

УДК 633.11.111:576

Д.С. Тагиманова,^{1*} О.Н. Хапилина,¹ Л.Ф. Созинова,² А.А. Какимжанова¹¹ - РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, Казахстан² - ООО «Центр молекулярных исследований» г. Москва, Россия

*e-mail: lbps@biocenter.kz

Изучение ферментативной активности фитопатогенных штаммов гриба *Drechslera tritici-repentis*

Изучение ферментативной активности фитопатогенных грибов актуально, поскольку может выявить определенные закономерности в индукции защитных свойств растений. Ферменты играют большую роль в жизни растений и грибов. Патогенные свойства возбудителей болезней растений во многом обусловлены их способностью вырабатывать гидролитические ферменты. Ферменты определяют способность возбудителей болезней проникать в ткани растения, разрушать клеточные структуры. Способность микроскопических грибов вырабатывать ферменты могут свидетельствовать об их патогенности. Нами была изучена ферментативная активность (целлюлозолитическая и амилолитическая) штаммов гриба *D. tritici-repentis* Dtr 3/04 и Dtr 6/04, поскольку именно ферментам принадлежит ключевая роль в развитии болезни растений, они являются необходимыми элементами патогенеза, являются катализаторами синтеза ряда биологически активных веществ патогенов.

Ключевые слова: фермент, штамм, гриб, патоген.

Д.С. Тагиманова, О.Н. Хапилина, Л.Ф. Созинова, А.А. Какимжанова

Drechslera tritici-repentis саңырауқұлағы штамдарының ферментативтік белсенділігін зерттеу

Фитопатогенді саңырауқұлақтардың ферментативтік белсенділігін зерттеу өзекті мәселелердің бірі, себебі ол өсімдіктердің қорғау механизмінде белгілі бір заңдылықтарды анықтауға мүмкіндік береді. Біз *D. tritici-repentis* саңырауқұлағының Dtr 3/04 және Dtr 6/04 штамдарының ферментативтік белсенділігін (целлюлозды және амилолитикалық) зерттедік. Ферменттер өсімдіктер ауруының дамуы кезінде маңызды роль атқарады, патогенездің қажетті элементтері, патогеннің бірқатар биологиялық белсенді заттары синтезінің катализаторы болып табылады.

Түйін сөздер: фермент, штамм, саңырауқұлақ, патоген.

D.S. Tagimanova, O.N. Khapilina, L.F. Sozinova, A.A. Kakimzhanova

Study of the enzymatic activity of pathogenic strains of the fungus *Drechslera tritici-repentis*

Study of the enzymatic activity of pathogenic fungi important because it can identify certain patterns in the induction of protective properties of plants. Enzymes play an important role in the life of plants and fungi. Pathogenic properties of plant pathogens are largely due to their ability to produce hydrolytic enzymes. Enzymes, the ability of pathogens to penetrate the plant tissue, destroy cellular structures. Ability of microscopic fungi produce enzymes may indicate their pathogenicity. We studied the enzymatic activity (cellulolytic and amylolytic) strains of the fungus *D. tritici-repentis* Dtr 3/04 and Dtr 6/04 because it is the enzymes play a key role in the development of plant diseases, they are essential elements of pathogenesis, are catalysts for the synthesis of a number of biologically active substances pathogens.

Keywords: enzyme, strain, fungus, pathogen.

Для развития успешного инфекционного процесса патоген должен проникнуть в растение, нейтрализовать защитные механизмы и получить из растения питательные вещества. Основную часть этих действий патогенные организмы осуществляют с помощью секреции различных химических веществ, которые воздействуют на определенные вещества или метаболические процессы хозяина. К главным группам веществ, участвующих в жизнедеятельности патогенов и принимающих

участие в развитии симптомов болезни, относятся ферменты, регуляторы роста, полисахариды, токсины, супрессоры. Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, обладающие высокой специфичностью, ускоряющие течение определенных биохимических реакций и играющие важную роль в процессе обмена веществ. Ферментам принадлежит ключевая роль в развитии болезни растений, они обеспечивают проникновение патогена в

клетки растений, являясь катализаторами синтеза ряда биологически активных веществ патогенов [1, 2].

Материалы и методы

Определение амилолитической активности гриба D. tritici-repentis. Определение амилолитической активности проводится на среде Чапека с добавлением крахмала, количество которого было эквивалентно содержанию сахарозы. На 7 сутки определяли амилолитическую активность по морфологии колоний. Учитывали диаметр колоний. Оценивается активность по следующим критериям: 4 «+» - высокая амилолитическая активность; 3 «+» - средняя; 2 и 1 «+» - слабая амилолитическая активность [3, 4]

Определение целлюлозолитической активности гриба D. tritici-repentis.

Для определения целлюлозолитической активности грибов *Drechslera tritici-repentis* выращивали их на минеральной среде Чапека с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода. Учет роста грибов и определение целлюлозолитических свойств проводится на 10 сутки. Рост грибов оценивается по пятибалльной шкале: 1-2 балла (+, ++) – означают слабый рост мицелия, отсутствие разрушенных участков целлюлозы; 3-4 балла (+++, +++) – наличие обильного и хорошо развитого мицелия, обволакивающего субстрат, обильное спорообразование; 5 баллов (+++++) – визуально отмечается деградация субстрата [5, 6].

Определение протеолитической активности гриба D. tritici-repentis.

Протеолитическую активность штамма *Dtr 3/04* гриба *D. tritici-repentis* определяли по количеству разжиженной желатины на 7 сутки культивирования. Если желатина разжижается, указывают интенсивность разжижения [4].

Результаты и их обсуждение

Для определения активности ферментов амилаз штаммы гриба культивировали на среде Чапека, содержащей в качестве источника углерода крахмал, в количестве, эквивалентном содержанию сахарозы в среде. По истечении 7 суток оценивали активность амилаз по интенсивности окрашивания среды при добавлении йодида калия (индикатор на крахмал): наличие посинения среды свидетельствовало о слабой активности амилаз (1 балл), отсутствие синего окрашивания при

условии интенсивного роста – о высокой активности (4 балла).

Исследования показали, что активность штаммов гриба *D. tritici-repentis* находится в пределах 2-3 баллов (слабый рост на среде, незначительное окрашивание субстрата).

Во многих работах проводится определение ферментативной активности фитопатогенных грибов. Например, в экспериментах, проведенных на грибах *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria* показано, что эти грибы обладают сильно развитым ферментативным аппаратом. Проявление действия амилолитических ферментов, выражающееся в отсутствии реакции на крахмал, наблюдалось на всех исследуемых штаммах *Fusarium graminearum* и *Bipolaris sorociniana* [7].

Известно, что грибы являются активными продуцентами целлюлозолитических ферментов. Целлюлаза – сложный ферментативный комплекс, участвующий в разложении целлюлозы у микроорганизмов. Целлюлоза является основным структурным компонентом растительных клеток и одним из наиболее распространенных органических соединений. Целлюлоза – линейный полимер из глюкозных остатков, соединенных 1,4-β-связями, число которых достигает нескольких тысяч. О целлюлазной активности судят по скорости образования редуцирующих сахаров под действием фермента. Способность микроскопических грибов вырабатывать ферменты целлюлазы могут свидетельствовать об их патогенности. В качестве субстрата для целлюлазы можно использовать фильтровальную бумагу, карбоксиметилцеллюлазу, хлопок [8]. В своей работе в качестве субстрата для целлюлазы мы использовали фильтровальную бумагу.

На 10 сутки культивирования гриба отмечали рост мицелия над поверхностью питательной среды и определяли целлюлозолитическую активность. Штаммы *Dtr 3/04*, *Dtr 6/04* интенсивно росли на полосках фильтровальной бумаге (таблица 1). На воздушном мицелии штаммов отмечалось обильное конидиеобразование. Следовательно, изучаемые штаммы обладали высокой целлюлозолитической активностью.

Также была изучена протеолитическая активность штаммов гриба *D. tritici-repentis*. Протеолитические ферменты катализируют

расщепление белков на поли- и олигопептиды, активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатин, казеин или другие белки. В наших опытах по количеству разжиженной желатины судили об относительной активности

протеолитических ферментов штаммов гриба *D. tritici-repentis*. Количество разжиженной желатины на 7 сутки культивирования у штамма *Dtr 6/04* составило 6 мм (+-- слабый рост), у штамма *Dtr 3/04* – 10 мм (++- средний рост).

Таблица 1 - Целлюлозолитическая активность штаммов гриба *D. tritici-repentis*

Штамм	Зона роста гриба на фильтровальной бумаге		pH	Целлюлозолитическая активность
	Рост мицелия по всей длине фильтра, мм	Рост мицелия над поверхностью среды, мм		
<i>Dtr 3/04</i>	5	35	5,29	+++
	10	40		
	10	40		
<i>Dtr 6/04</i>	5	20	5,48	+++
	5	15		
	8	20		
Контроль			5,01	

В результате исследований можно сделать вывод о том, что штаммы гриба *D. tritici-repentis* обладают хорошо развитым ферментативным аппаратом. Это, несомненно, является положительным моментом при выборе штамма для клеточной селекции, так как позволяет моделировать *in vitro* условия

поражения грибом растительной ткани, индуцировать комплекс защитных реакций в клетках. При получении растений-регенерантов данные штаммы можно использовать в качестве биоконтроля устойчивости растений в условиях *in vivo*.

Литература

1. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии. - СПб.: Лань, 2006. - 256 с.
2. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии. – СПб.: Изд-во «Лань», 2006. - С. 81-83.
3. Рухляева А.П., Польшагина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. - 288 с.
4. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – Москва, 1985. – С. 207.
5. Звягинцева Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. - М.: МГУ, 1991. - 304 с., Практикум по биологической химии. – СПб.: Изд-во «Лань», 2006. С. 81-83.
6. Турганбаева А.К., Сейтбатталова А.И., Хапилина О.Н., Созинова Л.Ф., Михнева Н.С., Саданов А.К. Определение ферментативной активности фитопатогенных грибов // Матер. Межд. науч.-прак. конф - Кокчетав, 2005. - Т. 7. - С. 113-115.
7. Саданов А.К., Созинова Л.Ф. Клеточная селекция мягкой пшеницы на устойчивость к болезням. – Астана, 2006. – С. 266.
8. Мишустин Е.Н. Микробиология. – М.: Агропромиздат, 1987. – 365 с.