

На правах рукопису

РУБЕЖНЯК

Ірина Георгіївна

ФІТОТОКСИЧНІ МЕТАБОЛІТИ *BOTRYTIS CINEREA* PERS.
УТВОРЕННЯ, ВЛАСТИВОСТІ, БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

03.00.07 - мікробіологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Наукові керівники:
доктор біологічних наук
О.М. ЗАЙЧЕНКО
доктор біологічних наук
Л.П. ТРОШИН



00754103 (K)

НАН України

Інститут фізіології і систематики мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного

Наукові керівники:

доктор біологічних наук О.М.Зайченко,

доктор біологічних наук Л.П.Трошин

Офіційні опоненти:

Доктор біологічних наук Л.Д.Варбанець

Кандидат біологічних наук І.П.Місюренко

Провідна установа:

Український аграрний університет МСГ і П України

Захист дисертації відбудеться "21" вересня 1994 р.
в 10⁰⁰ годин на засіданні спеціалізованої ради Д 016.06.01 при
Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного АН
України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 154

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту
мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного АН України

Автореферат розісланий "10" липня 1994 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Л.М.Пуриш Л.М.Пуриш

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

В С Т У П

Актуальність проблеми. *Botrytis cinerea* Pers. повсюдно поширений в природі, але зустрічається переважно в регіонах з вологим кліматом. Він є факультативним паразитом і уражує понад 200 видів культурних та дикоростучих рослин з різних родин, а саме - пасльонових, бобових, зонтичних, хрестоцвітних, складноцвітних, у яких викликає скручування та опадання листя, квітів, гниття плодів. Хвороба розвивається не лише в період вегетації, але й після збирання врожаю. *B. cinerea* є найбільш агресивним збудником кагатної гнилі капусти, гнилі цукрових буряків та моркви.

Серед факторів ураження гриба найчастіше відмічають його високу ферментативну активність - пектолітичну, амілолітичну, протеолітичну (Рубін, 1953; Picci, 1965; Domsch, Gams, 1969; Urbanek et al., 1978), а також здатність до утворення шавелевої, лимонної та ряду інших органічних кислот (Рубін та ін., 1964; Kamoen et al., 1974), деяких антибактеріальних речовин, таких як ботридіаль (Fehlhaber et al., 1974;), фітотоксичних полісахаридів (Аксьонова, 1962; Аксьонова та ін., 1964; Vannel, 1991).

Однак, такі дослідження виконані переважно на окремих штаммах і не дають чіткого уявлення про токсигенний потенціал виду в цілому.

Лишається не з'ясованим механізм фунгістатичної та в більшості випадків фітотоксичної дії, не досліджена токсикологія виду та його потенційна загроза для довкілля. Актуальною залишається розробка методів виділення фітотоксичних метаболітів (ФТМ) *B. cinerea*. Їх ідентифікація та можливе використання в селекції рослин *in vitro*.

Мета та завдання роботи. Метою даної роботи було вивчення ФТМ *B. cinerea*, особливості їх утворення, властивостей та біологічної активності.

Досягнення поставленої мети передбачало вирішення ряду конкретних завдань:

- вивчити токсигенний потенціал штамів, виділених з різних джерел;
- відібрати на основі одержаних даних найбільш активні

культури:

- розробити метод виділення ФТМ, вивчити їх деякі фізико-хімічні властивості та біологічну активність, включаючи можливість використання цих речовин як селективних маркерів при виведенні резистентних сортів рослин;

- вивчити деякі аспекти механізму фітотоксичної дії виділених метаболітів.

Основні положення, які виносяться на захист. Виконання поставлених завдань дало можливість сформулювати ряд положень, основні з яких виносяться на захист:

1. Досліджувані штами *V. cinerea* характеризуються ідентичним компонентним складом, а відмінності, що спостерігаються, мають кількісний характер.

2. З культуральних фільтратів *V. cinerea* 109815 виділено в кристалічному вигляді дві речовини. На основі порівняльного аналізу одержаних даних та даних, що є в літературі, можна стверджувати, що речовина D₁ є новим, раніше невідомим для цього гриба, фітотоксичним метаболітом.

3. Вперше показано, що ФТМ *V. cinerea* можуть бути використані як селективні агенти при одержанні резистентних сортів винограду за допомогою методу культури тканини *in vitro*.

Наукова новизна роботи полягає в тому, що:

- вперше з використанням значного числа штамів вивчений токсигенний потенціал *V. cinerea*. Показана ідентичність компонентного складу токсичних метаболітів досліджуваних штамів;

- відпрацьовані умови синтезу ФТМ, в тому числі ¹⁴C-ФТМ, найбільш активними штамми;

- проведена часткова ідентифікація окремих компонентів фітотоксичного комплексу *V. cinerea*. Виділені речовини різняться від відомих раніше;

- вивчена антибіотична та фітотоксична активність ФТМ *V. cinerea*;

- фітотоксична активність метаболітів *V. cinerea* пов'язана з їх дією на синтез пігментів, що, напевне, визначається пригніченням синтезу білка;

- вперше показана принципова можливість використання ФТМ *V. cinerea* для селекції резистентності винограду *in vitro* до цього гриба.

Практичне значення роботи полягає в тому, що вивчення

токсигенних властивостей штамів *V. cinerea* дає можливість реально оцінити потенційну небезпеку цих грибів для сільськогосподарського виробництва.

Вивчення ФТМ *V. cinerea* та особливостей їх дії на рослину відкриває широку перспективу використання їх для селекції резистентних сортів рослин, що уражаються цим грибом.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на конкурсі фундаментальних робіт Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного АН України (Київ, 1994).

Публікація результатів досліджень. По матеріалам дисертації опубліковано 7 друкованих праць.

Структура та об'єм роботи. Дисертація включає вступ, огляд літератури, експериментальну частину, що містить 6 глав, обговорення результатів, висновків та список цитованої літератури.

Робота викладена на 126 сторінках машинописного тексту (обліковий текст - 88 сторінок), включає 5 таблиць, 30 малюнків, а також бібліографічний покажчик з 119 джерел, в тому числі 99 робіт іноземних авторів.

З М І С Т Р О Б О Т И

Глава 1. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ *Botrytis cinerea* Pers. (огляд літератури)

В даній главі, яка включає 4 розділи, наводиться загальна характеристика метаболітів *V. cinerea* та їх біологічна активність. Розглядаються деякі особливості біології гриба, його поширення в природі, деякі аспекти виділення, хімічної будови та властивостей токсичних речовин. Розглядаються гіпотези механізму патогенезу *V. cinerea*.

Один з розділів присвячений використанню токсинів грибів в методиці культури тканини для одержання резистентності до хвороб.

Підкреслюється недостатність відомостей щодо біології *V. cinerea* та його токсичних сполук. Наводиться критичний аналіз літературних даних в досліджуваній проблемі. Окреслюються перспективні напрямки досліджень.

Глава 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єкти досліджень. В цьому дослідженні було використано 25 штамів *B. cinerea*. Стисла їх характеристика наводиться в таблиці 1.

Виділення та ідентифікація культур грибів виконувалась різними дослідниками, і в наше розпорядження вони були надані, головним чином, з музею відділу фізіології та систематики мікроскопів ст. науковим співробітником І.О.Еланською. Штам 109815 був одержаний з лабораторії біотехнології Інституту винограду і вина "Магарач" УАНН (Ялта).

Методи культивування. Досліджувані штами *B. cinerea* культивували в залежності від поставленої мети поверхневим або ж глибинним способом. Штами *B. cinerea* в більшості випадків культивували в колбах Ерленмейера на 0,7л, які містили 0,1 л рідкого середовища, що включало виноградне сусло, розведене вдвічі водою, рН 5,8 (за винятком випадків, обумовлених окремо). Вирощування проводили при температурі 26-28°C на протязі 12 діб, що відпрацьовувалось в попередніх експериментах.

Засів проводили суспензією конідій, одержаних шляхом зливу відповідної культури 10 добового віку на виноградному сусло-агарі стерильною водопровідною водою. Густина засіву - 2 x 10⁷ конідій/мл.

В динаміці культивування досліджуваних штаків визначали: біомасу (ваговим методом після висушування її при 105°C до постійної ваги), вихід ФТМ (ваговим методом після очистки). Продуктивність процесу токсинування за досліджуваний період розраховували за допомогою одержаних параметрів і виражали в мг/г міцелію.

Хлореллу культивували глибинним способом на качалці (в темновому режимі або ж при освітленні 4000лк) за методикою, запропонованою Zaichenko et al. (1989).

Фізико-хімічні методи аналізу. Для вивчення фізико-хімічних характеристик індивідуальних компонентів ФТМ *B. cinerea* використовували ряд загальноживих методів.

Вміст окремих елементів визначали за допомогою якісних реакцій (сірка, галогени), а також мікроаналітичних кількісних методів (вуглець, водень, азот)/Чероніс/.

Н-ЯМР спектри реєстрували за допомогою ЯМР-спектрометра

Список досліджуваних штамів *Botrytis cinerea*

№ п/п	№ штамів	Рік та місце виділення
1.	16093	1991, насіння соняшника, Укр.НДІЗР
2.	16094	1990, озима пшениця, стебло, Укр.НДІЗР
3.	127	1991, пшівітря, Ташметрополітен, Узбекистан
4.	107	1991, ґрунт, глибина 5-15 см, Київська обл.
5.	3л	1984, луска цибулі, плодоовочева база, Київ
6.	2389	1991, ґрунт, лісгосп, Ново-Шепелічі, Київська обл., 10 км зона ЧАЕС
7.	2258	1990, ґрунт, Київська обл.
8.	2356	1991, лісовий ґрунт, глибина 8-10 см, Рожни, Київська обл., 10 км зона ЧАЕС
9.	73600	1991, листки каштану кінського (опад), Київ
10.	2246	1986, ґрунт, глибина 5 см, очисні споруди, м. Саки, Республіка Крим
11.	2358	1991, лісовий ґрунт, глибина 8-10 см, Чистоганівка, Київська обл.
12.	2219	1991, ґрунт, лісгосп, Ново-Шепелічі, Київська обл., 10 км зона ЧАЕС
13.	16083	1990, стебло томатів, ВДНГ, Київ
14.	15809	1983, вегетуючі рослини цукрового буряка, Укр.НДІЦБ
15.	2307	1989, луска цибулі, плодоовочева база, Київ
16.	15970	1986, прищепа винограду, Молдова
17.	15969	1986, стебло огірків, тепличне господарств "Совки", Київська обл.
18.	109815	1972, листя винограду, Республіка Крим
19.	15973	1986, цибуля ріпчаста, плодоовочева база, Київ
20.	16063	1990, основа стебла сорго, Молдова
21.	16052	1990, ґрунт ризосфери шалфею, ЦРБС АНУ, Київ
22.	б/и	1991, женьшень, Воярка, Київська обл.
23.	гр.7, уч. 1	1991, " " " " " "
24.	гр.1, лис80	1991, " " " " " "
25.	гр.64, уч.1	1991, " " " " " "

"Jeol" FX-60 (H-100.1 MHz, (CD₃)₂CO) з використанням як внутрішнього стандарту флюорокеросину при температурі 22°C.

Якісний моносахаридний склад зразків вивчали за допомогою методу газо-рідинної хроматографії (ГРХ) у вигляді ацетатів поліолів. Обробку зразків проводили згідно Albersheim (1976). Аналіз здійснювали на газовому хроматографі "Chrom-5" (Чехія) з полуменево-іонізаційним детектором на колонці (3.0 x 1.2 мм) з 3%-ним неопентилгліколь-сукцинатом на хромосорбенті W (60-80 меш) в режимі хроматографії 170-200°C (5° с/хв).

Для визначення амінокислотного складу зразки гідролізували 6N HCl на протязі 20 годин, після чого визначали на амінокислотному аналізаторі "Biotronik" LC-5001 (Германія).

Біохімічні методи аналізу. Досліджувані пігменти (хлорофіли а і в, каротиноїди) екстрагували абсолютним ацетоном, а їх вміст розраховували за рівняннями, складеними на основі експериментально одержаних питомих коефіцієнтів Хольма-Веттштейна (Полевой, Максимова, 1979) з використанням спектрофотометра "Beckman" DU 8B (Австрія). Всі визначення проводили через 30 год. після посіву, що відповідало середині логарифмічної фази росту клорелли в умовах експерименту. В окремих дослідах відпрацьовувались діючі концентрації ФТМ. Про дію ФТМ на синтез білка і нуклеїнових кислот судили по включенню ³H/-лейцину (40 МБк, 1080 мкCi) /"Ізотоп", С-Петербург/ та 2-¹⁴C-аденіну (40 МБк, 1097 мкCi) /ИТА ИЗОТОП ИНТЕЗЕТЕ, Budapest/, відповідно. При цьому використовували методику, наведену в роботі Рязанової з співр. (1982).

Радіоактивність зразків на фільтрах "Synpor" N 6 /Чехія/ вимірювали за допомогою рідинного скінтіляційного спектрофотометра "Beckman" 8700 /Австрія/. Суміш ЖС-1 використовувалась як скінтіляційна рідина.

Поглинання ¹⁴C-ФТМ клітинами *Chl. vulgaris* вивчали, використовуючи метод, запропонований Roder, Grafe (1985), з деякими нашими модифікаціями, який передбачає використання мічених метаболітів.

¹⁴C-ФТМ одержували шляхом культивування *V. sinerea* в стандартних умовах з додаванням в середовище 1-¹⁴C-ацетату (80 МБк, 2160 мкCi) /Ізотоп, С-Петербург/ з активністю 216 мкCi/мл, який вносили на 4-у добу культивування. Сумарна активність препарату ФТМ, виділеного з культуральних фільтратів *V. sinerea*, складала

1.47 x 10⁶ імп/хв (22.4 мг).

Методи вивчення біологічної активності. Про біологічну активність виділених препаратів ФТМ судили на основі вивчення їх антибіотичних та фітотоксичних властивостей. Препарати ФТМ розчиняли в етанолі таким чином, щоб кінцева концентрація їх в досліджуваних системах не перевищувала 0.1%.

В цьому дослідженні було використано 2 штами фітопатогенних бактерій (*Erwinia carotovora* sub.sp. *carotovora* 8982 та *Clavibacter michiganense* 13), 15 штамів дріжджів, які належать до 14 видів і 8 родів, а також 28 штамів грибів, що відносяться до 23 видів і 11 родів. Серед них були як фітопатогенні, так і токсигенні для людини та тварин види.

Оцінка фітотоксичної активності досліджуваних препаратів проводилась за методом дисків з використанням тест-системи *Chl. vulgaris* 62 (Білай, 1982). Поруч з цим, фітотоксичну активність метаболітів *B. cinerea* оцінювали при використанні ряду вищих рослин - представників різних родин, - як тест-об'єктів, а також культури тканини винограду *in vitro*. Вихідним матеріалом для одержання культури калусної тканини слугували інтенсивно ростучі пагони винограду, які після стерилізації діюцидом висаджували на безгормональне середовище Murashige-Scoog (1962) з додаванням гмату натрію (10 мг/мл). Висаджені експлантанти культивували при 23-28°C і освітленості 2000-2500 лк.

Вихідним матеріалом для одержання калусної тканини винограду слугували 30-40-добові пагони довжиною 4-5 см. Калус вирощували з черешка листка рослини винограду в чашках Петрі на середовищі Schenka-Hildebranta (1872) при 28°C без освітлення. Через 30-40 діб первинний калус пересаджували на свіже середовище і культивували в тих же умовах. Характеристикою росту слугував приріст тканини за 3 тижні, який розраховували за формулою (в %):

$$W = [(W_z - W_0) / W_0] \cdot 100$$

де W_z - кінцева маса калуса, а

W_0 - початкова маса калуса.

Глава 3. ВИВЧЕННЯ ДЕЯКИХ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ТА ТОКСИГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ДОСЛІДЖУВАНИХ ШТАМІВ

В літературі вкрай мало даних щодо токсичних метаболітів *B. cinerea*. Такі дослідження, як правило, виконувались на окремих штаммах (Fehlhaber et al., 1974; Welmar et al., 1979; Bradshaw et al., 1980; Culter et al., 1988) і не дають достатніх підстав для судження про токсигенний потенціал виду в цілому.

На першому етапі ставилось завдання порівняльної оцінки токсигенних, а також деяких інших властивостей досліджуваних штамів (вихід біомаси і суми позаклітинних метаболітів та ін.).

Компонентний склад фітотоксичних речовин вивчали, користуючись методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) в системах ефір:толуол (1:1) та ефір:ацетон (11:1).

Результати цієї частини досліджень коротко можна сформулювати так:

- біомаса досліджуваних штамів змінюється в межах від 5,0 до 9,6 г/л, хоч для більшості з них межа цих коливань істотно вужча (6,2 - 7,9 г/л);

- вихід токсичних метаболітів характеризується певною стабільністю для більшості штамів (67 -174 мг/л), в той час як шт. 16083, 2307 та гр.7 уч.1 утворюють ФТМ на рівні 204-205 мг/л, а шт. 2358, 15969 і особливо 15970, характеризуються дуже високим виходом ФТМ (859 мг/л);

- для шт. 2358 та 15970 характерна висока продуктивність процесу токсинуотворення (84,7 та 113,6 мг/л, відповідно);

- вихід ФТМ корелює з їх високою токсичністю щодо *Chl. vulgaris*;

- шт. 16093, 15973, 16063 та 16052 виявляють високу активність препаратів як з міцелію, так і з культуральних фільтратів. Не спостерігається будь-якого взаємозв'язку між утвореною біокасою, виходом токсину та джерелом виділення штамів, хоч всі високоактивні з них, відібрані для подальших досліджень, були виділені з філосфери різних рослин.

Дослідження компонентного складу ФТМ міцелію та культуральних фільтратів методом ТШХ виявляє строгу постійність їх якісного складу. В той же час, спостерігаються суттєві

відмінності в кількісному вмісті окремих компонентів. Так, ФТМ мицелію у всіх без винятку штамів представлена 9 компонентами, серед яких речовини з Rf 0.18; 0.30 та 0.72 (ефір:толуол, 1:1) характеризувались високим вмістом. В той же час, в системі ефір: ацетон (11:1) виявляється 11 компонентів, а за кількісним вмістом суттєво виділяються компоненти з Rf 0.76 та 0.92.

ФТМ з культуральних фільтратів виявляє високій вміст компонентів з Rf 0.18; 0.30; 0.50; 0.72 (ефір:толуол, 1:1), а в системі ефір: ацетон (11:1) - 0.19 і 0.76:

- середовище з виноградним суслом забезпечувало більш високу активність препаратів з шт.15973. Більш висока активність препаратів з штамів 16093 та 15973 може бути пов'язана з підвищенням синтезом більш активних компонентів, про що свідчать і хроматографічні дані:

- компонентний склад препаратів ФТМ як з мицелію, так і культуральних фільтратів характеризується строгою постійністю на всіх досліджуваних середовищах, в той час як кількісний вміст окремих речовин суттєво змінюється (мал.1):

- глибинне культивування досліджуваних штамів забезпечує більш низький рівень синтезу ФТМ, а термін одержання максимального виходу не дає істотного виграшу. Стабільність компонентного складу препаратів ФТМ зберігається, хоч різниця в їх кількісному вмісті суттєво вища.

Строга постійність якісного складу ФТМ в мицелії і культуральних фільтратах при різних способах культивування та на різних середовищах, з певними застереженнями, дає нам підстави розглядати цю властивість як видову ознаку *V. cinerea*.

ФТМ *V. cinerea*, про що свідчить аналіз кривих росту та біосинтезу, не є типовими вторинними метаболітами, оскільки утворення їх корелює з періодом активного росту мицелію.

Глава 5. ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОЇ ПРИРОДИ ТОКСИЧНИХ МЕТАБОЛІТІВ *V. CINEREA*

Як вже зазначалось раніше, набір вивчених біологічно активних сполук *V. cinerea* обмежується ботридіалем та його похідними, мікоспорином-2, цінереарином і деякими іншими речовинами. В той же час, виключно широкий спектр рослин, а також різноманітність ушкоджуючих ефектів гриба дають підстави

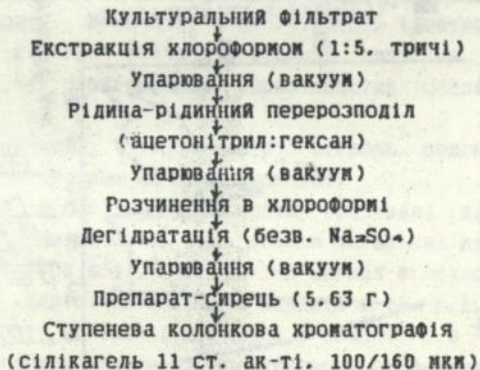
передбачати наявність суттєво більшого арсеналу метаболітів, причетних до патологічного процесу. Є думка, що існуючі обмеження в значній мірі визначаються недостатністю наших знань в цьому питанні.

В намаганні ліквідувати цей недолік ми здійснили серію досліджень щодо виділення з *V. cinerea* сполук, які мають фітотоксичну дію.

В попередніх дослідженнях було показано, що культуральні фільтрати *V. cinerea* 109815 виявляють фітотоксичну дію лише при значній їх концентрації, що вказувало на незначний вміст активних метаболітів.

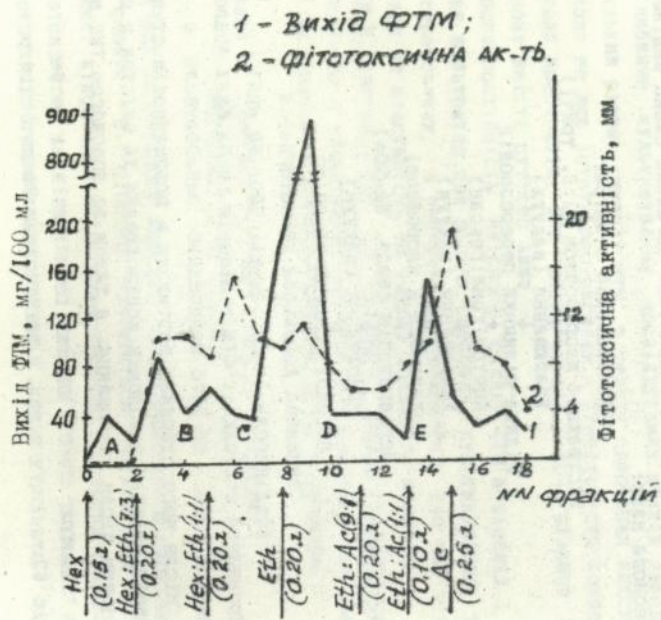
З іншого боку, виділення полісахаридних фракцій також не дало бажаних результатів, оскільки всі препарати, одержані за методом Vannel et al. (1991), не виявляли фітотоксичної активності щодо *Chl. vulgaris*. В цій ситуації для виділення активних сполук нами був використаний принципово новий підхід.

5.1 Виділення ФТМ. Для екстракції ФТМ використовували бл культурального фільтрату *V. cinerea* 109815, одержаного на 7 добу вирощування. Нижче наводиться загальна схема виділення ФТМ, запропонована нами:

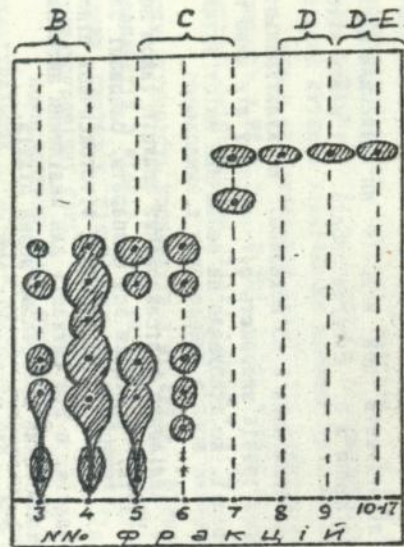


Процедура екстракції ФТМ з мицелію гриба була аналогічною, за винятком того, що його попередньо заморожували в рідкому азоті, після чого старанно розтирали в порцеляновій ступці.

Вихід фракцій з колонки контролювали за вмістом в них суших речовин після упарювання, а також за допомогою ТМХ на пластинках "Silufol" UV 254 (Kavallier, Чехія) і тест-системи *Chl. vulgaris* 62. Поруч з цим, здійснювали УФ-детекцію речовин, що



Мал.2. Профіль елюції ФТМ *B. cinerea* 109815.



Мал.3. Біоавтограма окремих фракцій ФТМ *B. cinerea* 109815

● ЗОНА ЗАТРИМКИ РОСТУ *chl. vulgaris* 62.

дають специфічне свічення при 254 мк.

Візуалізацію плям на ТМХ-пластинках здійснювали шляхом обприскування їх 5%-ним розчином ФМК в етанолі.

Характерний профіль елюції метаболітів *B. cinerea* 109815 наведений на мал.2, в якому проглядається 5 чітких піків вністу речовин (А, В, С, D та Е). Фракція А не виявляла біологічної активності і в подальшому не досліджувалась. Фракції В, С, D та Е проявляли різного ступеня біологічну активність щодо *Chl. vulgaris*.

Менш полярні активні фракції хроматографічно досліджувались в системі ефір:толуол (1:1), а більш полярні - в системі ефір:ацетон (11:1). Біоавтографія одержаних фракцій показала, що активність в системі ефір:толуол (1:1) виявляли речовини з Rf 0.43; 0.50; 0.60 та 0.74; малоактивними виявились речовини з Rf 0.18; 0.20 та 0.30. В іншій системі активність виявили лише речовини з Rf 0.76 та 0.92 (мал.3).

Шляхом кристалізації з діетилового ефіру в кристалічному вигляді були одержані 2 індивідуальні речовини: В₂ та D₂ з виходом - 80 та 40 мг, відповідно.

5.2 Дякі фізико-хімічні та спектральні характеристики виділених сполук. В зв'язку з необхідністю ідентифікації метаболітів *B. cinerea* 109815 проводили вивчення ряду фізико-хімічних та спектральних характеристик одержаних речовин (див. гл.2).

Було показано, що вони містять вуглець, водень, кисень та азот. Сірка і галогени не були виявлені.

Наступна ¹H-ЯМР спектроскопія вказувала на структурну спорідненість цих речовин, які давали загальний дублетний сигнал в області 6.28 м.д., синглетний сигнал в області 4.59 м.д. та загальний кватетний сигнал в області 2.15 м.д. Реєструвались відмінності речовин в сигналах в області 3.0 - 4.4 м.д.

Співставлення одержаних спектральних характеристик з еталонними вказувало на можливість віднесення цих речовин до сполук глікозидної природи. При цьому предбачалось, що аґліконові фрагменти досліджуваних речовин різняться. У випадку речовини В₂ він представлений стероїдною структурою, що згодом було підтверджено за допомогою реакції Лібермана-Буркарда (Філіпович та ін., 1975), а у випадку D₂ - речовиною білкової природи, на що вказувала і прсба з нінгідринон.

Наступну роботу проводили з речовиною D₇. Вивчення моносахаридного складу показало, що віднесення її до глікозидів виявилось безпідставним, оскільки в ній не виявили за допомогою ГРХ ні одного з таких цукрів як глюкоза, галактоза, маноза, ксилоза, арабіноза, рибоза, фукоза, рафноза та еритроза.

При вивченні амінокислотного складу речовини D₇ достовірно вдалось показати лише наявність лізину.

ІК-спектри речовини D₇ виявляють полоси поглинання 3500, 3330-3240, 2850-2940 см⁻¹, які відповідають валентним коливанням груп -ОН, -NH₂, -CH₂, -CH₂-, -COO-CH₂. В той же час, незначне поглинання в області 1600-1500 см⁻¹ вказувало на наявність в молекулі ароматичної структури, що підтверджується також даними УФ-спектроскопії.

Порівняльний аналіз одержаних даних з даними для відомих метаболітів В. cinerea дає підстави стверджувати, що компонент D₇ є новою, раніше невідомою для В. cinerea, речовиною.

Глава 6. ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ФТИ В. CINEREA

Незважаючи на повсюдне поширення В. cinerea в природі, про біологічну активність утворених ним метаболітів відомо вкрай мало. Є повідомлення про антибактеріальну і фунгістатичну активність двох сесквітерпеноїдних метаболітів - ботридіала та ботридіактона (Fehlhaber et al., 1974; Welmar et al., 1979). Інша речовина - цинерарин - в значній мірі пригнічувала ріст етіолованих колеоптілей пшениці. Однак, ніякої дії не відмічалось на інтактних тепличних рослинах бобів та тютюну, в той час як на рослинах кукурудзи спостерігали хлорози і некрози (Culter et al., 1988). Повідомиляється також про виділення двох полісахаридних фракцій, які пригнічували ріст зелених рослин винограду in vitro (Vannel et al., 1991).

Обмеженість відомостей щодо біологічної активності метаболітів В. cinerea, а також виділення нових речовин стали вихідними для вивчення деяких аспектів біологічної дії виділених нами ФТИ.

6.1 Антибіотичні властивості. З метою одержання додаткової інформації виділені препарати досліджували на антибіотичну активність щодо деяких фітопатогенних бактерій, патогенних та токсигенних грибів, а також сапрофітних дріжджових штамів.

Показано, що комплекс ФТМ шт. 109815, має чітко окреслену фунгістатичну дію щодо ряду токсиноутворюючих грибів (*Asp. fumigatus*, *P. urticae*, *D. toxicum*, *M. verrucaria*, *M. goidum*), відомих причинних агентів ряду мікотоксикозів людини та с/г тварин. В той же час, досліджувані штами *Stachybotrys alternans* виявились нечутливими до вивчених концентрацій ФТМ.

Суттєвою різницею в чутливості до ФТМ характеризувались досліджувані представники фітопатогенних фузаріїв. Так, всі вивчені види секції *Diseolor* (*F. gibbosum*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*) активно пригнічувались досліджуваними концентраціями ФТМ, в той час як *F. sporotrichiella* виявився до них нечутливим, а вивчені види секції *Elegans* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*) і *Martiella* (*F. javanicum*, *F. solani*) суттєво різнились чутливістю.

Факт підвищеної чутливості представників фітопатогенних фузаріїв до метаболітів *B. cinerea* 109815 здається досить цікавим з погляду на їх здатність викликати кореневі гнилі злаків та зернобобових, а також інших захворювань (Білай, 1988).

Досліджувані фітопатогенні бактерії *E. carotovora* sub. sp. *carotovora* (збудник гнилі моркви) і *Cl. michiganense* (збудник раку томатів) досить активно пригнічуються ФТМ *B. cinerea*. В той же час, більшість дріжджових штамів виявилась нечутливою до досліджуваних концентрацій ФТМ. Виключення складають штами *Tr. citaneum*, а також *Kl. marxianus* var. *marxianus*.

З погляду одержаних даних великий інтерес викликає можливий характер дії окремих компонентів фітотоксичного комплексу, включаючи їх дію на рослини.

6.2. Фітотоксична дія. Вивчались фітотоксичні властивості метаболітів, виділених з культуральних фільтратів шт. 109815. Використовували досить поширений метод біопроб на насінні. Досліджена дія токсичних метаболітів на проростання насіння гороху, кукурудзи, редису, огірків та пшениці. Результати цих досліджень свідчать про вибірковість їх дії на схожість, ріст проростків та коренів. Малочутливі виявилось насіння огірків, хоч тут і спостерігався незначний ефект пригнічення росту коренів досліджуваними концентраціями ФТМ (на 10-3%). В той же час, концентрації в 500, 200 і, особливо 50 мкг/мл, справляли стимулюючу дію на проростки огірків.

Таким чином, препарат ФТМ шт. 109815 має яскраво виражену

фітотоксичну дію щодо ряду рослин - представників різних родин.

Поряд з біопробою на насінні для вивчення фітотоксичної активності метаболітів *V. cinerea* використовували калусну культуру винограду *in vitro* двох сортів: Ізабелла (стійкий) і Подарок Магарача (нестійкий).

На мал.4 наведені дані, які свідчать про те, що концентрація 2.2 мг/мл пригнічувала ріст як стійкого, так і нестійкого сортів. При цьому спостерігали побуріння калусу, що вказувало на його гибель. Мала концентрація (0.01 мг/мл) стимулювала ріст калуса обох сортів, в той час як відчутна різниця спостерігалась на середовищах з концентраціями 0.55-0.13 мг/мл.

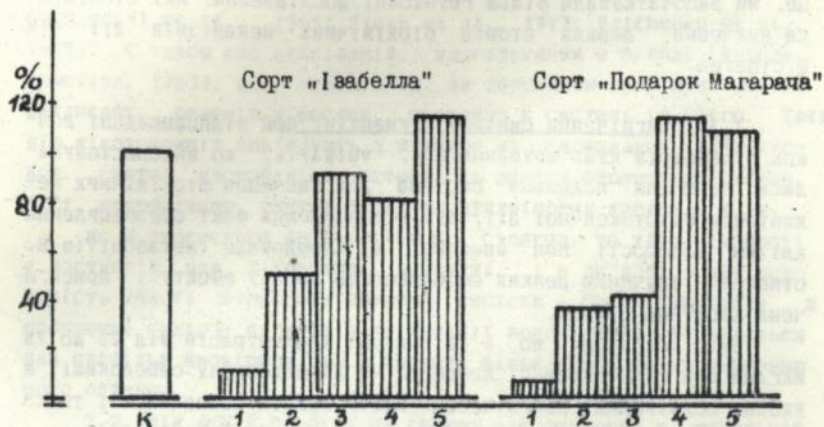
Суттєва різниця в рості калуса спостерігалась при використанні концентрації ФТИ 0.27 мг/мл. Приріст маси калуса сорта Ізабелла досягав майже контрольного (92%), в той час як у сорту Подарок Магарача - 36%, що переконливо ілюструє фітотоксичний ефект препарату шт.109815 в культурі тканини *in vitro*.

Одержана різниця в рості калуса стійкого і нестійкого сортів при культивуванні на середовищі, що містить 0.27 мг/мл ФТИ, доводить принципову можливість використання її для селекції стійкості в рослин винограду *in vitro*. Враховуючи повсюдне поширення *V. cinerea*, а також здатність його уражувати значний перелік видів, цілком природно передбачати і можливість селекції стійкості у ряду важливих для народного господарства рослин.

Глава 7. ВИВЧЕННЯ ДЕЯКИХ СТОРІН МЕХАНІЗМУ ДІЇ ФТИ *V. CINEREA*

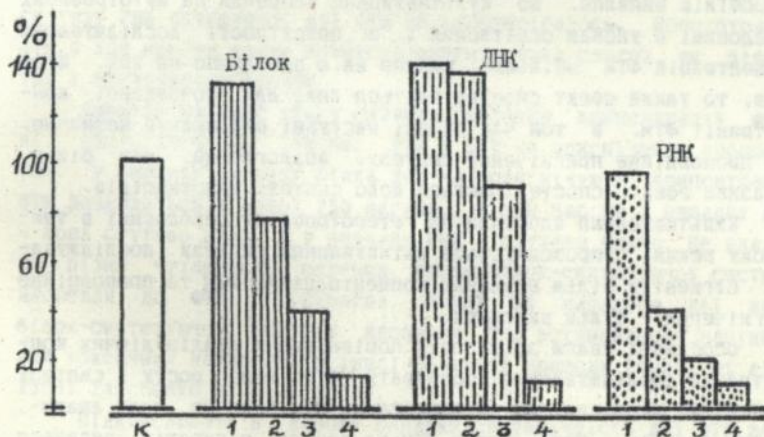
Як відомо, з моменту проникнення патогена в тканини рослини-хазяїна відбуваються фізіологічні і біохімічні зміни, які полягають в порушенні процесів фотосинтезу, дихання, азотного обміну і т.ін. Про таку дію метаболітів *V. cinerea* в літературі є вкрай обмежені відомості. Так, при вивченні дії фракції органічних кислот, виділених з культуральних фільтратів *V. cinerea*, Рубін та Ладигіна (1964) показали зміну в'язкості протоплазми та збільшення розмірів пластид, а Шінерарин, за даними Culter et al. (1988), викликає хлорози у рослин тютюну.

Ще набув єдині роботи такого плану, які до того ж не дають відповіді на питання щодо механізмів уражуючої дії. Враховуючи



Мал. 4. Дія різних концентрацій ФТМ *B. cinerea* 109815 на ріст калусної тканини винограду стійкого (Ізабелла) і нестійкого (Подарок Магарача) сортів.

К - контроль; 1 - 2,2 мг/мл; 2 - 0,55 мг/мл; 3 - 0,27 мг/мл; 4 - 0,13 мг/мл; 5 - 0,01 мг/мл середовища



Мал. 5. Включення ^3H -лейцину та $2\text{-}^{14}\text{C}$ -аденіну в білок і нуклеїнові кислоти *Chl. vulgaris* 62.

К - контроль; 1 - 100 мкг/мл; 2 - 250 мкг/мл; 3 - 375 мкг/мл; 4 - 500 мкг/мл.

це. ми започаткували більш ґрунтовні дослідження, які стосують-ся вивчення деяких сторін біохімічних механізмів дії ФТМ *B. cinerea*.

7.1. Пригнічення синтезу пігментів. При відпрацюванні деяких параметрів культивування *Chl. vulgaris*, що використовувалась нами як модельна система для вивчення біохімічних механізмів фітотоксичної дії, був встановлений факт обезбарвлення клітин водорості при внесенні в середовище метаболітів *B. cinerea*. Вивченню деяких особливостей прояву ефекту і присвячена наступна робота.

Було показано, що в діапазоні концентрацій від 25 до 75 мкг/мл при культивуванні хлорелли на автотрофному середовищі в умовах освітлення пригнічення росту зовсім незначне, і тяжко провести межу між 30 та 50%-ними діючими концентраціями.

Поряд з цим, в паралельних експериментах було показано, що ефект обезбарвлення хлорелли також є функцією концентрації ФТМ. При цьому аналіз характерних спектрів зміни поглинання окремих пігментів доводить різницю лише кількісного характеру без будь-якого впливу на якісний склад пігментного комплексу.

Більш ґрунтовне вивчення синтезу окремих компонентів хлорофілів виявляє, що культивування хлорелли на автотрофному середовищі в умовах освітлення і в присутності досліджуваних концентрацій ФТМ збільшує синтез хл.а приблизно на 20%. Щодо хл.в, то такий ефект спостерігається лише для початкової концентрації ФТМ, в той час як всі наступні викликають незначне, але пропорційне пригнічення синтезу. Аналогічний, але більш виразний ефект, спостерігається щодо синтезу каротиноїдів.

Культивування хлорелли на гетеротрофному середовищі в темновому режимі супроводжується активуванням синтезу досліджуваних пігментів більш низькими концентраціями ФТМ та пропорційне пригнічення - більш високими.

Особливої уваги заслуговує порівняльний аналіз діючих концентрацій досліджуваного препарату ФТМ щодо росту і синтезу пігментів, який виявляє неспівпадання цих величин щодо аналогічних ефектів. Так, вплив ФТМ на синтез пігментів виявився більш виразним, ніж щодо росту *Chl. vulgaris*. Прояв "альбінізму" у *Ch. vulgaris*, а також у деяких вищих рослин під впливом мікотоксинів спостерігали ряд дослідників

(Schoental et al., 1965; Singh et al., 1973; Zaichenko et al., 1989). Є також ряд публікацій, узагальнених в огляді (Dashek, Lewellyn, 1983), щодо механізмів, за допомогою яких нікотоксини викликають реакцію у рослин, особливо в системі *in vitro*. Таку дію нікотоксинів пов'язують з впливом на споживання амінокислот, синтез хлорофілів, активність деяких ферментних систем, ріст, проростання, синтез білка та нуклеїнових кислот і т.ін.

Що ж стосується метаболітів *B. cinerea*, то такі відомості в доступній нам літературі відсутні, і в зв'язку з цим можливість участі білок-синтезуючої системи *Chl. vulgaris* в порушенні синтезу пігментів як функції пригнічення ФТМ здається нам найбільш ймовірною, що й сприяло більш ґрунтовному вивченню цього питання.

7.2. Дія ФТМ *B. cinerea* на синтез макромолекул в модельній системі *Chl. vulgaris*. Як видно з даних, наведених на мал.5, збільшення концентрації ФТМ в досліджуваних системах супроводжується пропорційним пригніченням включення мічених попередників як в білок, так і нуклеїнові кислоти. В той же час, початкові концентрації ФТМ в 100 мкг/мл (у випадку синтезу білка) і 100-250 мкг/мл (у випадку синтезу ДНК) справляють стимулюючий (на 30-40%) ефект на синтез цих полімерів. У випадку синтезу РНК активуючої дії ФТМ не спостерігалось. Концентрація ФТМ в 500 мкг/мл майже повністю пригнічувала синтез як білка, так і нуклеїнових кислот.

Звертає на себе увагу суттєва різниця концентрацій ФТМ, які викликають як 30%-не, так і 50%-не пригнічення процесу. Так, у випадку синтезу білка 30%-на пригнічуюча концентрація ФТМ знаходиться в межах 250 мкг/мл, в той час як у випадку ДНК - вона суттєво виша, а у випадку РНК - суттєво нижча. Це вказує на різну чутливість окремих ланок білок-синтезуючої системи хлорелли до ФТМ *B. cinerea*. Такий же характер дії щодо білок-синтезуючої системи хлорелли був встановлений раніше і для токсичних метаболітів іншої хімічної природи (Tugai et al., 1989; Zaichenko et al., 1989).

Підкреслювати в даному випадку специфічність дії ФТМ щодо функціонування білок-синтезуючої системи *Chl. vulgaris* здається нам недоцільним. Однак, сама наявність такого ефекту може вказувати на ймовірність його зв'язку з пригніченням синтезу хлорофілів за рахунок порушення синтезу білок-пігментних комп-

лексів, на що також вказувалось раніше.

7.3. Поглинання ^{14}C -ФТИ клітинами *Chl. vulgaris*. Аналіз викладених вище даних дає підстави передбачати, що різниця діючих концентрацій ФТИ, які викликають аналогічний ефект, може бути пов'язана з різною здатністю їх проникати в клітини хлорелли. З врахуванням викладеного, в цьому розділі наводяться дані щодо поглинання ^{14}C -ФТИ *B. cinerea* відмитими клітинними суспензіями *Chl. vulgaris*.

Виконані нами дослідження стверджують транспорт ^{14}C -ФТИ з середовища в клітину. Однак, він незначний і складає 8.47% в варіанті досліду без азиду натрію і 7.12% - в варіанті з азидом натрію від загальної вихідної радіоактивності. В той же час, при вивченні балансу радіоактивності різних фракцій видно, що значний процент її припадає на фракцію, що відмивається з поверхні інтактних клітин (біля 50.8% в варіанті без азиду натрію і 30.5% - в варіанті з азидом натрію). Високий процент радіоактивності лишається зв'язаним з клітинними фрагментами (36.6% та 61.7%, відповідно).

Як уже вказувалось, радіоактивність, що включається в клітину, досить незначна. З врахуванням цього, можна передбачати високу активність компонентів фітотоксичного комплексу, здатних в незначній кількості в клітині викликати порушення таких процесів як синтез білка та нуклеїнових кислот, синтез пігментів і т. ін.

Нам здається, що такі дані, одержані для ФТИ *B. cinerea* вперше, вносять певні корективи і в наші уявлення про механізми ушкоджуючої дії микотоксинів в фітопатологічному процесі.

В И С Н О В К И

1. На основі ростових та фізіолого-біохімічних параметрів проведена комплексна оцінка 25 штамів *B. cinerea* різного походження. Показано, що штами з високим виходом фітотоксичних метаболітів (ФТИ) характеризуються і високою продуктивністю процесів токсинування. Однак, високий вихід ФТИ не корелює з їх активністю щодо *Chl. vulgaris* 62. Здійснено відбір найбільш активних культур. Кращими виявились штами 109815, 16093, лис.80 та 15973, виділені з філосфери різних рослин.

2. Показано, що комплекс метаболітів *B. cinerea* включає 11

речовин, 8 з яких мають фітотоксичну дію. Якісний склад компонентів не змінюється в залежності від джерела виділення штамів, способів їх культивування, а також складу досліджуваних середовищ. Відмінності, що спостерігаються, мають лише кількісний характер.

3. Розроблено метод виділення як комплексного препарату ФТМ, так і окремих його компонентів. Він передбачає екстракцію активних речовин хлороформом з наступним очищенням їх за допомогою рідина-рідинного перерозподіду (н-гексан - ацетонітрил) та ступеневої колонкової хроматографії. Основні фітотоксичні метаболіти - речовини В₁ і D₁ - одержані в кристалічному вигляді. Показано, що вони складаються з вуглецю, водню, кисню та азоту, не містять сірки і галогенів.

4. Речовина D₁ при газо-хроматографічному дослідженні не виявляє присутності жодного з таких моносахаридів як глюкоза, галактоза, маноза, ксилоза, арабіноза, рибоза, фукоза, рамноза, еритроза. В той же час, в ній достовірно виявляється лізин.

ІК-спектри речовини D₁ вказують на валентні коливання OH-груп (3500 см⁻¹), на асиметричні та симетричні коливання NH₂-груп (3330 та 3240 см⁻¹), -CH₂- та -CH₃- груп (2850 та 2940 см⁻¹), групи -COO-CH₃ (1730 та 1235 см⁻¹). Поглинання в області 1600-1500 см⁻¹ вказує на присутність в молекулі речовини D₁ ароматичної структури, що підтверджують і дані УФ-спектроскопії. Співставлення одержаних даних з такими ж для відомих метаболітів В. *cinerea* показує, що речовина D₁ є новою, раніше невідомою.

5. Метаболіти В. *cinerea* мають яскраво виражену фітотоксичну дію щодо ряду рослин. Показано пригнічення схожості та проростання насіння пшениці, кукурудзи, гороху, редису, огірків. Встановлена концентраційна залежність вказаного ефекту.

В експериментах на культурі калусної тканини нестійкого (Подарок Магарача) та стійкого (Ізабелла) сортів винограду показана принципова можливість використання ФТМ В. *cinerea* для відбору резистентних рослин *in vitro*.

6. Встановлено, що метаболіти В. *cinerea* поруч з фітотоксичними виявляють антибактеріальні властивості щодо деяких фітопатогенів (*Erwinia carotovora* sub. sp. *carotovora*, *Clavibacter michiganense*), а також антифунгальні властивості щодо широкого спектру фітопатогенних (*Fusarium graminearum*, Г.

gibbosum, *F. culmorum*, *F. sambucinum* та ін.) і токсигенних (*Dendrodochium toxicum*, *Myrothecium verrucaria*, *M. roridum*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium urticae* та ін.) грибів.

7. Встановлено явище обезбарвлення клітин хлорелли, пов'язане з порушенням синтезу пігментів під впливом ФТИ *V. cinerea*. Ефект як пригнічуючої, так і активуючої дії визначається концентрацією токсичних метаболітів і в значній мірі залежить від інших умов інкубації (освітленість, склад середовища та ін.).

Паралельне пригнічення включення ^3H -лейцину та $2\text{-}^3\text{C}$ -аденіну в білок і нуклеїнові кислоти, не дивлячись на відмінності в діючих концентраціях, може вказувати на можливий зв'язок в пригніченні цих процесів.

Список основних праць, опублікованих по темі дисертації:

1. Волинкин В.А., Рубежняк И.Г. Выведение устойчивых сортов винограда с использованием культуры тканей *in vitro*// Научно-технический прогресс в производстве посадочного материала винограда и плодовых культур (Тбилиси, март 1987 г.): Тез. доп.-Тбілісі: Мецниереба, 1987. - С.44-45.
2. Волинкин В.А., Рубежняк И.Г. Выведение устойчивых сортов винограда с использованием культуры тканей "*in vitro*"// 10-я Респ. научно-практ. конфер. молодых уч. (Махачкала, октябрь 1987 г.): Тез. доп. - Махачкала, 1987. С.30.
3. Рубежняк И.Г. Использование культуры тканей для изучения устойчивости винограда к патогенным грибам// Ускорен. науч.-техн. прогрес. в плодовод. и виноградарстве и задачи молодых ученых (Алма-Ата, 1987 г.): Тез. доп. - Алма-Ата: 1987. - С.37.
4. Рубежняк И.Г. Фитотоксические фракции культуральной жидкости гриба *V. cinerea*// Актуальн. пробл. воздел. и перераб. винограда (Ялта, апрель 1990 г.): Тез. доп. - Ялта: Алушт. типогр., 1990. - С.86-87.
5. Рубежняк И.Г., Трошин Л.П., Зайченко А.М. Токсигенный потенциал *Botrytis cinerea* Pers.// Микробиол. журн. - 1993. - 55, N 4. - С.81-86.
6. Рубежняк И.Г., Трошин Л.П., Зайченко А.М. Сравнительная

характеристика некоторых штаммов *Botrytis cinerea* Pers.. культивируемых на различных средах// Микробиол. журн. - 1993. - 55. № 4. - С. 87-91.

7. Рудышин С. Д., Волынкин В. А., Рубежняк И. Г. Культура ткани *in vitro* как метод и объект исследования устойчивости винограда к патогенам// Пробл. вопросы произв. винограда и продукт. его переработки. (Ялта, апрель 1988 г.): Тез. доп. - Ялта:ВНДІ Віпп "ИАГАРАЧ", 1988. - С. 7.

10/2/88

Підписано до друку 10.06.94г. Формат 60x84/16

Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 50 примірок. Заказ М1019

Надруковано ЦУОП ДНПІ "Плодвинконсерв" м. Київ, Саксаганського , 1

AB 30.571

AB 30.571