КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ПЕРКОВСЬКА Галина Юріївна

ІНДУКЦІЯ ХВОРОБОСТІЙКОСТІ *ALLIUM CEPA L.* МЕТАБОЛІТАМИ ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ

Спеціальність 03.00.04 - біохімія

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

К и ї в - 1 9 9 5

НВ 54.05

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії імунітету рослин Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м.Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
ДМИТРІЄВ О. П.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
ГОЛОВКО Е. А.

доктор біологічних наук
ЛУЦИШИНА О. Г.

Провідна організація: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

Захист дисертації відбудеться "27" 2 1995 р. о "__" год. на засіданні спеціалізованої вченої ради при Київському університеті ім. Тараса Шевченка за адресою:
Київ - 127, просп. акад. Глушкова, 2.
Поштова адреса: 252601, Київ - 33, Володимирська, 64, біологічний факультет

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці університету

Автореферат розісланий "27" 2 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
канд. біол. наук, професор Брайон О.В.

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00777401 (Q)
В. Стефаника
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Активне використання пестицидів в аграрному виробництві приводить до забруднення навколишнього середовища. Тому в багатьох лабораторіях світу проводяться інтенсивні пошуки екологічно безпечних засобів захисту рослин. Один з таких засобів базується на індукуванні хворобостійкості рослин. Перспективним з цієї точки зору здається використання метаболітів фітопатогенних мікроорганізмів, що можуть розпізнаватися рослиною-хазяїном та індукувати захисні реакції [Метлицкий и др., 1985; Dixon, Lamb, 1990; Mansfield, 1990; Darvill et al., 1992].

Такі метаболіти одержали назву біогенних індукторів або еліситорів (від англ. elicite - викликати), на відміну від абіогенних (хімічних або фізичних факторів), які не мають відношення до процесу патогенезу. Кількість робіт, пов'язаних з біогенними еліситорами захисних реакцій, швидко зростає. Найбільше вивчені еліситори, що становлять собою вуглеводні компоненти клітинних стінок фітопатогенних грибів та метаболіти, які виділяються цими грибами в поживне середовище (Anderson, 1980; Parker et al., 1988). Відомі також ліпідвмістні еліситори (Озерецковская и др., 1987; Longland et al., 1987; Bostock et al., 1992).

З'ясування структури і локалізації біогенних еліситорів у грибів відноситься до числа актуальних проблем фітоіммунології, оскільки їх вивчення дозволяє наблизитися до розуміння механізмів індукованої стійкості у рослин.

Більшість робіт з вивчення дії еліситорів здійснено на двудольних рослинах (Озерецковская и др., 1985; Lee, West, 1981). Разом з тим хімічна природа метаболітів фітопатогенів, взаємодія з якими індукує захисні реакції у однодольних рослин, практично невідома. У зв'язку з цим цікаво було дослідити взаємовідносини тканин цибулі ріпчастої (*Allium cepa*) з фітопатогеними грибами, які її ушкоджують - *Botrytis allii* и *Fusarium solani*.

Мета роботи. Робота присвячена з'ясуванню локалізації біогенних еліситорів, які індукують захисні реакції у *Allium cepa*, і вивченню принципової можливості підвищення хворо-

бостійкості рослин цибулі ріпчастої з допомогою еліситорів, виділених з фітопатогенних грибів *Botrytis allii* і *Fusarium solani*.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні задачі:

1. Провести пошук еліситорів захисних реакцій серед метаболітів фітопатогенних грибів роду *Botritys* і *Fusarium*.
2. Виділити і охарактеризувати найбільш активні еліситори.
3. Дослідити можливість використання біогенних еліситорів з метою індукування хворобостійкості *Allium cepa* в процесі вегетації рослин і при зберіганні врожаю.

Наукова новизна і практична цінність роботи. Вперше ідентифіковано індуктори синтезу фітоалексинів цибулі ріпчастої (цибулінів 1д і 2д) серед метаболітів фітопатогенних грибів *B. allii* і *F. solani*. Виявлені і частково очищені дві групи еліситорів, які розрізняються за складом, молекулярною масою і біологічною активністю. Доведена можливість індукування захисних реакцій *A. cepa* за допомогою біогенних еліситорів, виділених з фітопатогенних грибів. В результаті проведених досліджень розроблено спосіб підвищення хворобостійкості *A. cepa* в процесі вегетації рослин і при зберіганні врожаю.

Апробація роботи: Результати дисертаційної роботи доповідались на V Українському біохімічному з"їзді (Київ, 1987); VII з'їзді Українського мікробіологичного товариства (Чірновці, 1989); Всесоюзній конференції "Достижения биотехнологии - агрономическому комплексу" (Чорнівці,1991); 3-му Міжнародному конгресі з молекулярної біології рослин (Тасон, 1991); 6-му Міжнародному конгресі з фітопатології (Монреаль, 1993), 9-му Конгресі Європейської Федерації Спілок фізіологів рослин (Брно, 1994).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 робіт.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з

вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів та їх обговорення, заключення, висновків і списку літератури. Робота представлена на 114 сторінках, містить 10 таблиць і 19 рис. Список літератури містить 125 найменувань, в тому числі 90 зарубіжних праць.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом досліджень була цибуля ріпчаста (*Allium cepa L.*) трьох сортів: гострого - "Стригунівський" та напівгострих - "Сквирський", "Октябрський". Експерименти проводили з насінням, вегетуючими рослинами і, в основному, з цибулинами.

Захисні реакції рослин вивчали у відповідь на ураження культурами грибів, які відрізняються за ступеню патогенності до *A. cepa*: *Botrytis allii Munn.*- специфічний патоген, збудник шийкової гнилі; *Fusarium solani (Mart.).Appel et.Wr.*и *Fusarium oxysporum Shlesh.*- неспецифічні патогени, здатні вражати послаблену або пошкоджену цибулю; *Fusarium moniliforme Sheld.*- патоген, який у природі цибулю не вражає. Культури грибів були одержані з коллекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України і Головного ботанічного саду АН Росії.

Пошук метаболітів фітопатогенних грибів, які підвищують хворобостійкість *A. cepa*, проводили за допомогою знайдених фітоалексинів (ФА) цибулі ріпчастої - 1,3-діон-5-октил-циклопентану та 1,3-діон-5-гексил-циклопентану [Дмитриев и др., 1987].

З культурального фільтрату двотижневої культури *B. allii* (штамм 15972) одержували білкову та вуглеводну фракції і досліджували їх фітоалексин-індукуючу (ФА-індукуючу) активність.

Полісахаридну фракцію осаджували з поживного середовища подвійним об'ємом 96%-ного етилового спирту [Аксенова, 1962].

Цитоплазматичний вміст міцелію гриба виділяли за комбінованим методом Ванга і Бартніки-Гарсіа [1973] та Чалової [1977]. В кожній фракції визначали вміст білку методом Лоурі [1951], вуглеводів - за реакцією з фенол-сірчаною кислотою

[Dubois, 1975]. Складовий вміст ліпідів визначали за допомогою реактиву Судан чорний В [Gilleland, 1978]. ІК-спектр глюканів досліджували на приладі ІКС-29 в межах від 667 до 4000 $см^{-1}$. Препарат клітинних стінок гриба одержували за допомогою методу Чалової і др. [1976].

Здатність фільтратів та екстрактів фітопатогенних грибів викликати ФА-активність тканин цибулі визначали за допомогою модифікованого для *Allium cepa* методу краплинних дифузатів [Гусар, Савельева, 1977]. Визначали їх фунгітоксичність [Озерецковская и др., 1979]. Як тест-об'єкт використовували конідії гриба *Fusarium solani*.

Розділення і кількісне визначення фітоалексинів цибулі проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на приладі НРС (Чехословаччина) з прямофазною аналітичною колонкою Sepharon SGX в системі гексан: діетиловий ефір (3:1).

Ліпіди екстрагували за методом Фолча сумішшю хлороформ: метанол : вода (2:1:0,8 за об'ємом) [Кейтс, 1975]. Метилові ефіри жирних кислот синтезували за методом Синяка [1976]. Аналіз метилових ефірів жирних кислот здійснювали з допомогою газорідинного хроматографу Хром-5 (Чехословаччина) на колонці, заповненій 5% Silar-5CP на Chromosorb W-AW /100-120 меш/. Як стандарти використовували комерційні препарати відповідних жирних кислот.

Вміст абсцизової кислоти в паренхимі цибулі визначали за модифікованим методом Мільборро [Кармелюк, 1982].

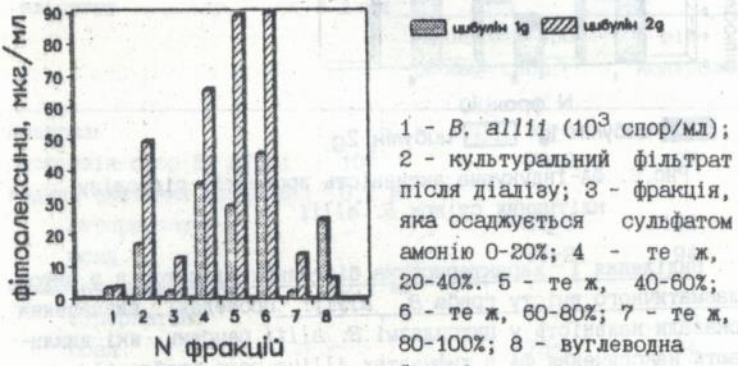
Дані мікроскопічних спостережень обробляли статистично з імовірністю безпомилкового прогнозу $\beta = 0,95$. В таблицях наведені : середнє арифметичне - М та абсолютна максимальна похибка - Δ [Плохинский, 1970].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

І. Локалізація індукторів синтезу ФА у *Botrytis allii*.

Проведено скринінг метаболітів гриба *B. allii* на наявність речовин, здатних індукувати накопичення фітоалексинів цибулі - цибулинів 1д і 2д. Досліджували суспензії конідій, культуральний фільтрат, клітинні стінки та цитоплазматичний вміст міцелію *B. allii*.

Вивчення культурального фільтрату *B. allii*. Виявилось, що кількість фітоалексинів в краплинних дифузатах у відповідь на обробку білковою і вуглеводною фракціями вища, ніж на инфікування спорами *B. allii* або культуральним фільтратом (рис. 1). Індукуюча активність білкових фракцій була помітно вищою, ніж вуглеводної. Наибільша ФА-індукуюча активність була властива білковій фракції, яка осаджувалась при 60-80%-ному висолюванні сульфатом амонію. Цибулін 1д після обробки лусок цибулі цією фракцією накопичувався в 13 разів інтенсивніше, ніж в дифузатах зі спорами гриба і в 2.7 разів більше порівняно з дифузатами з культуральним фільтратом. Вміст цибуліна 2д в краплинних дифузатах після обробки цією фракцією збільшувався ще сильніше, відповідно в 25 і в 1.8 разів.



1 - *B. allii* (10^3 спор/мл); 2 - культуральний фільтрат після діалізу; 3 - фракція, яка осаджується сульфатом амонію 0-20%; 4 - те ж, 20-40%. 5 - те ж, 40-60%; 6 - те ж, 60-80%; 7 - те ж, 80-100%; 8 - вуглеводна фракція.

Рис.1. ФА-індукуюча активність різних фракцій культурального фільтрату *B. allii*

Відомо, що в процесі патогенезу важливу роль можуть відіграти пектолітичні ферменти. Ми вирощували *B. allii* на рідкому середовищі з пектином як джерелом вуглецю. Білкову фракцію, яка містила пектолітичні ферменти, в подальшому ми порівнювали з іншими метаболітами *B. allii* білкового походження.

Дослідження препарата клітинних стінок *B. allii*. Екстракт клітинних стінок дистильованою водою викликав невначне

накопичення цибулінів в дифузатах, тому в подальшому проводили кислотний та лужний гідроліз клітинних стінок (1Н NaOH і 1Н HCl при концентрації клітинних стінок 100 мг на 10 мл екстрагента), нейтралізацію та діаліз.

ФА-індукуюча активність лужного екстракту була на рівні контролю (11мкг/мл), при цьому він викликав накопичення 18 мкг/мл цибулінів 1д и 2д (рис.2). Кислотний екстракт індукував накопичення обох фітоалексинів в 5 разів меньше, ніж у контролі.

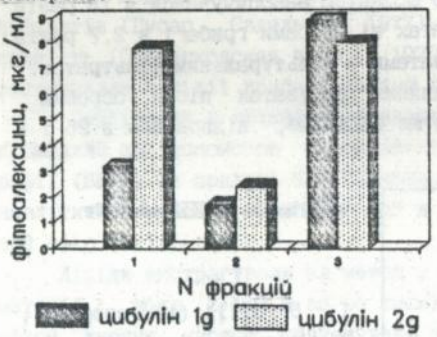


Рис.2. ФА-індукуюча активність продуктів гідролізу клітинних стінок *B. allii*

Виділення і характеристика біогенних еліситорів з цитоплазматичного вмісту гриба *B. allii*. Проведені визначення показали наявність у цитоплазмі *B. allii* речовин, які викликають накопичення ФА в дифузатах *Allium cepa* (табл. 1).

Фракції водного та спиртового розчинів міцелію *B. allii* (з кип'ятінням та без нього) в різній мірі індукували ФА-активність. Найбільшу ФА-активність виявили екстракти міцелію 70%-ним етанолом при 78°С.

Водний залишок спиртового екстракту міцелію після видалення етанолу використовували для подальшого очищення. Проводили гель-хроматографію на колонках з сефадексами. Найбільш чітке розділення фракцій досягалось на сефадексі G-50.

При фракціонуванні діалізованого спиртового екстракту цитоплазми *B. allii* методом гель-фільтрації на колонках з сефадексом G-50 було одержано дві фракції (рис.3). Фракція I

відповідала пікам з об'ємами елюції 60-100 мл і являла собою Лоурі-позитивні сполуки. В концентрації 100 мкг/мл сухої речовини фракція I індукувала синтез цибулінів 1д і 2д в 2 рази вище, ніж у відповідь на інфікування конідіями *B. allii*. Фракція II з об'ємами елюції 110-150 мл містила вуглеводи і мала ще вищу індукуючу активність: в тій же концентрації вона спричиняла накопичення цибулінів 1д і 2д в 4.5 раза вище, ніж у випадку крапельних дифузатів зі спорами.

Таблиця 1

Індукція ФА-активності в дифузатах *Allium cepa* метаболітами гриба *Botrytis allii*

Патоген, еліситор	Вміст в 1 мл	Проростання тестових спор	
		кількість проростих спор	% від контролю
контроль	-	90±6	100
суспензія спор *B. allii*	10^3	79±3	87
водний екстракт міцелію	0,1 мг		
супернатант		92±6	102
осад		85±2	94
з кип'ятінням 20 хв	0,1 мг		
супернатант		77±3	85
осад		76±1	84
спиртовий екстракт міцелію	0,1 мг		
супернатант		88±5	97
осад		79±2	88
з кип'ятінням 20 хв	0,1 мг		
супернатант		68±3	76
осад		74±1	82

Вуглеводну природу фракції II підтверджено вивченням інфрачервоного спектру (рис.4). Про це свідчать смуги поглинання при 3400 $см^{-1}$ (O-H); 1750 $см^{-1}$ (C=O); 850 $см^{-1}$ (C-O).

При порівнянні білкових фракцій з культурального фільтрату та з екстракту цитоплазми (після розподілу на сефадек-

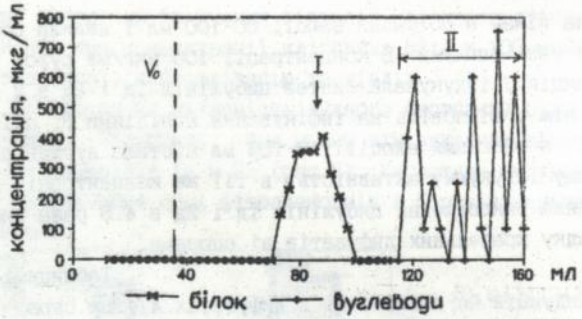


Рис.3. Профіль елюції з сефадекса G-50 екстракта міцелію *B.allii*

По осі ординат: концентрація Лоурі-позитивних сполук (фракція I) і вуглеводів (фракція II), мкг/мл

По осі абсцис: об'єми елюції, мл

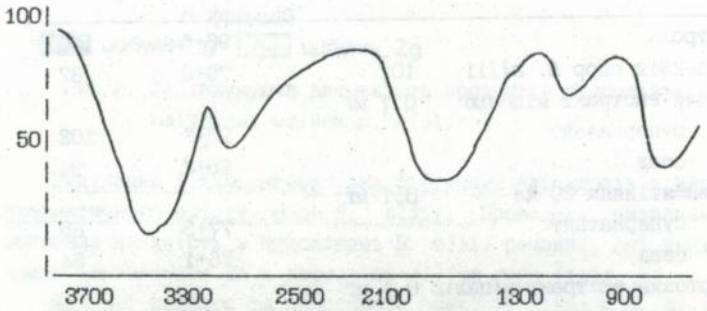
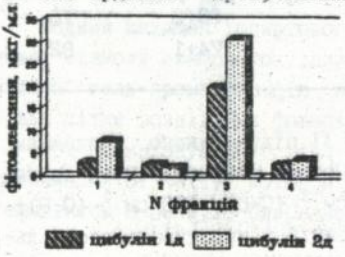


Рис.4. ІК-спектр вуглеводів після гель-фільтрації на сефадексі G-50

по осі ординат - пропускання,%; по осі абсцис - $см^{-1}$



1 - *B. allii* (10^3 спор/мл);
2 - білкова фракція після росту гриба на пектині;
3 - те ж, з глюкозою;
4 - білкова фракція з екстракту цитоплазми (після розподілу на сефадексі G-50)

Рис.5. ФА-індукуюча активність білкових фракцій *B. allii*

сі G-50) щодо їх ФА-активності вони були попередньо вирівняні за концентрацією білку (25 мкг/мл). Аналіз ФА-індукуючої активності у *A. cepa* показав (Рис.5), серед білкових фракцій найбільш активною була фракція, одержана з культурального фільтрату після росту гриба *B. allii* на середовищі Чапека.

Оскільки в спиртовому екстракті міцелію були виявлені ліпіди, ми вирішили більш детально дослідити їх склад. Аналіз ліпідного компоненту цитоплазматичного вмісту міцелію *B. allii* видавався цікавим з ряду причин :

по-перше, еліситорна активність властива C_{18} та C_{20} ненасиченим жирним кислотам, зокрема арахідоновій ($C_{20:4}$) та ейкозапентаєновій ($C_{20:5}$) кислотам [Bostok et al., 1981];

по-друге, відомо, що активність деяких біогенних еліситорів обумовлена їх ліпідною частиною, як це має місце, наприклад, у ліпоглікопротеїдного комплексу, виділеного з *Phytophthora infestans* [Оверцковская и др., 1987].

Таблиця 2

Склад жирних кислот в екстракті міцелію *B.allii*

жирна кислота	номенклатура $C_{x:y}$	вміст від суми кислот,%
пальмітинова (розгалужена)	16:0	1,8
пальмітинова	16:0	25,1
гептадеканова	17:0	3,4
стеаринова	18:0	7,9
олеїнова	18:1	16,1
лінолева	18:2	30,7
ліноленова	18:3	6,6
ейкозаенова	20:1	8,6

x - кількість атомів вуглецю в молекулі
y - число подвійних зв'язків

Аналіз метилових ефірів жирних кислот за допомогою газо-рідинної хроматографії показав, що сума ненасичених жир-

них кислот в екстракті міцелію складає більше 60% (табл. 2). $C_{20:4}$ та $C_{20:5}$ жирних кислот не було виявлено. Більше третини вмісту C_{16} - C_{20} жирних кислот складали полієнові ненасичені жирні кислоти: лінолева (30,7%) та ліноленова (6,6%). Ці кислоти могли б бути потенціальними індукторами захисних реакцій, оскільки вони, як відомо, є субстратами для ліпоксигеназного окислення.

Одержані дані дають підстави вважати, що серед метаболітів *B. allii* знайдені дві групи речовин, які відрізняються за структурою, молекулярною масою та ФА-індукуючої активністю. Максимальну активність мали білкова фракція культурального фільтрату та вуглеводна фракція екстракту міцелію після розділення гель-фільтрацією на сефадексі G-50.

Раніше було показано, що неспецифічний патоген *F. solani* також індукує накопичення фунгітоксичних речовин в тканинах *A. cepa* [Дмитриев и др., 1986], з цієї причини було вирішено з'ясувати індукуючу активність інших грибів роду *Fusarium*.

II. Аналіз ФА-індукуючої активності метаболітів грибів роду *Fusarium*

Виявилось, що суспензії конідій, культуральні фільтрати та екстракти міцелію різних грибів роду *Fusarium* відрізняються за здатністю індукувати ФА-активність в тканинах цибулі (сорт "Стригунівський"). Найбільш високу індукуючу активність мали суспензії конідій та екстракти міцелію *Fusarium solani* (табл. 3). Культуральні фільтрати *F. solani* та *F. oxysporum* відносно менше індукували ФА-активність крапельних дифузатів, а культуральний фільтрат *F. moniliforme* виявив мінімальну індукуючу активність.

Якісний аналіз зафарбленням Суданом чорним продемонстрував наявність ліпідів у складі найбільш активного цитоплазматичного еліситора з *F. solani*. Було встановлено, що вміст ненасичених жирних кислот у цитоплазмі міцелію *F.solani* становить 73% від суми кислот (табл.4).

В складі екстракту міцелію *F.solani* міститься 37% лінолевої та 13% ліноленової кислот, тобто близько 50% від за-

гальної суми жирних кислот. C_{20} ненасичені жирні кислоти, арахідонова та ейкозапентаєнова, в ліпідному компоненті біогенного еліситора були відсутні.

Таблиця 3

Індукція ФА-активності цибулі грибами роду *Fusarium*

Патоген, еліситор	Вміст в 1 мл	Проростання тестових спор	
		кількість проростих спор	% від контролю
Контроль		95±5	100
F. solani			
суспензія конідій	$2x10^5$	14±2	15
екстракт міцелію			
водний	2,0 мг	20±3	21
спиртовий	2,0 мг	42±3	44
культуральний фільтрат	-	59±6	62
F. oxysporum			
суспензія конідій	$2x10^5$	23±4	24
екстракт міцелію			
водний	2,0 мг	28±2	29
культуральний фільтрат	-	72±6	75
F. moniliforme			
суспензія конідій	$2x10^5$	26±1	27
екстракт міцелію			
водний	2,0 мг	44±3	46
культуральний фільтрат	-	76±4	79

Методи підвищення ефективності захисних реакцій у однодольних рослин, до яких належать такі важливі сільськогосподарські культури як цибуля, пшениця, жито та ін. практично відсутні. В зв'язку с цим ми провели серію експериментів по випробуванню захисних властивостей вивчених нами біогенних еліситорів в процесі вегетації та при зберіганні цибулі.

Таблиця 4

Склад жирних кислот екстракту міцелію *Fusarium solani*

жирна кислота	номенклатура, $C_{x:y}$	вміст від суми кислот, %
пальмітинова	16:0	18,3
пальмітоолеїнова	16:1	1,0
стеаринова	18:0	7,9
олеїнова	18:1	23,1
лінолева	18:2	36,6
ліноленова	18:3	13,1

x - кількість атомів вуглецю в молекулі
y - число подвійних зв'язків

III. ІМУНІЗАЦІЯ РОСЛИН ЦИБУЛІ БІОГЕННИМИ ЕЛІСИТОРАМИ

Випробування захисної дії еліситора з *F. solani* на вегетуючих рослинах. В польових дослідах рослини цибулі обробляли малими дозами еліситора, які викликали лише сліди фітоалексинів. Вивчення залежності ФА-активності дифузатів від концентрації водного екстракту міцелію *F. solani* показало, що обробка рослин цибулі еліситором в концентрації 0,025% від маси сирого міцелію викликала слабку ФА-активність. Ця доза біогенного еліситора була використана як сенсибілізуюча для обробки рослин.

Захисну дію біогенного еліситора випробували проти найбільш шкідливого захворювання цибулі - пероноспорозу або несправжньої борошнистої роси на полях НДІ овочівництва та баштанництва Держагропрому України (м.Харків).

В результаті обприскування вегетуючих рослин в фазі наростання листової маси біогенним еліситором за дві доби до зараження *Peronospora destructor*, поширення хвороби і ступінь її розвитку зменшувались у всіх трьох сортів цибулі (табл.5).

Таблиця 5

Вплив еліситора з *F. solani* на ураженість цибулі пероноспорозом

Спосіб обробки	Поширення хвороби, %		Ступінь розвитку хвороби, %	
	липень	серпень	липень	серпень
		сорт Стригунівський		
вода (контроль)	79,6±4,8	100,0	5,7±1,6	72,6±3,9
еліситор	37,1±2,3	100,0	2,0±0,9	56,3±2,5
		сорт Сквирський		
вода (контроль)	92,7±5,1	100,0	7,4±1,2	74,5±3,1
еліситор	56,2±2,7	100,0	2,3±0,7	62,9±4,2
		сорт Октябрський		
вода (контроль)	86,3±3,4	100,0	6,1±1,1	76,2±3,8
еліситор	47,7±1,6	100,0	2,1±0,5	58,2±2,8

Розвиток пероноспорозу пригничувався у варіантах з обробкою еліситором протягом всієї вегетації після штучного зараження *P. destructor*.

Таким чином, показана можливість підвищення хворобостійкості *A. cepa* за допомогою еліситорів захисних реакцій - водного екстракту з міцелію *F. solani*.

Випробування захисних властивостей біогенного еліситора з *B. allii* с метою зменшення втрат цибулі при зберіганні.

Порівняльні дані зберігання цибулі, обробленої еліситором, виділеним з міцелію патогенного гриба *B. allii*, наведені в табл. 6. Препарат еліситора у концентрації 0.01-0.03% маси сирого міцелію істотно індукував хворобостійкість у цибулі. Так, кількість загнилих і пророслих цибулин зменшувалась у два рази, а втрати маси - на 2.0-2.5%, порівняно з контролем.

Таблиця 6

Вплив біогенного еліситора на якість цибулі
(після зберігання протягом 5 місяців)

Варіант обробки	Кількість цибулин, % Стандартних	Пророслих	Загнилих	Втрати маси,%
Контроль - обприскування водою	80±0,6	5,4±0,20	2,3±0,10	6,8±0,3
Обробка елісито-ром з *B. allii* в концентрації, %				
0,005	82±0,5	4,2±0,30	1,9±0,20	6,3±0,5
0,01	91±0,4	2,7±0,05	1,2±0,05	4,5±0,2
0,02	85±0,3	2,9±0,10	1,1±0,06	5,2±0,2
0,03	89±0,5	3,1±0,10	1,4±0,10	4,8±0,1
0,05	84±0,5	3,6±0,20	1,7±0,10	5,7±0,6
Обробка розчином гідрела в концент-рації 1,0 %	89±0,7	2,8±0,05	1,8±0,07	5,6±0,3

Крім того, поліпшувалась товарна якість цибулі: якщо контрольні цибулини до кінця зберігання виявились сильно зів'ялими, то оброблені еліситором залишались свіжими.

З метою з'ясування механізму дії біогенного еліситора на ростові процеси визначали вміст фітогормону - абсцизової кислоти в цибулинах, оброблених еліситором, розчином гідрела і водою.

Встановлено, що після обробки рослин біогенним елісито-ром вміст абсцизової кислоти в паренхимі цибулин збільшувався. Препарат еліситора сприяє, хоча і слабіше, ніж гідрел, підвищенню вмісту абсцизової кислоти і подовженню періоду спокою цибулин.

Таким чином, обробка зеленого пера цибулі за 2 тижні до збору цибулин розчином біогенного еліситора (водним залишком спиртового екстракту) з міцелію гриба *B. allii*, підвищує хворобостійкість, зменшує втрати маси цибулин та пригнічує їх проростання при зберіганні.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що ФА в лусках цибулі накопичуються у відповідь на інокуляцію патогенними грибами та їх метаболітами. Знайдені та частково охарактеризовані дві групи еліситорів, які розрізняються за хімічним складом, молекулярною масою та біологічною активністю.

2. Встановлено, що максимальну активність мали білкова фракція культурального фільтрату та вуглеводна фракція після розділення гель-фільтрацією на сефадексі G-50 екстракту міцелію фітопатогенного гриба *B. allii*.

3. Найбільш високу індукуючу активність серед грибів роду *Fusarium* мав екстракт міцелію *F. solani*. Культуральні фільтрати *F. solani* та *F. oxysporum* відносно меньше індукували ФА-активність краплинних дифузатів, а культуральний фільтрат *F. moniliforme* виявив мінімальну індукуючу активність.

4. Охарактеризован склад жирних кислот ліпідних компонентів еліситорів з *B. allii* і *F. solani* і показано, що C_{18} ненасичені жирні кислоти (лінолева та ліноленова) є потенційними індукторами захисних реакцій.

5. Доведено, що біогенні еліситори здатні індукувати не тільки накопичення фітоалексинів (при високих концентраціях), а також і формування системної тривалої хворобостійкості (при малих концентраціях).

6. Продемонстровано практичну можливість підвищення хворобостійкості *A. cepa* за допомогою біогенного еліситора з *F. solani*. Попередньо "імунізовані" еліситором в концентрації 0,025% вегетуючі рослини цибулі швидше і з більшою інтенсивністю включають захисні реакції у відповідь на ураження збудником пероноспорозу, специфічним патогеном *P. destructor*.

7. Проведені польові досліди довели можливість використання препарата "Лінетол" як імунізатора рослин. Передпосівне замочування насіння цибулі в розчині цього препарату збільшувало число проростих рослин та швидкість їх росту порівняно з контролем, одночасно зменшуючи поширення хвороби та ступінь її розвитку.

8. Показано, що обробка рослин *A. cepa* біогенним еліситором з *B. allii* в концентрації 0,01-0,03% за два тижні до збирання врожаю зменшувала загнивання, втрати маси та приг-

нічувала проростання цибулин при їх подальшому зберіганні. Пригнічення проростання цибулин у оброблених рослин корелює із збільшенням вмісту в паренхімних тканинах природного фітогормону - абсцизової кислоти.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Дмитриев А.П., Цибульник В.А., Перковская Г.Ю. Повышение болезнеустойчивости лука с помощью биогенного индуктора защитных реакций // Докл. АН УССР. Сер.Б.- 1987. - N 1.- С. 71-74.

3. Дмитриев А.П., Перковская Г.Ю., Гродзинский Д.М. Выделение и характеристика индуктора защитных реакций лука из цитоплазматического содержимого гриба Botrytis allii // Докл. АН УССР. Сер.Б. - 1988.- N 1.- С. 64 - 66.

3. Перковская Г.Ю., Бейдер А.М., Дмитриев А.П. Индуцирование устойчивости лука к болезням с помощью биогенных индукторов // Биополимеры и клетка.- 1991.- 7.- N 4.- С. 91-94.

4. Перковская Г.Ю., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М. Использование биогенного индуктора из *Botrytis allii* для уменьшения потерь лука при хранении // Физиол. и биохимия культ.раст. - 1991 - 23.- N 4.- С. 371-375.

5. Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М., Перковская Г.Ю. Биохимическая природа защитных реакций лука // Тез. докл. V Укр. биохим. съезда. - Киев.- 1987.- Ч. 2.- С. 50 - 51.

6. Перковская Г.Ю., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М. Индукция болезнеустойчивости лука репчатого метаболитами фитопатогенних грибов // Всесоюз. конференция "Достижения биотехнологии - агрономическому комплексу".- Черновцы.- 1991. - Ч. 1 - С. 65.

7. Dmitriev A.P., Perkovskaya G.Y., Dychok Y.V. Activation of defense-related genes in onion // 3 Intern. Congr. Mol. Biology. - USA, Tucson.- 1991.- P. 1314.

8. Dmitriev A.P., Perkovskaya G.Y., Grodzinsky D.M. Elicitation of induced resistance in onion // 6 Intern. Congr. Plant Pathology. - Canada, Montreal.- 1993. - P. 233.

9. Dmitriev A.P., Perkovskaya G.Y., Grodzinsky D.M. Activation of defence reactions in *Allium cepa* // Biologia plantarum. - 1994.- v.36. - P. 330.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

АННОТАЦИЯ

Перковская Г.Ю. Индукция болезнеустойчивости *Allium cepa L.* метаболитами фитопатогенных грибов.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Киевский университет им. Тараса Шевченко, Киев, 1995.

Защищается 9 научных работ, которые содержат исследования индукции защитных реакций у *Allium cepa L.* с помощью метаболитов, выделенных из фитопатогенных грибов. Установлено, что в ответ на обработку метаболитами грибов *Botrytis allii* и *Fusarium solani* в тканях лука накапливаются фитоалексины. Обнаружены две группы биогенных индукторов защитных реакций, различающиеся по химическому составу, молекулярной массе и биологической активности. Проведены полевые испытания предложенных биогенных индукторов, приводятся данные об их эффективности в процессе вегетации и при хранении лука.

BRIEF INFORMATION

Perkovskaya G.Y. Induction of disease resistance in *Allium cepa L.* with metabolites from pathogenic fungi.

Thesis for obtaining scientific degree of Candidate of biological sciences on speciality 03.00.04 - biochemistry, Kiev Taras Schevchenko University, Kiev, 1995.

9 published papers to be defended content investigation on induction of defence reactions in *Allium cepa L.* with metabolites derived from pathogenic fungi. The experimental results are shown phytoalexins were accumulated in onion tissues after treatment with metabolites derived from *Botrytis allii* and *Fusarium solani*. At least two groups of biotic elicitors were found which differ in composition, molecular mass and inducing activity. The developed biotic elicitors were tested at field trials. Data about their efficacy during onion vegetation and storage are shown.

Ключові слова : захисні реакції, фітоалексини, біогенні еліситори, фітоімунітет, індукція хворобостійкості рослин.

ПІдписано до друку 26.01.95р Формат 60x84/16
ПапІр друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примІрник. Заказ №182
Надруковано ЦУОП ДНПП "Плодвинконсерв" м. КиІв, Саксаганського , 1

456381

Ав 31.938