

ОЦЕНКА ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ПО АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

EVALUATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI ACCORDING TO THE HYDROLYTIC ENZYME SYSTEM

**M. Gasimova
A. Yusifova
M. Mensimli
A. Hasanov**

Summary. In the carried out of researches in different economic regions of Azerbaijan have identified 90 species involved in the formation of mycobiota of various plants. The recorded fungi differed in terms of ecological trophic relationships and by their manifestations, as well as enzymatic activity, phytotoxic activity. In research have observed an inverse relationship between the proteolytic activity and phytotoxic activity of fungi, primarily phytopathogens which makes it possible to use proteolytic activity as a limiting factor in the pathogenesis.

Keywords: plants, mycobiota, phytopathogenic species, enzymatic activity, phytotoxic activity.

Гасимова Мехпара Ибрагим кызы

Доктор философии по биологии, и.о. доцента,
Азербайджанский Аграрный университет (Гянджа)
qmehpape@mail.ru

Юсифова Анаханым Амралы кызы

Доктор философии сельскохозяйственных
наук, доцент, Азербайджанский Государственный
Педагогический университет (Баку)
azmbi@mail.ru

Мансимли Мужгян Руфат кызы

Институт Микробиологии НАНА (Баку)
masimlimujgan@gmail.com

Гасанов Азер Мирзасен оглы

Научно-Исследовательских Институт Ветеринарии
Министерства Сельского Хозяйства Азербайджанской
Республики

Аннотация. В исследованиях, проведенных в различных экономических регионах Азербайджана, выявлено 90 видов грибов, участвующих в формировании микобиоты растений различного назначения. Зарегистрированные грибы различались как по эколого-трофическим связям и формам их проявления, так и по ферментативной и фитотоксической активности. Исследования также показали обратную зависимость между протеолитической и фитотоксической активностью грибов, в первую очередь, фитопатогенов, что позволяет использовать протеолитическую активность как фактор, лимитирующий патогенез.

Ключевые слова: растения, микобиота, фитопатогенные виды, ферментативная активность, фитотоксическая активность.

Как известно, все растения, независимо от их назначения, являются одним из мест обитания грибов, которые в свою очередь, состоят с этими растениями в различных отношениях [5, 9]. Для одной из таких форм отношений характерны патологии растений, вызываемые грибами [7]. В результате таких отношений могут существенно меняться морфологические, физиологические и биохимические свойства растений. В возникновении той или иной патологии растения предпосылкой и чуть ли не главным условием протекания процесса является проникновение клеток грибов в ткани растения-хозяина. Наличие у растительных клеток, также как и у всех эукариотических организмов, особой клеточной оболочки, препятствует легкому или без наличия особого механизма протеканию данного процесса. В этом отношении важное значение имеет ферментная система грибов, а в процессе патогенеза важно, чтобы возбудитель для проникновения во внутренние ткани хозяина

синтезировал различные ферменты, катализирующие разрушение клеточной стенки [8], а точнее, составляющие ее полимеры. И как результат, не вызывает сомнений и то, что широкоспекторная ферментная система этого патогена играет важную роль в проникновении и роста патогена в тканях растения-хозяина.

Так, клеточная стенка растений, т.е. оболочка, имеет сложное строение, она содержит такие сложные полимеры как целлюлоза, лигнин, гемицеллюлоза, пектин, белок и др. [11–12], которые в том или ином растении характеризуются разным количеством, механизмом разложения и взаимодействием друг с другом. Например, разложение целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина и крахмала в тканях растений происходит за счет гидролиза, а разложение лигнина происходит за счет окисления. Поэтому среди множества ферментов особый интерес представляют ферменты, которые катализируют

разложение этих полимеров, а именно, гидролазы и оксиредуктазы [14]. Не вызывает сомнений и то, что патогены, не имеющие ферментной системы, катализирующей разложение соединений клеточной стенки растения-хозяина, слабее в борьбе за выживание и имеют меньший ареал распространения. Поэтому, изучение в этом аспекте организмов, особенно грибов, вызывающих у растений различные патологии, может иметь важное значение при разработке мер борьбы с патогенами [16]. Так, одной из основных целей в борьбе с патогенами является его физическое уничтожение, что, в свою очередь, приводит к уничтожению видов, входящих в состав эпифитной микобиоты растения и играющих роль в почве и биологической продуктивности растений. По этой причине разработка метода избирательной борьбы с патогенами [10.] уже длительное время находится в центре внимания исследователей. Следует отметить, что такой подход, хотя и химического характера, достигнут в борьбе с сорняками. Изучение ферментной системы грибов может обещать новые перспективы такой борьбы. Так, наличие веществ, которые репрессируют синтез ферментов и подавляют каталитическую активность фермента, а также тот факт, что их количество и механизм действия связаны с особенностями самого гриба, были подтверждены в ряде исследований. Поэтому, целесообразно изучить ферментную систему грибов, а также их патогенных представителей, распространенных на растениях, выращиваемых в Азербайджане, что было реализовано на примере некоторых культурных и дикорастущих растений различных регионов Азербайджана.

Материалы и методы

Исследования проводились в Апшеронском, Аранском, Гянджа-Газахском и Губа-Хачмазском экономических районах Азербайджана. Пробы были взяты с растений различного назначения (пищевые, кормовые, красильные, лекарственные, технические и др.), произрастающих и культивируемых в указанных регионах, а отобранные с них грибы были выделены в чистую культуру и проанализированы по видовому составу. В качестве питательных сред для выращивания грибов использовали агаризованное солодовое сусло (АСС), рисовый агар (РА), крахмальный (КА) и картофельный (КА) агар, агаризованную среду Чапека и Чапека-Докса. Приготовление сред, их стерилизацию и розлив в чашки Петри проводили согласно известным методам [4.]. Идентификация грибов проводилась на основе определителей, составленных на основе культурально-морфологических и физиологических признаков [7, 13, 15]. Для установления названия грибов использовались материалы с сайта Indexfungorum [17].

При определении ферментативной активности грибов для их культивирования использовали жидкую

среду Чапека, культивирование проводили при 26 °С в течение 10 дней, а активность ферментов определяли в культуральной жидкости каждые 5 дней согласно соответствующим методикам.

Количество белка в ходе исследования определяли спектрофотометрическим методом [6]. В ходе исследования определяли активность целлюлазы (эндо-1,4-β-глюканазы), ксиланазы, протеазы, амилазы и пектиназы, согласно известными методами [1, 3].

Изучение фитотоксической активности отдельных видов грибов, входящих в состав микобиоты того или иного культурного растения, проводилось нижеотмеченным способом. Грибы после выращивания в жидкой среде Чапека фильтруют и отделяют полученную биомассу. Используемые семена (при условии, что от каждого растения берется 100–150 семян) замачивают в этой культуральной жидкости на 24 часа. В контрольном варианте используется стерильная среда Чапека. Затем семена помещают на увлажненную фильтровальную бумагу и проращивают при комнатной температуре (20–22 °С) в течение 7 дней. Фитотоксическая активность грибов (в%) также определяется по формуле, где Р — это фитотоксическая активность, n — количество не проросших семян, а N — общее количество взятых семян. Во всех случаях в каждой повторности количество взятых семян составляло 100 единиц.

В ходе исследования все эксперименты проводились в 4–6 повторностях, результаты статистически обрабатывались [2], и во всех случаях достоверными считались данные, соответствующие формуле $t / M = P \leq 0,05$ (где M — среднее значение, m — стандартное отклонение, P — критерий Стьюдента).

Результаты и их обсуждения

В проведенных в различных экономических регионах Азербайджана исследованиях было зарегистрировано около 90 видов грибов. По эколого-трофическим связям среди них были обнаружены как факультативные, так и истинные (биотрофы и сапротрофы). Наличие среди них фитопатогенных, токсигенных, оппортунистических и аллергенных грибов было подтверждено в ходе исследования. В связи с этим в ходе дальнейшего процесса исследования было сочтено целесообразным изучить ферментативную активность 113 штаммов 25 видов грибов.

В результате проведенных исследований было установлено, что все использованные в исследовании грибы обладают той или иной степенью гидролазной активности, и привлекает внимание разность

Таблица 1. Ферментативная активность грибов, входящих в состав микобиоты некоторых красильных растений западного региона Азербайджана (Ед/мл)

№	Виды (число штаммов)	Целлюлаза	Ксиланаза	Амилаза	Пектиназа	Протеаза
1	<i>Aspergillus flavus</i> (5)	1,1–2,1*	20,1–28,7	1,7–2,6	5,6–7,3	3,6–7,1
2	<i>A. fumigatus</i> (5)	1,0–1,7	17,8–24,3	2,3–3,8	4,5–7,5	2,7–6,5
3	<i>A. niger</i> (5)	2,0–4,5	35,3–42,5	3,8–5,3	9,6–11,5	4,6–7,2
4	<i>A. ochraceus</i> (4)	0,4–0,7	13,2–17,6	1,2–2,3	7,1–8,9	3,2–4,5
5	<i>Alternaria alternata</i> (4)	0,9–1,7	12,7–24,5	0,7–1,3	3,1–5,1	2,2–4,7
6	<i>A. solani</i> (4)	0,5–1,2	17,8–30,1	0,5–0,8	2,7–4,3	1,9–5,7
7	<i>Botrytis cinerea</i> (4)	0,5–0,7	21,2–24,6	следы	1,2–2,5	0,7–1,2
8	<i>Favenaceum</i> (8)	1,1–1,6	16,4–22,9	1,4–2,2	1,5–3,5	следы
9	<i>F. gibbosum</i> (5)	0,8–1,3	15,6–25,3	1,8–3,0	2,6–4,8	0,3–0,8
10	<i>F. moniliforme</i> (5)	0,9–1,3	25,3–35,4	2,7–4,2	3,1–5,4	0,2–0,9
11	<i>F. oxysporum</i> (5)	0,7–1,2	20,2–31,4	2,3–3,5	2,3–4,6	следы
12	<i>F. semitectum</i> (4)	1,0–1,3	16,7–25,4	1,8–2,6	2,3–3,9	0,1–0,2
13	<i>V. dahliae</i> (5)	0,3–0,5	18,9–23,5	1,1–1,5	3,5–6,7	0,8–1,1
14	<i>V. albo-atrum</i> (4)	0,2–0,4	15,4–20,3	0,9–1,4	3,0–5,2	0,6–1,1
15	<i>P. martensii</i> (4)	0,2–0,5	23,4–31,3	следы	2,9–6,1	2,3–4,5
16	<i>P. cuslopium</i> (5)	0,3–0,7	26,5–34,5	1,2–2,4	3,4–7,4	1,1–2,2
17	<i>P. chrysogenum</i> (5)	0,8–1,3	18,9–23,4	0,6–1,4	2,1–4,3	2,9–4,6
18	<i>C. herbarum</i> (4)	1,1–1,5	19,3–28,3	0,3–0,8	2,6–4,3	1,4–1,9
19	<i>Asc. pisi</i> (4)	0,9–1,4	17,2–23,2	0,7–1,4	2,6–4,2	1,3–1,7
20	<i>Asc. betae</i> (3)	0,5–1,0	14,2–19,4	0,3–0,8	1,8–3,7	1,2–1,9
21	<i>Rh. nigricans</i> (4)	1,3–1,6	18,2–21,3	1,1–1,5	2,1–4,1	4,4–5,7
22	<i>M. mucedo</i> (5)	1,1–1,5	19,6–28,9	0,9–1,3	2,4–3,3	6,4–7,6
23	<i>M. plumbeus</i> (3)	0,9–1,7	17,2–24,3	0,7–1,5	1,6–3,9	3,6–5,9
24	<i>T. lignorum</i> (5)	2,3–4,1	29,1–36,7	0,1–0,5	1,2–1,9	4,1–5,7
25	<i>T. viride</i> (4)	2,0–3,4	25,6–34,4	0,2–0,4	1,1–1,6	3,2–5,4

*- все результаты статистически обработаны, и во всех случаях $P \leq 0,048$

количественных показателей активности ферментов этих грибов (таблица 1).

Этот факт, характеризующийся штаммовыми различиями, также следует рассматривать как фактор, играющий важную роль в патогенезе грибов. Постараемся подтвердить это следующим.

Как видно из таблицы (табл. 1), некоторые штаммы обладают высокой ферментативной активностью и по количественным показателям не отстают в этом аспекте от непатогенных штаммов (входящих в эпифитную микобиоту растений), считающихся активными продуцентами ферментов. Однако данные таблицы не позволяют уточнить роль отдельных ферментов в патогенезе, и нет четкой зависимости между опасностью грибов и высоким уровнем ферментативной активности. Например, штаммы грибов рода *Fusarium*, вызывающие фузариоз растений, по протеолитической активности уступают *A. niger*, который не считается опасным фитопатогеном.

С другой стороны, грибы рода *Trichoderma*, которые относятся к эпифитной микобиоте растений, обладают высокой целлюлолитической активностью. Количество целлюлозы среди полимеров, составляющих растительный покров, является достаточным, а точнее, превосходящим и поэтому создается впечатление, что она легче проникает в растение. Однако, как уже отмечалось, грибы, принадлежащие к роду *Trichoderma*, относятся к эпифитной микобиоте растений и в то же время имеют антагонистические отношения с фитопатогенами, благодаря чему из них получают препараты для улучшения фитосанитарного состояния почв.

Поэтому в ходе исследований было целесообразным выяснить характер взаимосвязи фитотоксической и ферментативной активности грибов. С этой целью 100 семян каждого растения выдерживались в течение 12 дней в культуральной жидкости гриба, культивированного в среде Чапека в течение 7 дней. По окончании этого периода семена помещают

Таблица 2. Влияние культуральной жидкости грибов на всхожесть некоторых растений (%)

Штаммы	Пшеница	Огурец	Арбуз	Ячмень	Фасоль	Томат
<i>Aspergillus flavus</i> M-14	79	74	84	75	82	80
<i>A. fumigatus</i> M-16	70	65	76	69	73	78
<i>A. niger</i> M-25	80	76	87	82	78	77
<i>A. ochraceus</i> M-31	78	75	85	79	72	81
<i>Alternaria alternata</i> A-07	65	63	67	72	69	64
<i>A. solani</i> A-14	61	51	56	64	55	53
<i>Botrytis cinerea</i> A-21	49	43	54	45	52	49
<i>Fusarium avenaceum</i> E-06	30	34	36	32	40	50
<i>F. gibbosum</i> E-45	39	40	42	37	44	49
<i>F. moniliforme</i> E-73	38	37	39	39	40	43
<i>F. oxysporum</i> E-96	35	29	37	36	34	32
<i>F. semitectum</i> E-75	41	35	44	40	39	43
<i>V. albo-atrum</i> E-122	50	49	48	52	52	48
<i>Verticillium dahliae</i> E-121	45	47	52	48	49	41
<i>P. martensii</i> A-32	67	64	73	70	72	68
<i>P. cuslopium</i> A-38	59	56	64	54	63	53
<i>P. chrysogenum</i> A-40	72	68	75	70	74	75
<i>C. herbarum</i> A-56	65	62	70	60	68	65
<i>Asc. pisi</i> A-39	65	60	64	68	63	67
<i>Asc. betae</i> A-38	61	59	62	70	64	63
<i>Rh. nigricans</i> E-97	76	79	81	78	80	82
<i>M. mucedo</i> E-89	85	86	89	87	90	92
<i>M. plumbeus</i> E-83	79	80	82	83	78	88
<i>T. lignorum</i> F-12	97	95	97	95	96	92
<i>T. viridei</i> F-15	94	95	94	90	91	89
Контроль	91	92	91	90	89	88

в климатическую камеру и в течение 30 дней наблюдают за их прорастанием. Полученные результаты показали, что грибы с высокой протеолитической активностью не обладают высокой фитотоксической активностью (таблица 2).

Например, протеолитическая активность гриба *Verticillium dahliae* E-121 в 5,5 раз ниже, чем у *Aspergillus flavus* M-14, но сравнение результатов, полученных при прорастании семян, показывает, что действие первого намного эффективнее, почти в 2 раза. В остальных вариантах четко проявляются аналогичные результаты, т.е. существует обратная зависимость между протеолитической и фитотоксической активностью, что позволяет использовать протеолитическую активность как лимитирующий фактор в патогенезе.

Как было отмечено выше, протеолитические ферменты деградируют белки путем гидролиза. Точнее, протеолитические ферменты разрушают пептидные связи, участвующие в образовании белков, и в конечном итоге расщепляют их на аминокислоты, т.е. белки выступают в роли субстрата для протеолитических ферментов. Все ферменты имеют белковую природу и эти ферменты также могут играть роль субстратов для протеаз, поэтому высокая активность протеолитических ферментов отрицательно влияет на активность других ферментов, что приводит к снижению активности и, следовательно, к затруднению проникновения их в клетку. Всё это позволяет говорить о том, что в будущем будет эффективно учитывать этот факт при разработке мер борьбы по нейтрализации или ограничении активности фитопатогенных грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А.А., Рабинович М.Л., Сеницын А.П. и др. Ферментативный гидролиз целлюлозы: 1. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников. //Биоорганическая химия, 1980, т. 6, с. 1225–1241.
2. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006, 816 с.

3. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982, 240 с.
4. Методы экспериментальной микологии/Под. ред. Билай В. И. Киев: Наукова думка, 1982, 500с.
5. Сафаралиева Э.М., Алиева Г. Р., Рзаева А. Л., Мамедова Ф. Р., Бахшалиева К. Ф. Изменение видового состава грибов, распространенных на различных ценозах в условиях Азербайджана //, Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и Технические Науки, 2020, № 02, с. 52–57
6. Практикум по биохимии (Под. ред. Н. П. Мешковой и С. Е. Северина.). М: МГУ, 1979, 430 с.
7. Саттон Д., Фотергилл А., Риналди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов.М.: Мир, 2001, 486с.
8. Amit K.C., Shubha C., Sushmita C., Shridha C. In vitro and in vivo production of polygalacturonase, polymethylgalacturonase and cellulase enzymes by *Alternaria solani* at different incubation periods.// African Journal of Plant Science, 2014, 8(5):248–253.
9. Archana J., Surendra S., Qin W., Yuanfu L. & Jingshan Sh. A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation.// Bioengineered, 2019, 10,1: 409–424
10. Foddai, A.C.G., Grant, I. R. Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects.// Appl Microbiol Biotechnol., 2020, 104, 4281–4288
11. Franková, L., Fry, S. C. Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides.// Journal of Experimental Botany, 2013, v. 64, is. 12, p.3519–3550
12. Gilbert H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction.// Plant Physiology, 2010, Vol. 153, p. 444–455
13. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D. W. et al. Dictionary of the fungi. 10-th edition. UK, 2008, 747 p.
14. Robinson P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications.// Essays Biochem., 2015, 59:1–41.
15. Samson R. A., Pitt J. I. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Amsterdam: Harwood Publishers, 2000, 510p.
16. Shuping, D.S.S., Eloff J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review//Afr J Tradit Complement Altern Med., 2017, 14(4): 120–127.
17. www.indexfungorum.org/Names/fungic.asp

© Гасымова Мехпара Ибрагим кызы (qmehpare@mail.ru),

Юсифова Анаханым Амралы кызы (azmbi@mail.ru), Гасанов Азер Мирзасен оглы (masimlimujgan@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Баку