойчивости, возникающей в растениях после их контакта с ВМФ, могут быть активация протонной и салицилат-зависимой сигнальных систем растения. Триггером процессов, приводящих к устойчивости, вызванной экстрацеллюлярными элиситорами изолята FS-94, по-видимому, является их контакт с плазмолеммой растительной клетки.

5. Биохимическая характеристика фракции экзометаболитов, ответственной за их защитный эффект

Было установлено, что способность ФКЖ и его ВМФ ингибировать прорастание спор возбудителя септориоза зависит от температуры и pH инкубационной среды. В кислой среде при 20-22 °С ФКЖ полностью подавлял прорастание спор *S. nodorum*, но не проявлял ингибирующей активности, если его pH был доведен до 8,0. Инактивирование ФКЖ щелочным буфером было обратимым, способность фильтрата ингибировать прорастание спор восстанавливалась после сдвига pH инкубационной среды в кислую зону. Кратковременное нагревание ФКЖ или ВМФ при 100°C приводило к необратимой потере способности подавлять прорастание спор. Кроме того, ФКЖ утрачивал способность ингибировать прорастание спор патогена после обработки протеиназой К в течение 4 часов (рис. 9).

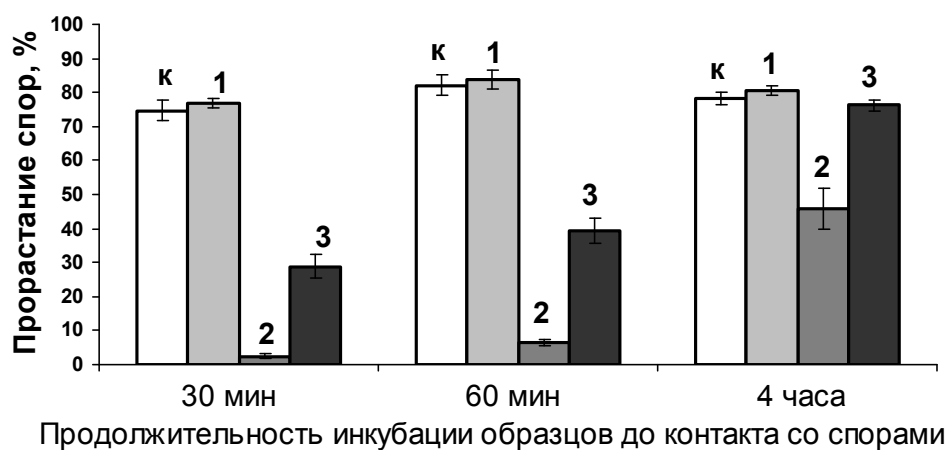


Рис. 9. Влияние ферментативного протеолиза на способность ФКЖ изолята FS-94 ингибировать прорастание спор *S. nodorum*. Образцы: к - H₂O; 1 – реакционная смесь (без ФКЖ); 2 - ФКЖ (без добавления протеиназы К); 3 - ФКЖ после инкубации с протеиназой К

Эти результаты свидетельствуют о том, что, по крайней мере, некоторые из внеклеточных метаболитов изолята FS-94, подавляющие прорастание спор *S. nodorum*, имеют белковую природу. Исследование состава ВМФ с помощью гель-хроматографии, ТСХ и масс-спектрометрии подтвердило эти результаты. Оказалось, что активность ВМФ против *S. nodorum* преимущественно ассоциирована с одной из поглощающих при 214 нм фракций, а именно с фракцией 5, которая элюировалась с колонки Sepharcyl S200HR в зоне выхода белков-стандартов в диапазоне молекулярных масс 10-25 кДа и почти полностью подавляла прорастание спор патогена (рис. 10).

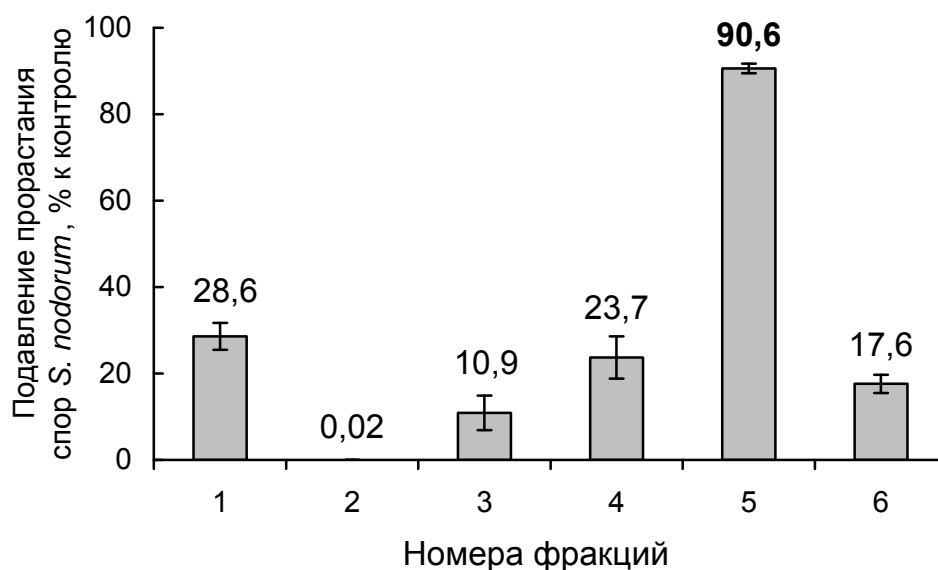
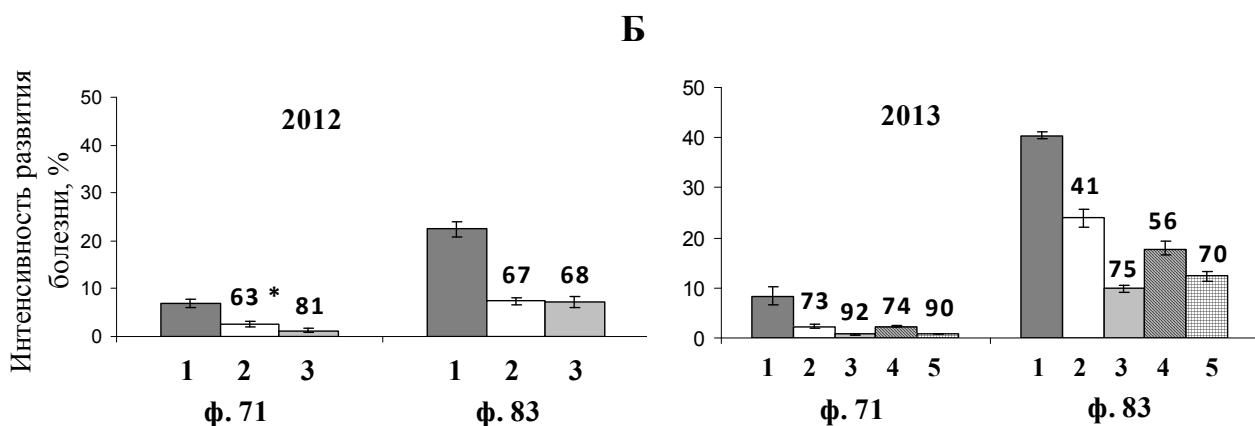
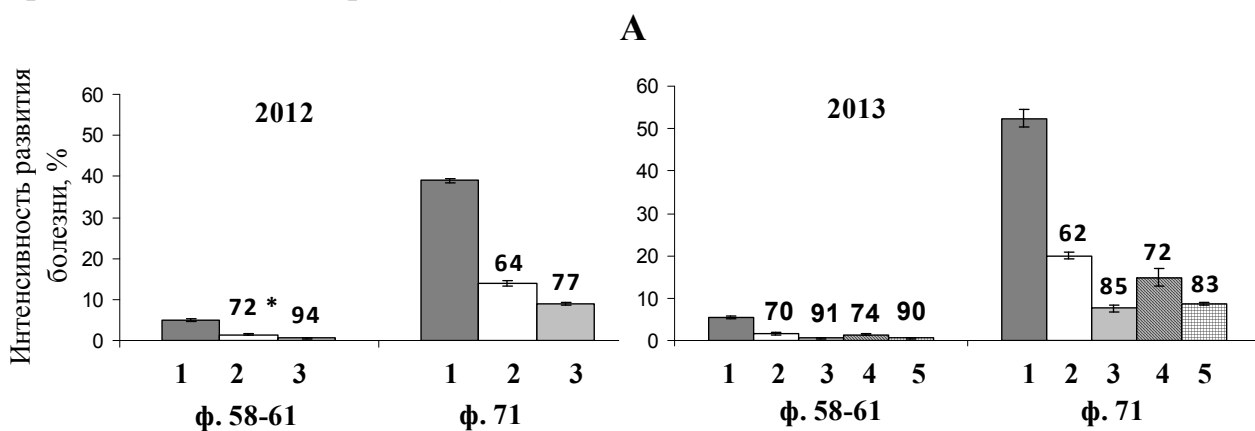


Рис. 10. Сравнительная антисепториозная активность белков, секретируемых изолятом FS-94 гриба *F. sambucinum* в культуральную жидкость

В гидролизатах ВМФ и фракции 5 с помощью ТСХ и специфического окрашивания нингидрином были выявлены аминокислоты, а анализ фракции 5 методом МАЛДИ масс-спектрометрии показал наличие в ее составе молекулярных масс в пептидном диапазоне.

6. Оценка биологической эффективности ФКЖ изолята FS-94 в полевых условиях

Чтобы проверить, реализуется ли в полевых условиях обнаруженный в лабораторных экспериментах защитный эффект ФКЖ, и оценить возможность использования фильтрата для снижения дозы одного из применяемых на пшенице фунгицидов, были проведены мелкоделяночные полевые опыты в течение двух вегетационных сезонов. Их результаты показали, что опрыскивание растений ФКЖ (200 мл на делянку) снижало развитие септориоза на листьях, стебле и колосе растений, искусственно зараженных *S. nodorum* (рис. 11, А-В). Так, и в 2012, и в 2013 гг. в начале цветения подавление септориоза на листьях растений, обработанных ФКЖ на стадии кущения-выхода в трубку, было на уровне 70%. В фазу начала молочной спелости биологическая эффективность (БЭ) обработок фильтратом для листьев составляла более 60% (рис. 11, А). Развитие септориоза на стеблях обработанных ФКЖ растений также было ниже, чем в контроле в течение всего периода наблюдений (рис. 11, Б).



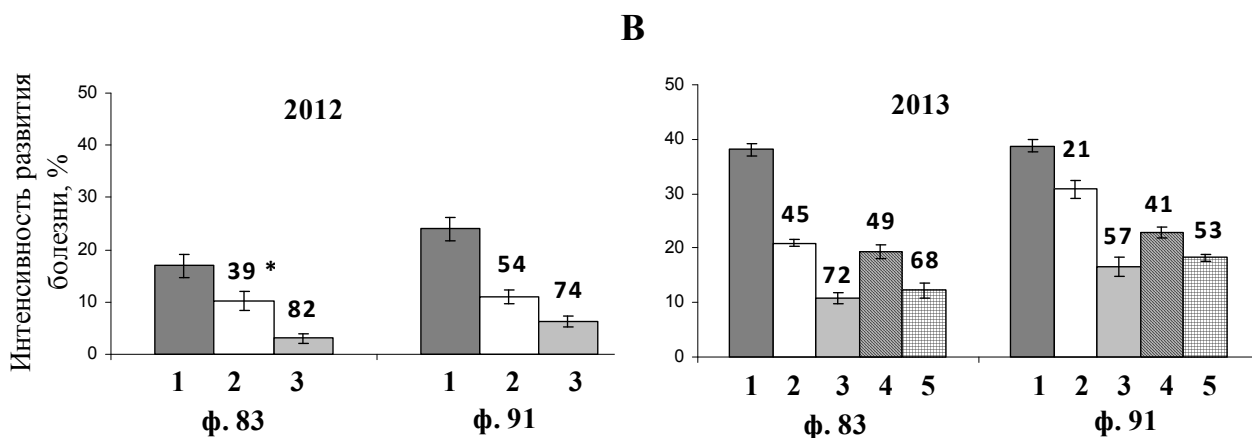


Рис. 11. Развитие септориоза на листьях (А), стеблях (Б) и колосе (В) пшеницы в вегетационных сезонах 2012-2013 гг. 1 – Контроль, искусственный инфекционный фон; варианты обработки: 2 – ФКЖ; 3 – Фоликур, норма; 4 – Фоликур, 1/5 нормы; 5 – Фоликур, 1/5 нормы + ФКЖ.

* Здесь и над остальными колонками - биологическая эффективность, %

Оказалось, что применение ФКЖ в начале вегетации в последствии защищало от септориоза и колос (рис. 11, В), причем в 2012 г, при более низком уровне поражения незащищенных растений, БЭ фильтрата была выше. Фитоэкспертиза собранного зерна показала, что распространенность септориоза в варианте с обработкой ФКЖ была почти в 2 раза ниже, чем в контроле.

Применение ФКЖ совместно с Фоликуром позволяло существенно снизить дозу последнего без потери защитного эффекта. Так, БЭ от обработок смесью ФКЖ и фунгицида в дозе, которая была в пять раз ниже рекомендованной для обработки пшеницы, на листьях, стеблях и колосе в течение всего вегетационного сезона 2013 г. была на уровне или несколько выше БЭ одного лишь Фоликура в рекомендованной дозе (рис 11, А- В).

ВЫВОДЫ

1. Показана способность изолята FS-94 гриба *Fusarium sambucinum* продуцировать внеклеточные метаболиты, обладающие антисепториозной активностью, подобраны питательные среды и определены условия культивирования, способствующие биосинтезу целевых метаболитов.
2. Обнаружено, что защитный эффект экзометаболитов FS-94 в отношении возбудителей септориоза пшеницы (*S. nodorum*) и альтернариоза моркови (*A. radicina*) основан как на их способности подавлять прорастание спор этих фитопатогенов, так и на индуцировании к ним устойчивости растений.

3. Показано, что внеклеточные метаболиты изолята FS-94 являются элиситорами системной приобретенной устойчивости и индуцируют характерные для этого типа устойчивости неспецифические защитные механизмы растений, в частности изменение обмена ионов K^+ и H^+ на плазмалемме растительных клеток, а также активацию салицилат-зависимой сигнальной системы пшеницы.
4. Установлено, что антисепториозная активность метаболитов, которые изолят FS-94 при определенных условиях секретирует в культуральную жидкость, в значительной мере обусловлена белками.
5. Обнаружено, что экзометаболиты FS-94 обладают свойствами сенсibilизаторов, усиливающих чувствительность *S. nodorum* к промышленным фунгицидам азолового ряда.
6. Продемонстрировано, что внеклеточные метаболиты FS-94 способны эффективно защищать растения пшеницы от одного из возбудителей септориоза в полевых условиях, и показана перспективность их совместного применения с некоторыми химическими фунгицидами с целью снижения доз последних.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сёмина, Ю. В. Антисепториозная активность фильтратов культуральной жидкости гриба *Fusarium sambucinum* и ее зависимость от состава питательных сред / Ю. В. Сёмина, Л. А. Щербакова, Г. А. Девяткина // Микология и фитопатология – 2011. – Т. 45, № 6. – С. 563-570.
2. Сёмина, Ю. В. Изучение возможности использования фильтрата культуральной жидкости непатогенного изолята FS-94 гриба *Fusarium sambucinum* для защиты растений моркови от *Alternaria radicina* / Ю. В. Сёмина, Р. Крэмер, Л. А. Щербакова, Э. Клокке, Т. Нотнагель // Вестник защиты растений. – 2012. – № 2. – С. 34-41.
3. Сёмина, Ю. В. Исследование культуральной жидкости изолята FS-94, обладающей защитной активностью против *Stagonospora nodorum* / Ю. В. Сёмина, Л. А. Щербакова, Г. А. Девяткина // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2012. – № 3. – С. 55-57.
4. Dzhavakhiya, V. Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides / V. Dzhavakhiya, L. Shcherbakova, Yu. Semina, N. Zhemchuzhina, B. C. Campbell // Frontiers in Microbiology. – 2012. – Vol. 3, Art. 87 – P. 1-9.

5. Shcherbakova, L. Elicitors from biocontrol *Fusarium sambucinum* and *Pseudomonas fluorescens* protect wheat from multiple fungal pathogens / L. Shcherbakova, **Yu. Semina**, D. Shumilina, D. Fravel, L. Dorofeeva // Induced resistance in plants against insects and diseases IOBC-WPRS Bulletin. – 2012. – Vol. 83. – P. 249-253.
6. Shcherbakova, L. Potential for integrated control of the wheat pathogen, *Stagonospora nodorum*, by Folicur and extracellular compounds produced by isolate FS-94 of *Fusarium sambucinum* / L. Shcherbakova, **Y. Semina**, T. Nazarova, L. Dorofeeva, V. Dzhavakhiya, B. Campbell // IOBC-WPRS Bulletin. – 2013. – Vol. 89. – P. 455-458.
7. **Сёмина, Ю. В.** К вопросу о перспективах использования культуральной жидкости изолята FS-94 гриба *Fusarium sambucinum* для защиты растений пшеницы от *Stagonospora nodorum* / Ю. В. Сёмина, Л. А. Щербакова, Г. А. Девяткина // Материалы международной научно-практической конференции «Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика». – Большие Вяземы, 2012. – С. 204-209.
8. **Сёмина, Ю. В.** Способность экстрацеллюлярных метаболитов изолята FS-94 (*Fusarium sambucinum*) вызывать локальную и системную устойчивость к возбудителям септориоза пшеницы и альтернариоза моркови / Ю. В. Сёмина, Л. А. Щербакова, Р. Крэмер, Э. Клокке // Материалы третьей Всероссийской и международной конференции «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». – СПб. – 2012. – С. 182-184.
9. Shcherbakova, L. A. Defense responses against tomato wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) induced with partially identified proteins from two biocontrol *Fusaria* / L. A. Shcherbakova, T. I. Odintsova, D. R. Fravel, **Yu.V. Semina**, D. P. Roberts // IBCO/WSP meeting “PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects”. Abstract book. – Neuchatel, Switzerland, 2011. – P. 125.
10. Shcherbakova, L. A. Enhancing the sensitivity of *Stagonospora nodorum* to certain azole and strobilurin fungicides by co-application of natural compounds / L. A. Shcherbakova, L. R. Arslanova, **Y. V. Semina**, B. Campbell, V. G. Dzhavakhiya // Abstracts of 17th Reinhardtsbrunn Symposium on Morden Fungicides and Antifungal Compounds. Abstract book. – Fridrichroda, Germany, 2013. – P. 166.