

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОТОКСИНОВ ГРИБА *Septoria nodorum* B.

(Казахский государственный агротехнический университет им. С. Сейфуллина)

В данной работе выделены и идентифицированы фитотоксины и их комплекс использовали для проведения селекции *in vitro*. Путем относительного прироста ткани определена максимальная концентрация фитотоксина гриба *Septoria nodorum*, при котором клетки не дают дальнейший прирост, а также отмечена минимальная концентрация стресс-фактора, незначительно влияющая на прирост клетки.

Необходимым условием применения культуральных фильтратов в качестве селективного фактора является наличие и доказательство присутствия в них фитотоксинов и его активность как селективного агента.

Селекция *in vitro* является альтернативным методом получения исходных форм устойчивых к фитопатогенам. Фитотоксины являются важными селективными агентами при клеточной селекции пшеницы, так как при внедрении гриба в клетки хозяина начинается процесс разрушения плазмалеммы (изменение проницаемости мембран, нарушение активного транспорта и поверхностного потенциала).

О токсинах фитопатогенных грибов об их влиянии на растения и о патогенезе грибов довольно детально обсуждается в публикациях Бочаровой /1/. В Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности (НИИПББ) А.А.Ахметов, Г.И.Кобыльски, Е.В. Бочарова проводили экспериментальные работы по септориальной инфекции /2,3/.

В настоящее время септориальная инфекция является острой проблемой мирового масштаба и об этом свидетельствуют материалы Международного симпозиума: «*Septoria Stagonospora* - болезни злаков». На данном форуме ученых и практиков детально обсуждаются традиционные и нетрадиционные подходы борьбы с болезнью, механизмы ответной реакции, распространение септориальных болезней и о наносимом ущербе продуктивности хлебных культур на мировом уровне и многие другие вопросы (Тунис, 2003) /4/.

В последнее время должное внимание уделяется совместному культивированию, т. е. патогенные грибы культивируются совместно с каллусной тканью пшеницы. Этот метод предлагается как тест для оценки устойчивости клеточных колоний к грибным патогенам /5/.

При использовании культуральных фильтратов в качестве селективного фактора необходимо показывать действующее начало, т.е. наличие в них фитотоксинов. В данной работе проведены экспериментальные исследования по выделению и идентификации токсинов фитопатогенного гриба *Septoria nodorum* B. и идентичности токсинов в культуральном фильтрате и в мицелиальной массе гриба.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований использовали культуральный фильтрат фитопатогенного гриба *Septoria nodorum* Berk, выделенный из гербарного материала яровой мягкой пшеницы, собранного в НИЦ ЗХ им А.И. Бараева.



Рисунок - Поражение яровой мягкой пшеницы септориальной инфекцией
А) листьев; Б) колосьев

В данных экспериментальных исследованиях также использовали мицелий гриба из изолятов коллекции НИИПББ (пос. Гвардейский), любезно предоставленным заведующим лабораторией Ш.С. Рсалиевым.

Выделение и наработку фитотоксинов проводили в Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности (НИИПББ, пос. Гвардейский). В работе использовали отработанные методы по выделению токсинов Г.И.Кобыльски и др./3/ и методы количественного определения фитотоксинов Бочарова /1/.

Согласно поставленным целям исследований из накопленной биомассы фитопатогенного гриба *Septoria nodorum* выделен этилацетатный экстракт. Из этилацетатного экстракта выделяли маслянистый осадок и снова

собирали этилацетатом. После упаривания получали сухой остаток, который перерастворили этилацетатом с пересчетом на сухую массу.

Для выделения биологически активных веществ экстракты разделяли методом одномерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Силуфол 254 УФ». При хроматографировании использовали систему растворителей хлороформ - этилацетат (5:1). После разделения хроматограммы подсушивали на воздухе, просматривали под УФ-светом (254 нм), отмечая флуоресценцию пятен, а также их окраску в видимом свете. Хроматограммы фотографировали с помощью цифровой документирующей системы (рисунок).

Для наработки фитотоксичных метаболитов гриба *Septoria nodorum* экстракт разделяли методом препаративной ТСХ на пластинах с толщиной слоя 0,25 мм. Участки хроматограммы, на которых находились фитотоксины, выскабливали и элюировали вещества с помощью этилацетата.

При хроматографировании, используя реактив Фолина-Чикальто, было выявлено присутствие четырех фитотоксинов - ФТ-1, ФТ-2, ФТ-3, ФТ-5, которые отнесли к классу фенольных соединений. Все данные подтвердили ранее выявленные Бочаровой Е.В. /1/ токсины фитопатогенного гриба *Septoria nodorum* и позволили отнести их к группе кумаринов и изокумаринов.

Таким образом, положительным результатом данной серии экспериментов является доказательство идентичности фитотоксинов, в выделенных нами культуральных фильтратах, и в экстрактах, выделенных из мицелия гриба *Septoria nodorum*. Далее фитотоксины введены в питательную среду и в культуре эксплантов путем относительного прироста ткани определена максимальная концентрация фитотоксина гриба *Septoria nodorum*, при котором клетки не дают дальнейший прирост, а также отмечена минимальная концентрация стресс-фактора, незначительно влияющая на прирост клетки. Следующую серию экспериментов по отбору устойчивых клеток на фитотоксине необходимо провести при глубинном культивировании каллусных клеток, так как при поверхностном культивировании не все клетки находятся в одинаковых условиях.

Литература

1. Е.В. Бочарова. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Гвардейский, 1991.

2. А.А.Ахметов, Г.И.Кобыльский Гидролитические ферменты гриба *Septoria nodorum* Вегк. // Активность полигалактоураназы, эндо- и экзо Р -1, 4 глюконаз, - (3 глюкозидазы и ксиланазы в культуре гриба // Вопросы защиты сельскохозяйственных растений и животных от болезней-ч. 1. -Алма-Ата.-1999.С.68-74.

3. Г.И. Кобыльский Патогенность дейтормицетов (на примере возбудителя септориоза пшеницы-гриба *Septoria nodorum* (Вегк.) // Автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук. Москва, 2005

4. 6th International Simposium on *Septoria and Stagonospora Disease of Cereals/ December 8-12, 2003 Tunis, Tunisia.*

5. Волощук СИ. А.Д. Волощук и др. Морфолого-биохимические характеристики каллусов пшеницы при культивировании с патогенными грибами // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. Москва, 2005, с.38

Тұжырым

Septoria nodorum санһырауқұлағының уытын бәліп шығарып оларды идентификациялау және in vitro жағдайында қолдану, жасуша денгейінде культуралдық фильтрат және оның уытына сұрыптау жүргізіп *Septoria nodorum* ауруына тәзімді жасушаларды артыру.

Summary

For cell selection carrying out complex fungus phytotoxin *Septoria nodorum* was used (Ph-1, Ph-2, Ph-3, Ph-5) which was put in explant culture with the concentration 0.01-0.05%. Gross intensity while comparing two investigated genotypes isn't differed that is response reaction to the stress is approximately the same. Given experimental investigations tasks include: optimization of fungus cultivation conditions, biomass making for cultural filtrate preparation (KF), toxin identification in KF and in mycelium extracts.

УДК 575.224.23:599.323.4

Бегимбетова Д.А., Колумбаева С.Ж., Калимагамбетов А.М.,

Шалахметова Т.М., Ерубасева Г.К.

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФИПРОНИЛА НА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Изучено мутагенное действие фипронила на животных разных возрастных групп при остром и подостром воздействии. Установлен генотоксический эффект фипронила, степень которого зависела от продолжительности воздействия и возраста животного.

В результате химизации сельского хозяйства в окружающую среду поступает огромное количество разнообразных химических соединений /1/. Особую остроту приобретает проблема загрязнения окружающей среды пестицидами, широкое применение которых обусловлено экономической необходимостью. В настоящее время биологические методы борьбы с вредителями сельского хозяйства по своей эффективности уступают химическим средствам защиты, поэтому применение пестицидов представляется неизбежным и необходимым /2, 3/. Несоблюдение соответствующих рекомендаций и инструкций по использованию ядохимикатов приводит к их накоплению в компонентах природной среды, к отравлениям и несчастным случаям на производстве /4, 5/. С увеличением количества химических соединений, вводимых человеком в окружающую среду, возрастает и вероятность ее загрязнения мутагенными факторами. Поэтому в последнее время большое внимание исследователей привлечено к проблеме насыщения биосферы различными факторами мутагенной природы, способными проникать в клетки живых организмов и вызывать нарушения их генетической структуры /2/. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что применяемые в сельском хозяйстве дозы ряда пестицидов действуют подобно мутагенам, вызывая цитотоксический и отрицательный генетический эффекты /6, 7/. Токсикологами установлено наличие пестицидов во многих продуктах питания, число отравлений которыми по данным ВОЗ составляет ежегодно 1% /7/. В Казахстане для борьбы с саранчовыми широко используют инсектициды нового поколения класса фенилпиразолов (Адонис, Регент), основным действующим веществом которых является фипронил /8, 9/. В доступной литературе встречаются противоречивые сведения о мутагенной активности фипронила, и практически отсутствуют сведения о его токсическом и генотоксическом действии на организмы разного возраста. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение мутагенного действия фипронила на экспериментальных животных разных возрастных групп при остром и подостром воздействии.

Материалы и методы

Объектами исследования явились клетки костного мозга белых беспородных крыс-самцов в возрасте 1, 6 и 12 месяцев. На мутагенную активность испытывали водный раствор фипронила в дозе 10 мг/кг, что соответствует 1/10 ЛД₅₀.

Всего в экспериментах было использовано 45 белых беспородных крыс-самцов в возрасте 1, 6, 12 месяцев, разделенных на 9 групп по 5 крыс в каждой: I-III - интактные животные трех возрастных групп; IV-VI – животные трех возрастных групп, получавших однократно (острое воздействие) перорально водный раствор фипронила; VII-IX – животные трех возрастных групп, получавших в течение 10 дней (подострое воздействие) перорально водный раствор фипронила. Дозировка была выбрана исходя из имеющихся сведений о ЛД₅₀ фипронила 100 мг/кг для перорального введения для крыс /8/.

Перед забоем определяли вес каждой крысы. Внутривенно крысам вводили 0,04% раствор колхицина из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Через 1,5-2 часа после ввода колхицина крыс забивали и готовили цитологические препараты по общепринятой методике /10/. Для окраски хромосомных препаратов использовали краситель азур-эозин по Романовскому-Гимзе. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Zeiss), подаренном фондом А. фон Гумбольдта биологическому факультету КазНУ им. аль-Фараби. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами /11/.

Результаты и их обсуждение

Результаты цитогенетического анализа клеток костного мозга крыс разных возрастных групп, подвергнутых острому воздействию фипронила, приведены в таблице 1. Представленные данные свидетельствуют о том, что фипронил в использованной дозе индуцировал хромосомные aberrации с частотой, превышающей спонтанный уровень мутирования. Однако достоверное увеличение частоты aberrантных клеток и числа структурных мутаций на 100 метафаз наблюдалось только у годовалых крыс. Так, если у животных контрольной группы в возрасте 1, 6 и 12-ти месяцев уровень aberrантных клеток и число хромосомных aberrаций на 100 метафаз составил соответственно 0.79 % и 0.79, 1.13 % и 1.23, 1.62 % и 1.71, то в результате

Таблица 1 – Частота и спектр структурных нарушений хромосом, индуцированных в клетках костного мозга крыс разного возраста при остром воздействии фипронила

Вариант опыта	Возраст, мес.	Всего изучено клеток	Частота aberrантных клеток (M ± m), %	Число хромосомных aberrаций на 100 метафаз			Частота полиплоидных клеток (M ± m), %
				всего aberrаций	хромосомного типа	хроматидного типа	
Контроль	1	1010	0.79 ± 0.12	0.79 ± 0.12	-	0.79 ± 0.12	0.19 ± 0.12
	6	990	1.13 ± 0.22	1.23 ± 0.16	0.21 ± 0.13	1.02 ± 0.18	0.32 ± 0.22
	12	1000	1.62 ± 0.31	1.71 ± 0.27	0.62 ± 0.25	1.09 ± 0.18	0.49 ± 0.21
Фипронил 10 мг/кг	1	930	1.18 ± 0.18	1.37 ± 0.25	0.32 ± 0.21	1.05 ± 0.11	0.33 ± 0.14
	6	980	1.75 ± 0.16	1.86 ± 0.24	0.32 ± 0.21	1.54 ± 0.30	1.45 ± 0.28*
	12	950	2.41 ± 0.32	3.25 ± 0.36*	0.80 ± 0.13	2.41 ± 0.24**	2.00 ± 0.17***

Примечание: * - P<0.05, ** - P<0.01; *** - P<0.001 в сравнении с контрольными значениями

воздействия фипронила эти показатели были на уровне 1.18 % и 1.37, 1.75 % и 1.86, 2.41 % и 3.25, соответственно.

У животных как контрольной, так и опытной групп спектр наблюдаемых хромосомных aberrаций был представлен нарушениями как хромосомного, так и хроматидного типа. Нарушений хромосомного типа не отмечено у животных в возрасте 1 месяца. Этот тип структурных перестроек был представлен парными концевыми фрагментами, а хроматидного типа - одиночными концевыми делециями и точечными фрагментами (рисунок 1, 2).

Помимо хромосомных aberrаций у животных 6-ти и 12-ти месячного возраста наблюдалось достоверное увеличение частоты геномных мутаций (рисунок 3). Так, в контрольной группе животных 1, 6 и 12 месячного возраста уровень полиплоидных клеток соответственно составил 0.19 %, 0.32 % и 0.49 %. При интоксикации крыс аналогичного возраста уровень полиплоидных клеток соответствовал 0.33 %, 1.45 % (P<0.05) и 2,00 % (P<0.001).

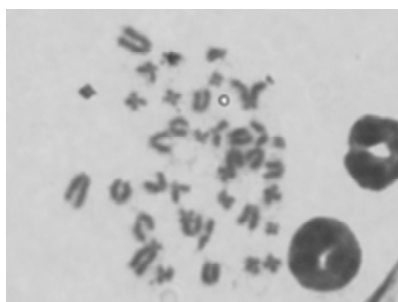


Рисунок 1 – Одиночный концевой фрагмент

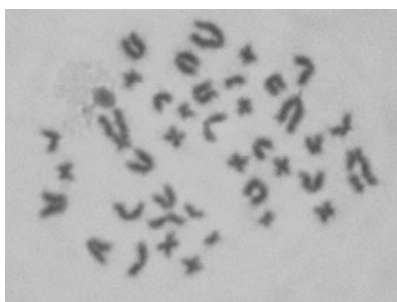


Рисунок 2 – Хроматидная делеция

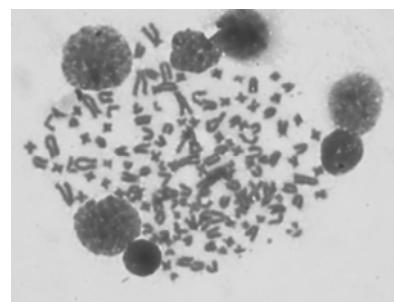


Рисунок 3 – Полиплоидный набор (8n = 168)

Таким образом, в результате проведенного цитогенетического исследования было установлено, что фипронил при однократном воздействии на крыс проявил мутагенную активность, достоверно увеличив число хромосомных aberrаций на 100 метафаз и частоту полиплоидных клеток. Анализ спектра хромосомных нарушений выявил достоверное увеличение перестроек хроматидного типа.

Сравнительный анализ частоты aberrантных клеток и числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз между животными разных возрастных групп показал достоверное увеличение этих показателей у животных 12-ти месячного возраста по сравнению с месячными крысами, интоксигированными фипронилом. Так, если у животных в возрасте 1 месяца эти показатели соответственно составили 1.18 % и 1.37, то у годовалых крыс – 2.41 % (P<0.05) и 3.25 (P<0.05). Также достоверно возросло и число нарушений хроматидного типа с 1.05 у одномесячных до 2.41 у годовалых животных (P<0.05). Однако аналогичная закономерность наблюдается и у животных контрольной группы, то есть с увеличением возраста наблюдается и увеличение частоты спонтанных нарушений хромосом. В то же время сравнительный анализ частоты полиплоидных клеток у животных контрольной группы не выявил достоверного увеличения их частоты с увеличением возраста животных. При этом, у интоксигированных животных отмечается достоверное увеличение частоты полиплоидии у 6-ти (P<0.01) и 12-ти месячных (P<0.001) крыс по сравнению с месячными особями.

Результаты цитогенетического анализа клеток костного мозга крыс разных возрастных групп, подвергнутых подострому воздействию фипронила, представлены в таблице 2.