

Материалы международных научных конференций

*Современные наукоемкие технологии
Израиль, 10-17 апреля 2010 г.*

Биологические науки

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
РАЗВИТИЯ УСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕНАМ**

Ибрагимов Р.И., Яруллина Л.Г.*,
Шпирная И.А., Умаров И.А., Цветков В.О.,
Максимов И.В.*

ГОУ ВПО «Башкирский государственный
университет»

*Учреждение Российской академии наук
Институт биохимии и генетики Уфимского
научного центра РАН
Уфа, Россия

Растения противостоят инфекциям и другим стрессовым воздействиям окружающей среды посредством развития комплекса молекулярно-биохимических реакций (Яруллина, Ибрагимов, 2006). Восприятие, передача информации о действии факторов окружающей среды на растения и, соответственно, индукция ответных реакций, осуществляется с участием сигнальных систем (Тарчевский, 2002). Наиболее ранней ответной реакцией растительного организма на внедрение патогена является локальная генерация активных форм кислорода (АФК) – окислительный взрыв, запускающий цепь последующих защитных реакций (Аверьянов и др., 2007). Большую роль в генерации и регуляции содержания АФК в растительных тканях играют окислительно-восстановительные ферменты, в первую очередь, оксиредуктазы (Huckelhoven, Kogel, 2003). Показано, что образование АФК в ходе окислительного взрыва происходит при участии ферментов, локализованных на поверхности клеток: НАДФН-оксидаз, ксантинооксидаз, супероксиддисмутаза, оксалактоксидаз, пероксидаз (Gil-ad et al., 2000).

До недавнего времени считалось, что основным источником АФК при инфицировании являются только растительная ткань, а возможный вклад микроорганизмов в этот процесс не учитывался. Однако полученные в последние годы экспериментальные сведения ставят данное утверждение под сомнение (Гесслер и др, 2007). В частности, исследования, Аверьянова с соавторами (2006) показали, что скорость продукции АФК на листьях здоровых растений риса очень низка, но она значительно возрастает при инфицировании их возбудителем пирикулярриоза *Magnaporthe*

grisea. Оказалось, что возбудитель пирикулярриоза риса способен к продукции АФК и в культуральной среде, вне растительного организма. Эти факты позволяют предположить, что патогенные грибы принимают активное участие в процессах продукции АФК. По-видимому, грибные антиоксиданты или супрессоры генерации АФК играют существенную роль в последующем формировании совместимых отношений в системе патоген - хозяин. Особая роль в этих процессах принадлежит ферментам патогенов: супероксиддисмутаза, каталаза, активация которых приводит к снижению токсичных для микроорганизмов концентрации АФК. Вероятно, локальная генерация АФК выполняет защитную функцию только на ранних этапах взаимодействия растения и патогена. Как известно, продолжительная и избыточная продукция АФК, характерная для восприимчивых растений, способствует развитию и распространению патогенов (Shirasu, Schulze-Lefert, 2000).

Для снижения уровня АФК в растительных тканях включаются механизмы детоксикации, связанные с активацией ферментов антиоксидантной системы. Возможно, что развитие или подавление следующих реакций в растительном организме, в первую очередь, зависит от концентрации H_2O_2 в зоне контакта двух противоборствующих организмов.

Цель исследований наших состояла в выявлении ряда биохимических параметров, определяющих устойчивость растений и агрессивность патогенов при их взаимодействии. Объектами исследования были растения пшеницы (*Triticum aestivum L.*) и картофеля (*Solanum tuberosum L.*), инфицированные грибными патогенами и насекомыми-вредителями.

Эффективным подходом к познанию механизмов развития устойчивости растений является сравнительное изучение реакций растений одного сорта на инфицирование штаммами патогена различной степени агрессивности. В соответствии с этим подходом, в экспериментах были использованы различные по агрессивности штаммы возбудителя септориоза злаковых - патогенного гриба *Septoria nodorum*. В предварительных опытах было показано, что штамм 9МН проявлял высокую, а штамм 4ВД - низкую агрессивность к исследуемым сортам яровой

мягкой пшеницы (Жница, Омская 9, Саратовская 29, Башкирская 24). Штамм 9МН характеризовался более быстрым развитием в растительных тканях, более коротким латентным периодом культивирования и обильным спороношением по сравнению со штаммом 4 ВД. Оказалось, что инфицирование растений пшеницы восприимчивого сорта Жница высоковирулентным штаммом приводило к повышению интенсивности генерации АФК лишь в течение первых суток после инокуляции. Тогда как в инфицированных слабовирулентным штаммом тканях этого сорта, интенсивная продукция перекиси водорода происходила в течение более продолжительного периода времени (табл. 1). Вероятно, низкая концентрация H_2O_2 не способ-

на индуцировать развитие защитного ответа, и одновременно, является стимулирующей для роста патогена. Для снижения уровня АФК растения и грибы используют различные механизмы детоксикации, один из которых связан с активацией ферментов антиоксидантной системы (Белозерская, Гесслер, 2006). Показано, что активность каталазы в мицелии высоковирулентного штамма возбудителя мучнистой росы значительно выше, чем у низковирулентного (Талиева, Мишина, 1996). Ранее было показано, что высокий уровень генерации H_2O_2 , наблюдаемый в устойчивых растениях, способствует торможению активного роста и развития патогена, а низкий - инициирует его рост (Трошина, 2007).

Таблица 1.

Содержание H_2O_2 в листьях пшеницы сорта Жница при инфицировании грибом *S. nodorum* различной степени агрессивности

Вариант	Время после инфицирования, ч		
	24	48	72
H_2O_2 , мкМ/мг сырой массы			
контроль	16.3 ± 1.2	14.1 ± 0.7	11.2 ± 0.6
штамм 9МН	20.9 ± 1.5	16.9 ± 0.9	14.6 ± 0.4
штамм 4 ВД	29.2 ± 1.6	25.8 ± 2.3	20.9 ± 1.2

Исследования последних лет свидетельствуют, что важной составляющей защитного ответа растений, индуцируемой сигнальными молекулами, является образование белковых ингибиторов (Валуева, Мосолов, 2002; Дунаевский, 2005). Ткани растений содержат соединения, способные ингибировать активность гидролаз патогенных микроорганизмов, насекомых, млекопитающих. Наибольшее число работ посвящено исследованию ингибиторов, подавляющих активность протеолитических ферментов (Ибрагимов, 2000; Озерецковская и др, 2006). Сведения об ингибиторах, подавляющих активность других гидролаз пока в литературе малочисленны.

Целлюлазы и пектиназы участвуют в гидролизе материала клеточных стенок растений, уровень активности этих ферментов является важным фактором агрессивности и патогенности микроорганизмов и насекомых - фитофагов (Абдеев, 2001). Соответственно, уровень ингибиторной активности растительных тканей может служить одним из важных показателей их устойчивости к фитофагам. В наших экспериментах измеряли активность ингибиторов из листьев, клубней и проростков картофеля различных сортов, подавляющих действие ферментов бактериального происхождения и ферментов колорадского жука. Как показали исследования, в листьях картофеля выявлена активность ингибиторов пектиназ и целлюлаз. Причем, уровень ингибиторной активности в листьях значительно различается в

зависимости от сорта (таблица 2). Ранее нами было показано, что белковые ингибиторы протеолитических ферментов из растений обладают высокой термостабильностью, и могут быть выделены из комплекса с ферментом путем селективной денатурацией конформационно лабильных молекул фермента при нагревании экстрактов (Ибрагимов и др, 1986). Однако оказалось, что прогревание экстрактов листьев картофеля не приводит к повышению активности ингибиторов пектиназ. Этот факт свидетельствует о том, что в листьях картофеля ингибиторы не способны образовывать комплексы с эндогенными пектиназами, хотя пектинолитическая активность в листьях картофеля присутствует. В экстрактах листьев изученных сортов картофеля выявляется активность, как свободных ингибиторов целлюлаз *Trichoderma reesei* и *L.decemlineata*, так и ингибиторов, находящихся в связанном состоянии.

Так, в листьях сортов Невский, Удача, гибрида 9513 все ингибиторы целлюлаз колорадского жука выявляются в связанном состоянии. Наши эксперименты показали, что клубни и проростки картофеля также обладают антицеллюлазной активностью (таблица 3). Причем, в проростках выявляется активность связанных ингибиторов, в клубнях определяется лишь активность свободных ингибиторов. Наиболее высокий уровень антицеллюлазной активности характерен для клубней гибридов 4281-7 и 4292-149.

Таблица 2.

Активность ингибиторов целлюлаз и пектиназ (ИЕ/г сырой массы) в листьях различных сортов картофеля

Сорт картофеля	Ингибиторы целлюлаз				Ингибиторы пектиназ	
	<i>Trichoderma reesei</i>		имаго <i>L. decemlineata</i>		имаго <i>L. decemlineata</i>	
	1	2	1	2	1	2
Невский	0	11,8 ± 0,4	4,6 ± 0,9	20,1 ± 0,7	14,9 ± 0,8	14,9 ± 0,8
Удача	0	5,6 ± 0,6	0	5,5 ± 0,8	14,9 ± 0,6	14,9 ± 0,7
Луговской	2,3 ± 0,4	14,8 ± 0,7	2,8 ± 0,6	19,7 ± 0,8	21,8 ± 0,5	14,9 ± 0,8
4281-7	2,3 ± 0,3	28,3 ± 1,2	5,6 ± 0,5	27,1 ± 0,6	11,4 ± 0,6	14,9 ± 0,8
9513	0	5,6 ± 0,5	-	-	18,4 ± 0,8	3,9 ± 0,9

Примечание: 1- экстракт без прогревания; 2-экстракт после прогревания при 60° С, 10 мин. Активность целлюлаз *T. reesei* - 125,2 Е/мг; активность целлюлаз *L. decemlineata* - 117,9 Е/г; активность пектиназ *L. decemlineata* — 78,5 Е/г.

Таблица 3.

Активность ингибиторов целлюлаз (ИЕ/г сырой массы) колорадского жука в клубнях и проростках картофеля

Сорт	проростки		клубни	
	1	2	1	2
Невский	3,3 ± 0,5	19,1 ± 0,8	9,3 ± 0,4	6,1 ± 0,8
Удача	0	11,4 ± 0,5	8,3 ± 0,6	13,5 ± 0,7
4281-7	0	10,6 ± 0,5	11,8 ± 0,4	10,2 ± 0,4
4292-149	0	12,1 ± 0,4	14,2 ± 0,3	13,3 ± 0,5

Результаты проведенных исследований показали, что в различных тканях картофеля содержатся ингибиторы белковой природы, способные подавлять активность целлюлолитических и пектинолитических ферментов *Leptinotarsa decemlineata* и *Trichoderma reesei*. Изученные сорта и гибриды картофеля имеют существенные различия по уровню антицеллюлазной и антипектиназной активности в клубнях, проростках и листьях.

Таким образом, формирование защитного ответа растений пшеницы и картофеля к патогенным грибам и насекомым-вредителям определяется концентрацией АФК и уровнем активности ингибиторов гидролаз в инфицированных тканях.

Работа выполнена при финансовой поддержке АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы», грант № 2.1.1/5676.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Лебран М.-А. Тенуазоновая кислота, токсин возбудителя пирикулярноза, индуцирует болезнестойчивость и продукцию активных форм кислорода в растениях риса // Физиология растений. 2007. Т. 54, №6. С. 841–846.
2. Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н. Окислительный стресс и дифференцировка у *Neurospora crassa* // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 497-501.
3. Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов // Биохимия. 2007. Т. 72, вып. 10. С. 1342–1364.

4. Озерцовская О.Л., Васюкова Н.И., Панина Я.С., Чаленко Г.И. Действие иммуномодуляторов на устойчивость и восприимчивость картофеля к *Phytophthora infestans* // Физиология растений. 2006. Т. 53, вып. 4. С. 546–553.

5. Талиева М.Н., Мишина Г.Н. Окислительные ферменты во взаимоотношениях растения и патогенна при мучнистой росе флокса // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 5. С. 679-684.

6. Тарчевский И.А. Элиситориндуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие // Физиология растений. 2000. Т. 47, вып. 2. С. 321–331.

7. Трошина Н.Б. Перекись водорода как регулятор устойчивости растений и каллусов пшеницы к грибным патогенам // Автореф. дисс. докт. биол. наук. СПб. 2007. 44 с.

8. Яруллина Л. Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам.- Уфа:Гилем, 2006.-232с.

9. Erlanger V.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys.- 1961.- V. 95.№ 2.- P. 271-278.

10. Garre V., Tenberge K.B., Eising R. Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of putative role in pathogenesis and suppression of host defense // Phytopathology. 1998. Vol. 88. P. 744–753.

11. Gil-ad N.L., Bar-Nun N., Noy T., Mayer A.V. Enzymes of *Botrytis cinerea* capable

of breaking down hydrogen peroxide // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 190. P. 121–126.

12. Hamilton A. J., Holdom M. D. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence // Medical Mycology. 1999. Vol. 37. P. 375–389.

13. Huckelhoven R., Kogel K.H. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? // Planta. 2003. Vol. 216. P. 891–902.

НАНОТЕХНОЛОГИИ И ПРОБЛЕМА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Парахонский А.П.

Медицинский институт

высшего сестринского образования

Краснодар, Россия

Многие генетические процессы – явления наномира. Участвующие в этих процессах нуклеотиды, триплеты, аминокислоты имеют нанометровые размеры; в результате этих процессов могут рождаться новые свойства, качества. С нанотехнологиями открывается перспектива создания принципиально новых, исключительных в своём роде генетически активных веществ, способных: преодолевать внутриклеточные барьеры; поражать множество нуклеотидов в пределах одного гена; целенаправленно изменять наследственные единицы; обезвреживать опасные гены; вскрывать созидательные потенциалы немых генов. Это позволит преодолеть некоторые эволюционные и онтогенетические запреты, заглянуть в палеонтологическое прошлое или неопределённое будущее. В фундаментальном плане наномутагены могут стать ценным инструментом для открытия новых закономерностей в живых системах. С развитием мутационных нанотехнологий открывается перспектива создания уникальных гибридных наноматериалов, пока ещё не существующих в природе. Всё живое движется в русле глобального мутационного процесса, в экстремальной фазе сверхбыстрого нарастания нелинейных неустойчивых процессов.

Антропогенный мутагенез, выступающий как сильный дезорганизующий фактор в природе, увеличивающий генетический беспорядок и энтропию живых существ, поставил всех нас на порог новой Великой эволюции – катастрофической, неопределённой и рукотворной. Ситуация усугубляется наступающим глобальным потеплением – механизмом, который выводит на арену жизни палеонтологические вирусы и, возможно, какие-то другие элементарные генетические частицы, замороженные миллионы лет тому назад в кристаллы льдов.

Они оживают и грозят нам новыми болезнями и эпидемиями, ускорением мутационных процессов, хаосом генов. Нанотехнологический прогресс обещает продолжить глубокие изменения в структуре окружающего мира. Нельзя исключить, что в природу поступят новые специфические раздражители, обладающие генотоксической активностью. Необходимо предусмотреть такую опасность и поставить под тотальный контроль токсикологическую оценку продуктов, создаваемых на базе нанотехнологий – манипуляций с атомами, молекулами, молекулярными системами. Главенством такой оценки должны стать исследования последствий действия наночастиц и их комплексов на генетические структуры и клетки зародышевого пути, поскольку именно половые клетки, их наследственный аппарат хранят в своих глубинах историю жизни всего живого, гарантируют бессмертие генов и непрерывность жизненного процесса. Такие исследования исключают возможность появления в окружающей среде продуктов нанотехнологий, наделённых мутагенным комплексом, и могут способствовать селекции нановеществ с положительными модификационными и антимутагенными свойствами. Наиболее эффективные из них будут предложены в качестве безопасных лекарств, пищевых добавок, косметических средств, а также для использования в профилактических целях на производствах и местностях с повышенным генетическим и репродуктивным риском.

Экологический аспект нанотехнологий включает самостоятельную, более сложную задачу – прогнозирование реального риска генетических и репродуктивных последствий комбинированного действия наноматериалов и других загрязнителей биосферы, интегральные эффекты которых могут быть модифицированы. Для успешного решения этой задачи могут привлекаться в качестве естественных детекторов и тест-моделей генетические системы половых клеток природных популяций животных разных видов, обитающих вблизи зон с повышенным нанотехнологическим риском.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ЛАКТОКОККОВ

Фокина Н.А., Карпунина Л.В.

Саратовский государственный

аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Саратов, Россия

В настоящее время широко изучаются экзополисахариды (ЭПС) бактериальной при-