



ФИЗИОЛОГИЯ

ПАТОГЕНЕЗА
И БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича

Физиология

ПАТОГЕНЕЗА И БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Минск
«Беларуская навука»
2016

УДК 632.938:581.1

Физиология патогенеза и болезнеустойчивости растений / А. П. Волынец [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 252 с. – ISBN 978-985-08-1965-9.

В монографии обобщены многолетние данные исследований, посвященных: изучению механизмов фитопатогенеза и фитоиммунитета; выявлению роли эндогенных регуляторов роста, антиоксидантов, ферментов, аминокислот и других метаболитов, принимающих участие в этих процессах; раскрытию сущности хлорозного и некротного типов защиты, общебиологической (антиоксиданты) и специфической (реакция «сверхчувствительности» и образование фитоалексинов) формам устойчивости растений, а также действию и взаимодействию физиологически активных соединений в проявлении болезнеустойчивости культурных злаков, льна-долгунца, семян сосны и ели. Впервые обсуждается система структурного фитоиммунитета, излагаются регуляторные основы протекания химического, инфекционного и экологического стрессов у растений, высказываются основные направления настоящей и будущей защиты растений.

Предназначена для широкого круга специалистов-исследователей в области физиологии и биохимии растений, медицины, пищевой промышленности, сельского и лесного хозяйства, а также для преподавателей и студентов вузов соответствующего профиля.

Табл. 128. Ил. 37. Библиогр.: 541 назв.

А в т о р ы:

А. П. Волынец, В. П. Шуканов, Н. В. Полякова, Н. П. Башко, Е. Л. Недведь,
Е. В. Мельникова, Л. А. Корытько, В. В. Карпук, Н. Е. Манжелесова, С. Н. Полянская,
И. А. Голуб, Г. Н. Шанбанович, Н. С. Савельев

Н а у ч н ы й р е д а к т о р

академик НАН Беларуси, доктор биологических наук,
профессор В. Н. Решетников

Р е ц е н з е н т ы:

член-корреспондент НАН Беларуси,
доктор биологических наук, профессор Ж. А. Рупасова,
доктор биологических наук В. И. Домаш

ISBN 978-985-08-1965-9

© Институт экспериментальной ботаники
им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, 2016
© Оформление. РУП «Издательский дом
«Беларуская навука», 2016

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящая монография посвящена светлой памяти безвременно ушедшей из жизни **Зои Яковлевны Серовой** (1929–2008 гг.), отдавшей более 50 лет исследованию патогенеза культурных злаков, а также 80-летию со дня рождения главного научного сотрудника Института экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси **Александра Потаповича Волынца**, работающего уже более 55 лет в области физиологии и биохимии синтетических и эндогенных регуляторов роста растений.

Явление фитопатогенеза рассматривалось З. Я. Серовой не только как вынужденное зло, но, прежде всего, как природная форма существования двух организмов – растения и фитопатогенного гриба, образующих факультативную или облигатную фитопатосистемы, взаимоотношения между которыми носят явно антагонистический или временно синергический характер. По ее мнению, экологическая среда для больного растения принципиально не отличается от таковой для здорового организма, тогда как экологической нишей для патогена служат некоторые структуры апопласта растения-хозяина, в частности клетки и межклетники.

З. Я. Серова рассматривала фитопатогенез как гетерогенный процесс, включающий в качестве составляющих компонентов восприимчивость и устойчивость. Соотношение восприимчивых и устойчивых реакций и определяет реальную устойчивость организма к фитопатогенным грибам. Она считала, что даже самый восприимчивый сорт злаков содержит элементы устойчивости и, наоборот, самая устойчивая форма проявляет признаки патологии, которые можно обнаружить с помощью физиолого-биохимического анализа.

Согласно ее представлению, молекулярно-генетическую основу патогенеза составляет быстрое включение генома и мембранных структур растения во взаимодействие с возбудителем и последующее сходство – в изменении состава и обмена веществ растения и гриба.

Очень большое внимание З. Я. Серова придавала философским и эволюционным аспектам фитопатогенеза. Кроме единства и борьбы противоположностей, в нем она видела совершенствование эволюционного процесса в направлении сближения обмена веществ двух организмов.

В ближайших планах З. Я. Серовой как раз и значилось написание монографии «Молекулярные механизмы фитопатогенеза (от В. Ф. Купревича до наших дней)». Надеемся, что выход настоящей монографии «Физиология пато-

гене́за и болезнеустойчивости растений» будет частичным восполнением этой несбывшейся задумки.

А. П. Волынец начинал свою научную деятельность с выяснения анатомо-морфологических и физиолого-биохимических причин избирательности действия гербицидов 2,4-Д и 2М-4Х на растения районированных в Республике Беларусь сортов льна-долгунца, постепенно расширяя круг своих интересов и регуляторов роста вплоть до комплекса эндогенных фитогормонов, фенольных соединений и стероидных гликозидов.

В основе научной концепции А. П. Волынца лежит идея постоянного взаимодействия между регуляторами роста через сложную систему взаимоотношений, еще далеко непознанную, но с конечным видимым или измеримым эффектом. Важнейшими научными достижениями его можно считать два открытия:

1. Установление **новой функции фенольных соединений** (непрерывного взаимодействия между ауксином и фенольными соединениями в процессе роста растяжением за счет изменения содержания и активности гормона).

2. Установление **новой группы фитогормонов** (доказательства отношения эндогенных стероидных гликозидов растений к новой группе фитогормонов, основная функция которых сводится к регуляции прорастания семян и росту молодых побегов, где роль обычных гормонов невелика), а также выяснение роли фенольных соединений и фитогормонов в жизнедеятельности растений и в процессах фитопатогенеза и фитоиммунитета.

ВВЕДЕНИЕ

История фитопатогенеза начинается с того времени, когда человек впервые обратил внимание на поражение растений возбудителями болезней. Однако возникновение патогенеза как науки относится к концу XIX века [1, 2], когда началось изучение этого явления более или менее систематически.

Уже первые исследования процесса патогенеза показали, что инфицирование растений облигатными грибами представляет собой сложное взаимоотношение двух организмов, а не просто развитие патологического процесса. Допускалось, что взаимовлияние организмов проявляется на биохимическом уровне, и не исключено, что оно носит частично взаимовыгодный характер [1]. Физиологию патогенеза растений впервые фундаментально разрабатывал, а затем и изложил В. Ф. Купревич в широко известной монографии «Физиология больного растения в связи с общими вопросами паразитизма» (1947). Он дал определение предмета и наметил задачи физиологии больного растения. Согласно его представлению физиологические исследования должны ставить своей основной целью – выяснение причин вредности или механизма физиологического иммунитета, сосредоточив внимание на изучении обмена веществ питающего растения. Активным продолжателем и пропагандистом учения о фитопатогенезе была З. Я. Серова. Она внесла выдающийся вклад в теорию патогенеза и разработку многих аспектов этого сложного и взаимозависимого процесса. Она не только углубила начатое В. Ф. Купревичем изучение физиолого-биохимических особенностей растения-хозяина, но и обратила пристальное внимание на новые стороны паразитического образа жизни грибных патогенов (энергозависимые, геномно-белковые, структурно-функциональные, гормональные и другие процессы), которые нашли отражение в известных монографиях и многих публикациях [3–9].

Под влиянием ряда факторов [10–15] З. Я. Серова, будучи верной сторонницей патогенеза, постепенно расширяла фронт своих исследований в сторону устойчивости растений к фитопатогенным грибам, не разрывая полной связи с фитопатогенезом. Одновременное обсуждение вопросов патогенеза и болезнеустойчивости растений в последних работах З. Я. Серовой становится правилом [16]. Об этом свидетельствуют также представленные в данной монографии материалы. Они касаются разных сторон патогенеза и болезнеустойчивости растений: от окислительных и антиоксидантных до регуляторных систем растения.

В развитии исследований о фитопатогенезе и болезнеустойчивости растений в Институте экспериментальной ботаники можно выделить три этапа. Первый этап (1970–1981 гг.) связан с созданием лаборатории физиологии большого растения (заведующая – доктор биологических наук, профессор З. Я. Серова) и выбором направления исследований. На первом этапе придавалось исключительно важное значение проблеме фитопатогенеза, в частности физиолого-биохимическим и структурно-функциональным особенностям действия грибных патогенов на растения. Результаты исследований этого этапа нашли отражение в уже упомянутых публикациях [3–9] и в работе [17]. Однако вне поля зрения оставались судьба грибного организма, его вклад в обмен веществ растения-хозяина и воздействие самого растения на физиолого-биохимический статус патогена. Главным был поиск основного звена в обмене веществ растения, определяющего направление и степень поражения хозяина, или его восприимчивость. Таким звеном оказался генотип, а точнее нуклеиново-белковый обмен растения. Правда, глубокие теоретические исследования инфицированного растения в этот период не сочетались с поиском способов его оздоровления.

На втором этапе (1982–2006 гг.) с избранием на должность заведующего лабораторией доктора биологических наук, профессора А. П. Волынца исследования взаимодействия растения и гриба существенно расширились. Не отрицая значения проблемы патогенеза, было обращено серьезное внимание на изучение физиологии возбудителя: аппарата его нападения, а именно – гормональных и негормональных регуляторов роста (в том числе токсинов) и активности их ферментов. Во весь рост встала проблема болезнеустойчивости растений или фитоиммунитета, а также регуляция взаимоотношений растения и гриба в сторону снижения его вредоносности. Основной задачей стало определение среди большого набора гормональных и фенольных регуляторов роста ведущих компонентов, ответственных за формирование фитоиммунитета. Таким соединением в облигатных патосистемах оказался комплекс: ауксин + флавоноидные гликозиды, а в факультативных – ауксин + фенольные фитоалексины (или эфиры и гликозиды фенолкарбоновых кислот, содержащие структурно-высокоактивные фенольные соединения с о-диоксигруппировкой в молекуле). Естественно возникла необходимость разработки способов защиты растений от грибных болезней, что нашло свое отражение в патентах [18, 19] и фундаментальных работах [20, 21].

Третий этап в развитии проблем фитопатогенеза и болезнеустойчивости растений начинается с избрания на должность заведующего лабораторией, теперь уже переименованной в лабораторию физиологии патогенеза и болезнеустойчивости растений, кандидата биологических наук В. П. Шуканова (с 2006 г.). В связи с изменением государственной политики в области науки главной заботой становится разработка и внедрение в народное хозяйство способов и технологий защиты растений. Вместе с новыми требованиями лаборатория расширяет возможность применения своих разработок не только в сельском,

но и в лесном хозяйствах. В теоретическом плане главным стержнем стал поиск защитно-стимулирующих составов синергического или взаимодополняющего характера. Главным достижением последнего периода можно считать разработку регуляторных основ технологии возделывания льна-долгунца в Республике Беларусь совместно с Институтом льна [22, 23].

В целом проблема патогенеза и болезнеустойчивости растений представлена в настоящей монографии довольно рельефно. Однако реакции общего и специфического характера оставались не совсем ясными. Такое разделение реакций на примере одного инфекционного стресса весьма затруднительно. Сопоставление действия разных стрессоров на регуляторные системы растений позволяет более предметно говорить о сходстве и различии ответной реакции растения на воздействие неблагоприятных факторов человеческой деятельности и внешней среды. Данные такого содержания представлены в последней главе настоящей монографии. Она подготовлена по результатам исследований работающих в лаборатории физиологии патогенеза и болезнеустойчивости растений сотрудников. Исключение составляет большая глава, написанная бывшим сотрудником лаборатории доктором биологических наук В. В. Карпуком, касающаяся проблемы взаимоотношения живых организмов и возбудителей болезней, но с акцентом на структурные особенности системы фитоиммунитета, сведения о которых в литературе отсутствуют, а также глава II, подготовленная по данным совместных исследований с сотрудниками Института льна НАН Беларуси (И. А. Голуб, Г. Н. Шанбанович, Н. С. Савельев).

В разработке вопросов патогенеза и болезнеустойчивости растений в разные годы участвовала большая группа сотрудников: доктора биологических наук: А. П. Вольнец, В. В. Карпук, З. Я. Серова; кандидаты биологических наук: Н. П. Башко, Д. К. Гесь, Э. П. Комарова, Н. Е. Манжелесова, С. М. Минькова, Е. Л. Недведь, Г. М. Подчуфарова, Н. В. Полякова, С. Н. Полянская, Р. А. Прохорчик, Л. А. Пшеничная, Л. Н. Реуцкая, Г. И. Спирдонова, Л. Б. Утыро, Л. С. Юшко; научные сотрудники: Н. Г. Волковская, Л. А. Корытько, Е. В. Мельникова, Г. В. Морозик, Н. И. Савченко, которых вместе с приведенными авторами по праву можно считать соавторами настоящей монографии.

Литература

1. Вавилов, Н. И. Иммуитет растений к инфекционным заболеваниям / Н. И. Вавилов. – М.: Наука, 1986. – 520 с.
2. Купревич, В. Ф. Физиология больного растения в связи с общими вопросами паразитизма / В. Ф. Купревич. – М.-Л.: Изд. АН СССР, 1947. – 300 с.
3. Серова, З. Я. Окислительно-восстановительные процессы инфицированного растения / З. Я. Серова, Г. М. Подчуфарова, Д. К. Гесь. – Минск: Наука и техника, 1982. – 232 с.
4. Серова, З. Я. Метаболизм нуклеиновых кислот у растений в связи с грибной инфекцией / З. Я. Серова, Г. И. Спиридонова. – Минск: Наука и техника, 1986. – 223 с.
5. Серова, З. Я. Функции белков в фитопатогенезе / З. Я. Серова, Л. С. Юшко, Г. М. Подчуфарова. – Минск: Наука и техника, 1992. – 269 с.
6. Серова, З. Я. Молекулярные механизмы взаимодействия растений с патогенными грибами / З. Я. Серова // Проблемы иммунитета сельскохозяйственных растений к болезням. – Минск: Наука и техника, 1988. – С. 81–112.

ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И ФИТОПАТОГЕНЕЗ

Развитие фитопатологических реакций начинается со времени попадания грибных спор на влажную поверхность растений. Первое время питание гриба осуществляется в основном за счет запасных веществ споры. В дальнейшем патоген переходит на паразитический образ жизни, получая все необходимое для своего развития от растения-хозяина. Для этого у него имеется мощный аппарат нападения, включающий ферменты, фитогормоны и токсины. Ферменты служат для проникновения ростковых трубок в ткани растения и для последующего гидролиза сложных запасных веществ до простых продуктов. Гормоны же обеспечивают аттракцию питательных веществ к формирующимся инфекционным структурам. Токсины необходимы грибному патогену для необратимого повреждения живых тканей растения. Последние характерны прежде всего для факультативных паразитов, тогда как вопрос о наличии токсинов у облигатных грибов остается открытым, так как надобность в них, кажется, на первый взгляд отпадает.

Эндогенные регуляторы роста гриба *Drehslera teres* (Sacc.) Shoem. Ito и фенольный комплекс грибов *Puccinia graminis* f. sp. *secalis* и *Puccinia dispersa* Erikss. et Henn. изучали на примере культуральной жидкости и мицелия гельминтоспориозного гриба и при использовании уредоспор ржавчинных грибов соответственно.

1.1. Факультативная фитопатосистема: ячмень – гриб *Drehslera teres*

Гриб *Drehslera teres* выращивали на питательной среде Чапека при освещении 6000 лк и температуре 20 °С в течение 40 сут. Жизнеспособные уредоспоры гриба *Puccinia graminis* получали из ВНИИФ (Московская обл.) и после длительного хранения в холодильнике в запаянных ампулах использовали для анализа фенольных соединений. Подробная методика хроматографического разделения и определения содержания эндогенных регуляторов роста описана в работе [1]. Содержание свободных и конъюгированных фитогормонов и фенольных соединений сопоставляли с нарастанием сырой и сухой биомассы гриба *Drehslera teres* в течение 40 сут. Увеличение сырой и сухой биомассы гельминтоспориозного гриба в течение первых 5 сут было незначительно (табл. 1.1). Интенсивный рост мицелия начинался после 10-дневного периода и продолжался в течение 15 сут. За этот период сырая масса мицелия увеличи-

валась в 14 раз, а сухая всего в 4 раза. Дальше накопление биомассы гриба выходило на плато, после чего начиналось ингибирование роста, а затем и спорообразование.

Таблица 1.1. Динамика нарастания сухой и сырой биомассы гриба *Drehslera teres*

Биомасса гриба	Возраст гриба, сут							
	5	10	15	20	25	30	35	40
Сырая	1,0	2,0	6,4	10,5	14,0	14,5	14,5	14,0
Сухая	–	0,10	0,20	0,30	0,40	0,45	0,47	0,45

В составе эндогенных регуляторов роста мицелия и культуральной жидкости гриба *D. teres* обнаружены те же группы веществ, которые характерны и для высших растений. Однако если в растениях преобладает конъюгированная форма фитогормонов, то в мицелии и культуральной жидкости – свободная (табл. 1.2). Исключение составляли фенольные соединения, среди которых больше конъюгированных компонентов.

Таблица 1.2. Состав эндогенных регуляторов роста в культуральной жидкости и мицелии гриба *D. teres*

Группа веществ	Культуральная жидкость		Мицелий	
	свободные	конъюгированные	свободные	конъюгированные
Ауксины	3	–	1	–
Гиббереллины	6	–	4	–
Цитокинины	3	2	–	2
АБК	1	–	1	–
Фенольные соединения	14	17	3	5
Всего веществ	27	19	9	7

Важно и то, что в культуральной жидкости выявлено больше регуляторов роста, чем в мицелии. Эту особенность в жизнедеятельности гриба, по-видимому, можно связать с эволюционно выработанным способом паразитизма, направленным на обеспечение своего существования в тканях растения-хозяина.

Кроме абсцизовой кислоты (АБК) и β -индолилуксусной кислоты (ИУК), в составе эндогенных регуляторов роста идентифицированы: зеатин, зеатинрибозид, изопентениладенин и изопентениладенинрибозид. Другие регуляторы роста окончательно не идентифицированы. Однако отношение их к гиббереллинам и фенольным соединениям не вызывает сомнения, что подтверждается качественными реакциями, хроматографическими данными, биотестированием и УФ-спектрами. Большинство фенольных соединений имело один максимум поглощения в области 265–285 нм, что сближает их с простыми фенолами и фенолкарбоновыми кислотами. Однако среди них не обнаружены широко известные оксibenзойные и оксикоричные кислоты, столь характерные для высших растений [2].

Состав эндогенных регуляторов роста в культуральной жидкости и мицелии гриба *D. teres* изменялся в онтогенезе. До 10-дневного возраста они не выявлены ни в культуральной жидкости, ни в мицелии. Позже появлялись ауксины и цитокинины, которые первыми и исчезали (на 35-е сутки). В то же время АБК и фенольные соединения были обнаружены в культуральной жидкости примерно с 15-дневного возраста и оставались там до спорообразования, когда рост мицелия полностью прекращался.

В 10-дневном возрасте гриба обнаружены ауксины и гиббереллины в минимальных количествах в культуральной жидкости и в значительном – цитокинины и АБК (табл. 1.3).

Таблица 1.3. Содержание фитогормонов в культуральной жидкости и мицелии гриба *D. teres* в онтогенезе

Группа веществ	Возраст гриба, сут						
	10	15	20	23	25	30	35
Ауксины, мкг/экв/л	<u>0,38</u> 0,00	<u>0,60</u> следы	<u>0,65</u> следы	<u>0,70</u> следы	<u>0,48</u> следы	<u>0,52</u> следы	<u>0,60</u> следы
Гиббереллины, мкг/экв/л	<u>0,05</u> 0,00	<u>0,12</u> следы	<u>0,14</u> следы	<u>0,16</u> следы	<u>0,15</u> следы	<u>0,06</u> следы	<u>0,00</u> следы
Цитокинины, мкг/л	<u>50,0</u> 0,00	<u>150,0</u> следы	<u>280,0</u> 0,20	<u>450,0</u> 0,50	<u>100,0</u> 0,05	<u>0,07</u> 0,01	<u>0,02</u> 0,00
АБК, мкг/л	<u>25,0</u> следы	<u>115,0</u> следы	<u>50,0</u> 0,05	<u>125,0</u> 0,07	<u>110,0</u> 0,05	<u>450,0</u> 0,15	<u>100,0</u> 0,15

П р и м е ч а н и е: В числителе – содержание веществ в культуральной жидкости, в знаменателе – содержание веществ в мицелии.

Содержание всех фитогормонов увеличивалось по мере интенсификации роста, достигая максимума в возрасте 23 сут. Некоторое своеобразие отмечено только в накоплении АБК. Для этого гормона характерны были три максимума накопления: два малых – в возрасте 15 и 23 сут и один большой – 30 сут, когда наступало торможение роста мицелия. В отличие от культуральной жидкости в мицелии не выявлены фитогормоны в заметном количестве в течение всего онтогенеза. Следовательно, основными фитогормонами гриба *D. teres* являются цитокинины и АБК, почти целиком сосредоточенные в культуральной жидкости. Первые преобладают в период экспоненциального роста мицелия, вторые – в период, предшествующий ингибированию роста.

Динамика изменения содержания фенольных соединений в культуральной жидкости гриба *D. teres* почти целиком повторяет динамику накопления АБК, особенно фенольных конъюгатов. Для них также характерно появление трех максимумов накопления в возрасте 15, 23 и 40 сут (табл. 1.4). Одно отличие – сдвиг последнего максимума у фенольных соединений на более позднее время, на период выраженного ингибирования роста мицелия и начала спорообразования. Что же касается свободных фенольных соединений, то

у них имеется только два максимума содержания (23 и 40 сут). Сравнивая содержание фитогормонов и фенольных соединений в культуральной жидкости видим, что количество вторых многократно превышает уровень первых. Особенно обращает на себя внимание очень высокое содержание высокоактивных свободных фенольных соединений, которое мало уступало количеству фенольных конъюгатов.

Таблица 1.4. Содержание фенольных соединений в культуральной жидкости гриба *D. teres* в онтогенезе

Группа веществ	Возраст гриба, сут							
	10	15	20	23	25	30	35	40
Свободные фенольные соединения, мг/л	0,0	8,0	10,0	40,0	18,0	8,0	30,0	70,0
Фенольные конъюгаты, мг/л	30,0	50,0	25,0	90,0	52,0	25,0	90,0	110,0

Затем выясняли способность фитогормонов и фенольных соединений отдельно или в совокупности с фитопатогенными факторами (спорами и культуральной жидкостью) вызывать повреждение тканей у взрослых растений ячменя. Опрыскивание растений высокими концентрациями фитогормонов (0,1 мг/л) и фенольных соединений (10 мг/л) при экспозиции 10 сут приводило к появлению на листьях ячменя патологических симптомов. Флавоноиды (рутин и кверцетин) в насыщенной концентрации вызывали хлороз, оксикумарины (эскулетин и эскулин) и оксикоричные кислоты (п-кумаровая и феруловая) – некроз листьев. Среди фитогормонов слабую некротизацию тканей индуцировала ИУК, в то время как АБК вызывала разные эффекты: от небольшого хлороза до сильного некроза. Кинетин способствовал сохранению зеленой окраски листьев, гибберелловая кислота (ГК₃) не изменяла пигментацию листьев. В присутствии фитопатогенных факторов АБК (0,01 мг/л) и фенольные соединения (10 мг/л) ускоряли и усиливали некротизацию листьев ячменя. Из сказанного вытекает, что АБК и фенольные соединения при накоплении в тканях растений в результате экстрацеллюлярного выделения фитопатогенными грибами могут вызывать известные симптомы в виде хлороза или некроза.

Вместе с фитотоксическим действием эндогенных регуляторов роста выясняли их влияние на развитие фитопатогенных грибов, в частности на рост гриба *D. teres* в культуре на среде Чапека. В литературе нет единого мнения о действии эндогенных регуляторов на развитие грибов. С одной стороны, отмечается, что ИУК и гиббереллины не оказывают влияния на рост мицелия грибов [3–5], с другой, обнаружено стимулирующее [6, 7] или ингибирующее [7] действие фитогормонов на рост некоторых видов. Что же касается фенольных соединений, то они оказывали разное влияние на рост мицелия в культуре в зависимости от структуры и концентрации веществ [6]. Однако чаще всего проявлялась ингибирующая активность фенольных соединений [8]. С учетом сказанного было определено воздействие экзогенных фитогормонов и фенольных соединений на рост гриба в культуре, его патогенные и вирулентные свойства [1].

Эндогенные регуляторы роста оказывали существенное влияние на рост гриба *D. teres* (табл. 1.5).

Таблица 1.5. Рост гриба *D. teres* на твердой питательной среде Чапека в присутствии фитогормонов и фенольных соединений

Вариант	Диаметр колонии, см	Форма колонии	Характер роста	Спороношение, сут	Характеристика спор
Контроль (вода)	5	однородная круговая	медленный прерывистый	6–7	мелкие светлые
ИУК	6	однородная круговая	медленный прерывистый	6	мелкие светлые
ГК ₃	5	однородная круговая	медленный прерывистый	5–6	мелкие светлые
АБК	8	однородная круговая	быстрый прерывистый	4	крупные темные
Кинетин	9	однородная круговая	быстрый прерывистый	нет	нет
Зеатин	9	однородная круговая	быстрый прерывистый	нет	нет
Хлорогеновая кислота	9	локальная очаговая	быстрый прерывистый	3–4	крупные темные
Кофейная кислота	8	локальная очаговая	быстрый прерывистый	3–4	крупные темные
Феруловая кислота	8,5	локальная очаговая	быстрый прерывистый	3–4	крупные темные
Смесь кислот	9	локальная очаговая	быстрый прерывистый	3	крупные темные

Высокую активность проявляли цитокинины, фенольные соединения и АБК. При обработке спор цитокинами был отмечен обильный и достаточно равномерный рост мицелия белого цвета, спороношение отсутствовало или сильно подавлялось, т. е. проявлялось характерное свойство цитокининов – способность их задерживать старение. В отличие от цитокининов, АБК и фенольные соединения индуцировали прерывистый и менее интенсивный рост мицелия серого цвета. Через 3–4 сут рост прекращался и наступало спороношение. Оно было обильным, а споры крупные и темные. Фитогормоны ИУК и ГК₃ слабо изменяли характер роста гриба и форму колоний. Период от прорастания до формирования новой споры сокращался незначительно в отличие от АБК и фенольных соединений, которые ускоряли его вдвое.

Последним этапом в изучении роли эндогенных регуляторов роста в индукции патогенеза грибом *D. teres* было определение фитопатогенных свойств и вирулентной способности вновь сформированных спор. Для этого растения ячменя сорта Зазерский 85 в возрасте двух листьев опрыскивали суспензией спор с инфекционной нагрузкой 5–8 тыс. спор/мл воды. Споры, сформированные на мицелии при выращивании на средах с добавлением АБК и фенольных соединений, отличались высокой жизнеспособностью и вирулентностью. Они

вызывали массовое и сильное поражение растений ячменя уже на 3–4-е сутки после поражения, тогда как споры, выращенные на средах с ИУК, ГК₃ и цитокининами, – только на 6–7-е сутки после инокуляции. Наиболее быстрый (3 сут) и сильный некроз листьев ячменя (70–100%) индуцировал смесь фенольных соединений (кофейная, феруловая и хлорогеновая кислоты).

В развитии гриба *D. teres* в культуре на среде Чапека можно выделить несколько этапов. Первый этап продолжался от споры до 10-дневного возраста. Он характеризуется медленным ростом и отсутствием в культуральной жидкости фитогормонов и фенольных соединений. Сказанное не означает, что в мицелии гриба полностью отсутствовали эндогенные регуляторы роста. Скорее всего, они находились в нем в минимальном количестве и целиком расходовались в процессах роста. Второй этап в развитии этого патогена начинается с 10-дневного возраста и заканчивается примерно на 25-е сутки. Он характеризуется интенсивным нарастанием биомассы и все возрастающим выделением в среду фитогормонов ИУК, гиббереллинов и цитокининов, достигающим максимума на 23-и сутки культивирования. Следует сказать, что в это время уровень ауксинов и гиббереллинов был весьма низким по сравнению с содержанием цитокининов, достигающим 450 мкг/л. Одновременно в этот период роста гриба отмечались малые максимумы в накоплении в культуральной жидкости АБК и фенольных соединений. Их роль не совсем ясна, но, по-видимому, это связано со сдерживанием (ограничением) роста мицелия, вызванного столь обильным накоплением в среде цитокининов. Третий этап в развитии гриба *D. teres* начинается с возраста 25 сут и заканчивается к 35 сут. Он характеризуется замедлением роста мицелия и выходом его на плато. В это время наблюдалось слабое снижение содержания ауксинов и гиббереллинов и резкое падение уровня цитокининов (в 4,5 раза). Одновременно этому предшествовал сильный рост в культуральной жидкости количества АБК и фенольных соединений. Столь выразительная картина в изменении уровня эндогенных регуляторов роста и приводит к торможению роста гриба. Четвертый и последний этап в развитии гриба *D. teres* непродолжительный. Он начинается с возраста 35 сут и заканчивается к 40 сут. Для него характерно ингибирование роста мицелия и начало спорообразования. Этому периоду предшествовало максимальное накопление в культуральной жидкости АБК (450 мкг/л), а несколько позже происходило неконтролируемое увеличение свободных и конъюгированных фенольных соединений, так как в это время практически полностью исчезали фитогормоны-стимуляторы (ИУК, гиббереллины и цитокинины).

Сопоставление роста мицелия гриба *D. teres* с накоплением в культуральной жидкости и мицелии эндогенных регуляторов роста, с одной стороны, фитотоксического действия и фитопатогенных свойств, обусловленных этими веществами на интактных растениях, с другой стороны, не оставляет сомнения о принадлежности АБК к индукторам спорообразования, а фенольных соединений к носителям фитотоксикоза и вирулентности.

Таким образом, эндогенные регуляторы роста фитопатогенных грибов можно отнести к косвенным и прямым факторам фитопатогенеза. Косвенная их роль сводится к реализации своего ростового процесса и формированию органов инфекционного поражения (конидиоспор). Прямое участие эндогенных регуляторов роста в фитопатогенном действии грибов связано с фитотоксикозом и вирулентностью этого процесса, осуществляемых с помощью АБК и фенольных соединений вместе с другими фитопатогенными факторами, к которым, как это неоднократно было показано [9, 10], относятся грибные ферменты и токсины.

1.2. Облигатные фитопатосистемы рожь – ржавчинные грибы *Puccinia dispersa* и *Puccinia graminis*

Выращивание ржавчинных грибов в культуре сопряжено с большими, подчас непреодолимыми, трудностями. Поэтому изучение метаболизма этих грибов проводят обычно не на самом мицелии, а на покоящихся и прорастающих уредоспорах.

Так поступили и мы, приступая к изучению фенольного комплекса ржавчинных грибов и выяснению роли этих веществ в фитопатогенезе. Целиком сосредоточиться на этом вопросе помогло и то, что к началу наших исследований роль фитогормонов в патогенезе была изучена на примере стеблевой ржавчины пшеницы [5]. Еще раньше были выяснены также и другие фитопатогенные факторы, включая многочисленные ферменты [10]. Оставалась вне поля зрения исследователей только возможность образования и выделения облигатными грибами токсинов. Такая возможность считалась маловероятной, так как облигатная фитопатосистема обеспечивает одновременное и успешное существование обоих организмов – растения и гриба.

Двумерное хроматографическое разделение водоспиртовых экстрактов растений ржи и уредоспор грибов *P. dispersa* и *P. graminis* позволило сопоставить состав флавоноидных гликозидов этих объектов (рис. 1.1). Он оказался весьма сходным. Экстракты растений ржи и уредоспор гриба содержали 7 однотипных флавоноидных гликозидов. В растениях ржи дополнительно выявлены 3 минорных гликозида.

Почти все флавоноидные гликозиды уредоспор и растений ржи оказались С-гликозидами апигенина и лютеолина и их О-производными. Среди них идентифицированы виценин-2, сапонарин, виомин, витексин и изовитексин. Исключение составлял гликозид 8, который на бумажных хроматограммах в УФ-свете при λ 254 нм проявлялся в виде темного пятна, которое в видимом свете приобретало красноватый оттенок. Оно в УФ-свете имело один максимум поглощения в области 260 нм и плечо при 320 нм, что характерно изофлавоновому гликозиду генистину. Аналогичный спектр имел коммерческий препарат генистина (рис. 1.2).

Любопытно, что изофлавоновые гликозиды совсем не характерны злакам (11). Присутствие их в уредоспорах ржавчинных грибов представляет большой ин-

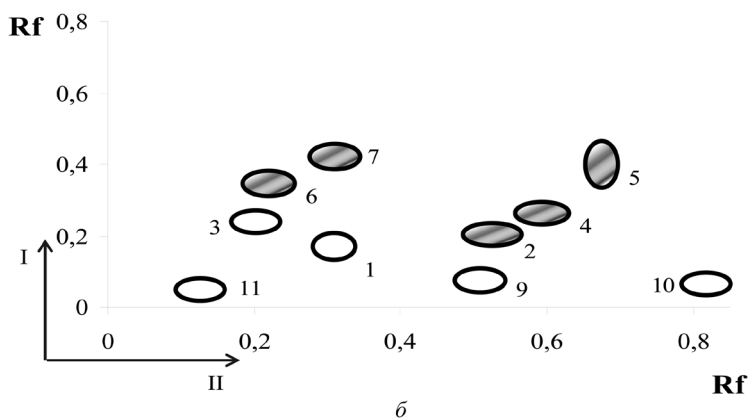
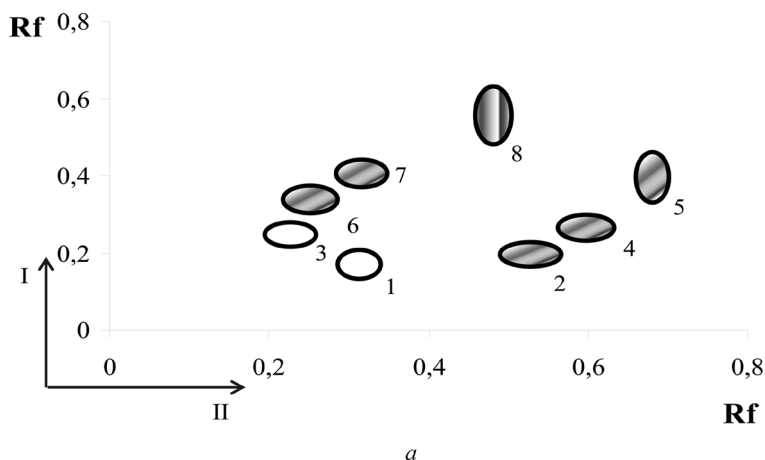


Рис. 1.1. Схема двумерной хроматограммы флавоноидных гликозидов уредоспор *P. dispersa* и *P. graminis* (а) и растений ржи (б). I – растворитель: изобутанол – уксусная кислота – вода (3:1:1); II – растворитель: 5%-ная уксусная кислота. (2 – виценин-2; 4 – сапонарин; 5 – виомин; 6 – витексин; 7 – изовитексин; 8 – генистин; 1, 3, 11 – неидентифицированные гликозиды апи-генина; 9, 10 – неидентифицированные гликозиды лютеолина)

терес, так как не исключается его выделение в ткани ржи при инфицировании ее этими грибами.

Содержание флавоновых гликозидов в растениях ржи и спорах грибов колебалось в широких пределах (табл. 1.6).

Суммарное количество их в растениях ржи было почти на порядок выше, чем в спорах грибов. В то же время оно было значительно больше в спорах гриба *P. dispersa* по сравнению со спорами гриба *P. graminis*. Основным гликозидом в растениях был виомин. Его содержание достигало 67% от суммы всех гликозидов, тогда как в уредоспорах ржавчинных грибов основным компонентом был изофлавоновый гликозид генистин, количество которого в спорах грибов *P. dispersa* и *P. graminis* составляло 43 и 38 % соответственно.

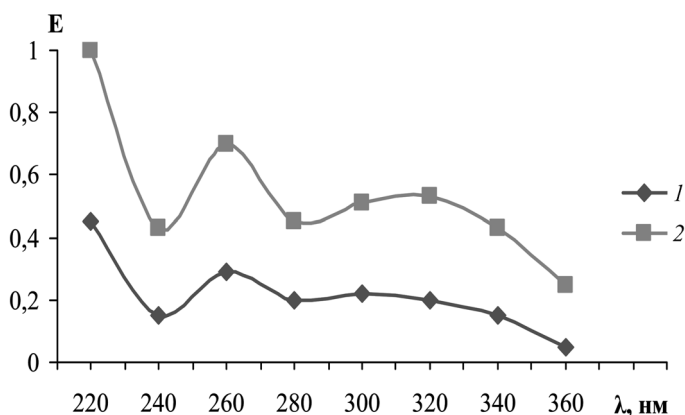


Рис. 1.2. УФ-спектр коммерческого препарата генистина (1) и обнаруженного в уредоспорах грибов *P. dispersa* и *P. graminis* изофлавонового гликозида № 8 (2)

Таблица 1.6. Сравнительное содержание флавоноидных гликозидов в растениях ржи сорта Пуховчанка и уредоспорах ржавчинных грибов *P. dispersa* и *P. graminis*

Флавоноидный гликозид	Содержание, мкг/г сухой массы		
	Рожь	<i>P. dispersa</i>	<i>P. graminis</i>
Апигенин-гликозид-1	63,5	30,8	18,7
Апигенин-гликозид-2	31,9	31,5	29,0
Виценин-2	следы	14,7	18,0
Сапонарин	234,0	36,0	30,3
Виомин	1689,0	111,6	77,0
Витексин	47,0	25,2	18,7
Изовитексин	260,0	34,4	следы
Генистин	–	209,0	119,0
Лютеолин-гликозид (9)	104,3	–	–
Лютеолин-гликозид (10)	68,4	–	–
Апигенин-гликозид (11)	20,0	–	–
Сумма	2518,1	493,2	310,7

Принимая во внимание важное значение фенольных соединений в процессах иммунного ответа [2] и узнавания [12], общие и специфические особенности фенольных соединений ржавчинных грибов заслуживают особого интереса. Полученные результаты исследований позволяют предположить, что в основе специализации фитопатогенов лежат общие особенности обмена веществ. Чем ближе обмен веществ растения-хозяина и его патогена, тем уже специализация возбудителя. Флавоноидный комплекс ржавчинных грибов как бы в миниатюре повторяет аналогичный комплекс растения-хозяина. Следовательно, специфика флавоноидного комплекса ржавчинных грибов невелика. В уредоспорах этих грибов обнаружен только один компонент, который отсутствует в растениях ржи, а именно генистин. По содержанию он является основным в спорах обоих видов ржавчинных грибов. Согласно существую-

щим представлениям [13], любое чужеродное вещество, попавшее в ткани другого живого организма, ведет себя как токсический агент. Не исключено, что при прорастании уредоспор на поверхности листьев ржи водорастворимый гликозид генистин накапливается в капле жидкости, а в последующем может оказаться в тканях растения. В таком случае он может выступать в качестве сигнального вещества и токсина одновременно.

Роль флавоноидных гликозидов во взаимодействии облигатных фитопатогенных грибов и растений не выяснена. Есть основание ожидать, что функции фенольных соединений в облигатных фитопатосистемах будут изменяться или, по крайней мере, частично корректироваться ввиду того, что питание гриба осуществляется за счет готовых метаболитов растения-хозяина. Следуя сказанному, выделяли с помощью накопительной бумажной хроматографии флавоноидные гликозиды из растений ржи (сорт Калинка) и уредоспор *P. dispersa*, очищали от возможных примесей и использовали в опытах по действию их на прорастание спор и растяжение ростковых трубок гриба, а также на рост проростков и содержание хлорофилла в листьях ржи. В экспериментах использовали невысокие экзогенные концентрации флавоноидных гликозидов, выделяемых растениями ржи на поверхность листьев [14], и эндогенные концентрации, характерные самим растениям ржи. Флавоноидные гликозиды в экзогенной концентрации (от 0,39 до 5,0 мкг/мл) в основном ингибировали прорастание спор гриба *P. dispersa*. Особенно активны были апигенин-гликозид 2 и изовитексин, подавляющие прорастание спор на 42–58 % (табл. 1.7).

Таблица 1.7. Влияние экзогенных флавоноидных гликозидов ржи на прорастание уредоспор и растяжение ростковых трубок гриба P. Dispersa

Природа гликозида	Концентрация вещества, мкг/мл	Прорастание уредоспор		Длина ростковых трубок	
		шт.	%	мк	%
Контроль (вода)	–	38,6	100	47,8	100
Апигенин-гликозид 1	0,65	37,7	97	61,1	129
Апигенин-гликозид 2	0,68	16,2	42	36,5	86
Виценин-2	0,39	35,4	92	69,3	147
Сапонарин	0,70	30,4	79	54,3	115
Виомин	5,0	27,3	71	67,8	143
Изовитексин	0,4	22,9	58	53,2	113
Суммарный препарат	12,0	17,2	44	64,3	135

В то же время гликозиды стимулировали растяжение ростковых трубок. Единственное исключение составлял апигенин-гликозид 2, который снижал длину ростковых трубок. Суммарный препарат экзогенных флавоноидных гликозидов подавлял прорастание спор на 56% и одновременно активировал растяжение ростковых трубок на 35%.

Эндогенная концентрация флавоноидных гликозидов ржи была на несколько порядков выше, чем экзогенная. Это позволяло оценить активность одних

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие (А. П. Волынец)	3
Введение (А. П. Волынец)	5
Глава 1. Эндогенные регуляторы роста и фитопатогенез (А. П. Волынец, <u>Н. В. Полякова</u> , Н. П. Башко)	9
1.1. Факультативная фитопатосистема: ячмень – гриб <i>Drehslera teres</i>	9
1.2. Облигатные фитопатосистемы рожь – ржавчинные грибы <i>Puccinia dispersa</i> и <i>Puccinia graminis</i>	15
Глава 2. Эндогенные регуляторы роста в процессах формирования патосистемы: ячмень – возбудитель сетчатого гельминтоспориоза (<u>Н. В. Полякова</u>)	31
Глава 3. Состояние окислительных процессов и антиоксидантная активность при развитии патогенеза культурных злаков (Е. Л. Недведь)	59
3.1. Окислительные процессы злаков при патогенезе	60
3.2. Антиоксидантная активность злаков при патогенезе	61
Глава 4. Биохимические особенности формирования хлорозного и некротического типов защитных реакций ржи от ржавчинной инфекции (Е. В. Мельникова, Л. А. Корытько)	65
4.1. Роль абсцисовой кислоты в формировании некротической и хлорозной защитных реакций	67
4.2. Изменение активности пероксидазы в динамике развития защитных реакций	71
4.3. Изменение содержания свободных аминокислот в процессе развития защитных реакций	73
4.4. Роль протеолитических ферментов в защитных реакциях ржи против ржавчинной инфекции	77
Глава 5. Эндогенные фенольные соединения – компоненты естественного фитоиммунитета (А. П. Волынец)	86
5.1. Фенольный комплекс культурных злаков и фитопатогенных грибов	87
5.2. Влияние грибной инфекции на содержание фенольных соединений в растениях злаков	90
5.3. Основные направления и способы реализации защитного действия фенольных соединений	94
Глава 6. Структурные основы системы иммунитета злаков (В. В. Карпук)	100
6.1. Представления о фитоиммунитете как эволюционной ветви биологического феномена	100
6.2. Специализация фитопатогенов к растениям-хозяевам	104
6.3. Структурно-функциональные исследования патогенеза и устойчивости растений	107
6.4. Генетическая детерминированность взаимоотношений растений и патогенов	111

6.5. Молекулярная природа и функционирование наследственных детерминант вирулентности патогенов и резистентности хозяев	115
6.6. Фитоиммунитет: двухтактный рабочий механизм	120
6.7. Локальная и системная индуцированная устойчивость	124
6.8. Структурная организация системы иммунитета у растений	127
6.9. О развитии и использовании исследований по фитоиммунитету	132
Глава 7. Повышение физиологической активности эндогенных регуляторов роста при совместном использовании их на культуре злаков (В. П. Шуканов, А. П. Вольнец, Н. Е. Манжеселесова)	156
7.1. Рост растений злаков	156
7.2. Устойчивость растений злаков к грибным болезням	161
7.3. Продуктивность злаков	163
7.4. Изменение физиолого-биохимических процессов злаков	165
Глава 8. Взаимодействие эндогенных регуляторов роста в осуществлении физиологических реакций злаков (Н. Е. Манжеселесова, А. П. Вольнец)	169
8.1. Влияние фиторегуляторов и их смесей на рост и морфологические особенности культурных злаков	172
8.2. Сравнительное действие природных регуляторов роста и их смесей на устойчивость растений к фитопатогенным грибам	176
8.3. Влияние природных регуляторов роста и их смесей на физиолого-биохимические процессы злаков	181
8.4. Взаимодействие природных регуляторов роста в процессах формирования урожая	185
Глава 9. Защитно-стимулирующие составы в оздоровлении злаков от грибных болезней (А. П. Вольнец, В. П. Шуканов, <u>Н. В. Полякова</u>), Н. Е. Манжеселесова, Л. А. Корытько, С. Н. Полянская)	189
Глава 10. Перспектива применения экологически безопасных композиционных составов для повышения болезнеустойчивости сеянцев хвойных пород в лесных питомниках (В. П. Шуканов, Н. Е. Манжеселесова, А. П. Вольнец, Л. А. Корытько, <u>Н. В. Полякова</u>), С. Н. Полянская)	199
Глава 11. Использование композиционных составов с ретардантом терпалом на посевах льна-долгунца с целью повышения урожая и качества волокна (В. П. Шуканов, Н. В. Полякова, Н. Е. Манжеселесова, Л. А. Корытько, И. А. Голуб, Г. Н. Шанбанович, Н. С. Савельев)	220
Глава 12. Регуляторные основы стрессоустойчивости растений (А. П. Вольнец)	230
12.1. Физиологическое действие гербицидов на регуляторный комплекс растений	230
12.2. Грибная инфекция и эндогенные регуляторы роста растений	235
12.3. Эндогенные регуляторы роста растений в условиях экологического стресса	240
Заключение (А. П. Вольнец)	249

Научное издание

Волынец Александр Потапович
Шуканов Владимир Петрович

Полякова Надежда Викторовна и др.

**ФИЗИОЛОГИЯ ПАТОГЕНЕЗА
И БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

Редактор *Т. С. Климович*
Художественный редактор *И. Т. Мохнач*
Технический редактор *О. А. Толстая*
Компьютерная верстка *Н. И. Кашуба*

Подписано в печать 19.02.2016. Формат 70 × 100^{1/16}. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 20,64. Уч.-изд. л. 17,3. Тираж 100 экз. Заказ 43.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.