

**Еюбов Б.Б.,  
Меджнунова А.А.,  
Гахраманова Ф.Х.,  
Алиева Ф.А.,  
Мамедова Ф.Р.**

## **СПОСОБНОСТЬ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ВЫДЕЛЯТЬ ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ**

*Аннотация.* Исследована способность продуцировать гидролитические ферменты у 123 штаммов грибов, выделенных из различных сельскохозяйственных культур. Показано, что грибы, проявляющие высокую протеолитическую активность, обладают низкой фитотоксичностью.

*Ключевые слова:* грибы, сельскохозяйственные культуры, гидролазы, патогенез, фитотоксичность.

Известно, что в процессе патогенеза большое значение имеет способность патогена выделять различные ферменты, при помощи которых грибы расщепляют клеточные стенки растения-хозяина и распространяются в ткани [8]. При этом ферментный аппарат гриба-патогена играет важнейшую роль в момент внедрения и развития гриба в ткани растения-хозяина.

В состав растительной ткани входят различные химические соединения полимерного характера, такие, как целлюлоза, лигнин, гемицеллюлоза, пектин и другие. Биологическую деградацию целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина катализируют гидролитические, а биодеградацию лигнина - окислительные ферменты [1]. Поэтому среди многочисленных ферментов грибов особенно важными являются гидролитические и окислительные ферменты, с помощью которых гриб разрушает клеточную стенку растения-хозяина.

Способность некоторых патогенных грибов выделять различные ферменты исследована в ряде работ [3]. Однако число этих грибов невелико, и такие патогены, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Ascochyta*, *Alternaria*, *Fuzarium*, *Phoma* и *Penisillium*, в данном аспекте достаточно не исследованы. Кроме того, данные грибы также широко распространены в Азербайджанской Республике и вызывают различные болезни растений, в том числе и сельскохозяйственных культур.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение способности грибов, распространенных в экологически разных территориях Азербайджана и вызывающих различные болезни сельскохозяйственных культур, выделять гидролитические ферменты.

Исследованные грибы были выделены из различных сельскохозяйственных культур (огурец, томат, картофель, арбуз, дыня, баклажан, пшеница, кукуруза, хлопок и т.д.), которые широко возделываются в разных регионах страны [6]. Для этого были взяты образцы из вегетативных и генеративных органов растений, которые имели признаки той или иной болезни. Всего было взято около 70 образцов, из которых выделены в чистую культуру 123 штамма, которые относились к 12 видам, и все они являлись представителям и несовершенных грибов.

Выделение грибов в чистую культуру проводили согласно методу, использованному в аналогичных микологических исследованиях [7], и идентификацию проводили по определителю, составленному по культурально-морфологическим и физиологическим

---

---

признакам грибов [2, 10-12].

Культивирование выделенных грибов проводили на жидкой среде Чапека [7] и способность грибов выделять тот или иной фермент оценивали по внеклеточной активности, благодаря которому грибы проникают во внутрь ткани растений. Инкубацию проводили при 26°C в течение 7 дней и в конце ферментации определяли активность ферментов.

Активность фермента (эндоглюканазы) была определена вискозиметрическим методом [4], для которого в качестве субстрата были использованы 0,3-0,4%-ный раствор Na-КМЦ ("Serva", Германия, степень замещения 0,7), приготовленный на ацетатном буфере, содержащем 0,1 M NaCl.

Определение активности ксиланазы была проведена по методу Шомоди-Нельсона [4] и при этом реакционная смесь состояла из 5 мг ксилана, 0,5 мл ацетатного буфера (0,05M, pH 4,5, 0,1M NaCl) и 0,5 мл культуральной жидкости. Реакционная смесь инкубировалась в течение 30 минут при 50°C.

В качестве контроля использовали ту же реакционную смесь, но без инкубации.

Активность амилазы определена калориметрическим методом [5], основанным на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Пектолитическая активность определяется вискозиметрическим методом, основанным на уменьшении вязкости 1%-ного пектина [5].

Для определения активности протеазы был использован модифицированный метод Ансона [5]. В качестве субстрата использован 2%-ный натрий-казеинат. Для этого в пробную пробирку наливается 2 мл субстрата и оставляется на 10 минут при 10°C, а потом туда добавляется 2 мл культуральной жидкости (или же супернатант). Для остановки реакции через 10 минут туда добавляется 4 мл 0,3 M трихлоруксусной кислоты. Раствор хорошо перемешивается, и после полного оседания продуктов гидролиза оставшийся раствор фильтруется и его оптическая плотность определяется на длине волны 656-670 нм.

Активность целлюлазы, ксиланазы, амилазы и протеазы выражали мкмоль/мин<sup>-1</sup>.мл<sup>-1</sup> (ед.мл<sup>-1</sup>), а пектиназы - % .мл<sup>-1</sup> (ед.мл<sup>-1</sup>).

В результате проведенных работ выяснилось, что исследуемые грибные штаммы в той или иной степени проявляют ферментативную активность, однако некоторые грибы по активности того или иного фермента имели небольшую активность или вообще активность фермента была на едва определяемом уровне, т.е. грибы отличались между собой по количественным показателям внеклеточной активности того или иного фермента (таб. 1), что является штаммовым различием. Как правило, штаммовые различия обнаруживаются как между родами, так и между видами.

Надо отметить - из таблицы отслеживается, что некоторые штаммы по активности того или иного фермента обладали высоким уровнем, и они по данному показателю даже не уступают другим известным продуцентам, которые являются не патогенными. Однако исходя из представленных в таблице данных невозможно оценивать роль отдельных ферментов в патогенезе растений. Так как между опасностью грибов и ферментативной активностью, на первый взгляд, не обнаруживается связи.

## Ферментативная активность микроскопических грибов, вызывающих различные болезни сельскохозяйственных растений

	Число штаммов	Целлюлаза	Ксиланаза	Амилаза	Пектиназа	Протеаза
<i>Aspergillus flavus</i>	9	1,1-2,0	20,1-28,7	1,7-2,6	5,6-7,3	3,6-7,1
<i>A. fumigatus</i>	8	1,0-1,7	17,8-24,3	2,3-3,8	4,5-7,5	2,7-6,5
<i>A. niger</i>	12	2,0-4,3	35,3-42,5	3,8-5,3	9,6-11,5	4,6-7,2
<i>A. ochraceus</i>	7	0,4-0,7	13,2-17,6	1,2-2,3	7,1-8,9	3,2-4,5
<i>Alternaria alternata</i>	8	0,9-1,7	12,7-23,5	0,7-1,3	3,1-5,1	2,2-4,7
<i>A. solani</i>	9	0,5-1,2	17,8-30,1	0,5-0,8	2,7-4,3	1,9-5,7
<i>Botrytis cinerea</i>	10	0,5-0,7	21,2-24,6	следы	1,2-2,5	0,7-1,2
<i>Fusarium avenaceum</i>	8	1,1-1,6	16,4-21,9	1,4-2,2	1,5-3,5	следы
<i>F. gibbosum</i>	10	0,8-1,3	15,6-25,3	1,8-3,0	2,6-4,8	0,3-0,8
<i>F. moniliforme</i>	11	0,9-1,3	25,3-35,4	2,7-4,2	3,1-5,4	0,2-0,9
<i>F. oxysporum</i>	10	0,7-1,2	20,2-31,4	2,3-3,5	2,3-4,6	следы
<i>Vertisillium dahliae</i>	11	0,3-0,5	18,9-23,5	1,1-1,5	3,5-6,7	0,8-1,1
<i>P. martensii</i>	9	0,2-0,5	23,4-31,3	следы	2,9-6,1	2,3-4,5

Например, в настоящее время фузариоз является одной из опасных болезней различных растений [2, 10], возбудителями которой являются грибы рода *Fusarium*. В ходе исследований были изучены активности 4 видов данного рода, и все они по активности, особенно по активности протеазы, уступают грибу *A. niger*, который не является биотрофом.

Учитывая этот факт, была исследована связь между активностью ферментов и фитотоксичностью грибов. Для этого из некоторых растений (пшеница, кукуруза, огурец, арбуз и дыня) были взяты по 100 семян и смочены в течение 12 часов культуральными жидкостями грибов, полученных при выращивании их на жидкой среде Чапека в течение 7 суток. Затем семена были помещены в климатные камеры, после чего была проверена всхожесть семян. Полученные результаты (табл. 2) показали, что культуральные жидкости грибов, имеющих высокую активность протеолитических ферментов, не характеризовались высокой фитотоксичностью. Например, протеолитическая активность гриба *Vertisillium dahliae* E-121 была в 5,5 раза ниже по сравнению с активностью гриба *Aspergillus flavus* M-14. Однако, всхожесть семян пшеницы в первом случае была почти в 2 раза меньше, чем во втором случае.

Таблица 2

## Влияние культуральной жидкости грибов на всхожесть(%) семян некоторых сельскохозяйственных культур

Штаммы грибов	пшеница	кукуруза	огурец	арбуз	дыня
<i>Aspergillus flavus</i> M-14	83	81	74	84	79
<i>A. fumigatus</i> M-16	59	63	65	76	70
<i>A. niger</i> M-25	82	89	76	87	80
<i>A. ochraceus</i> M-31	78	82	75	85	78
<i>Alternaria alternata</i> A-07	57	60	63	67	65
<i>A. solani</i> A-14	44	47	51	56	61
<i>Botrytis cinerea</i> A-21	43	40	43	54	49
<i>Fusarium avenaceum</i> E-06	25	31	34	36	30
<i>F. gibbosum</i> E-45	35	38	40	42	39
<i>F. moniliforme</i> E-73	34	38	37	39	38
<i>F. oxysporum</i> E-96	22	27	29	37	35
<i>Vertisillium dahliae</i> E-121	42	51	47	52	45
<i>P. martensii</i> A-32	60	65	64	73	67

---

---

Аналогичные результаты получаются при сравнении других вариантов, т.е. связь между уровнем активности протеазы и фитотоксичностью грибов носит обратный характер, что дает основание полагать, что уровень активности протеазы может использоваться как фактор, лимитирующий способность фитотоксичности патогенных грибов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бекер М.Е. (под ред.). Трансформация продуктов фотосинтеза. - Рига: Зинатне, 1984. - 252 с.
2. Билай В.И. Фузариин. - Киев: Наукова думка, 1977. - 443 с.
3. Бицадзе Н.Г. Способность к выделению пектолитических, целлюлолитических ферментов и токсических веществ патогенным грибом *Coniothyrium cerasi*. // Микология и фитопатология - 2006. - Т.40, в.5. С.433-437.
4. Клесов А.А. и др. Ферментативный гидролиз целлюлозы. // Биоорганическая химия. - 1980. - Т.6. - С. 1225-1241.
5. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. - 240 с.
6. Мамедов Г. Земельная реформа в Азербайджане: правовые и научно-экологические вопросы. - Баку: Элм, 2000, - 374с.
7. Методы экспериментальной микологии/Под. ред. Билай В.И. - Киев: Наукова думка, 1982. - 500 с.
8. Тарр С. Основы патологии растений. - М.: Мир, 1975. - 587с.
9. Саттон Д., Фотергилл А., Риналди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. - М.: Мир, 2001. - 486с.
10. <http://www.agroatlas.spb.ru>
11. <http://www.cbs.knaw.nl/databases>
12. Samson R.A., Pitt J.I. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Amsterdam: Harwood Publishers, 2000, 510p.

V. Eyubov, A. Mechnunova, F. Gahramanova, F. Aliyeva, F. Mammadova

#### PATHOGENIC FUNGUS ABILITY TO HYDROLYTIC ENZYMES EXTRACTION

*Abstract.* It was investigated ability of 123 fungi strains isolated from different agricultural crops, to produce the hydrolytic enzymes. It was revealed that fungi of high proteolytic activity do have low phytotoxicity.

*Keywords:* fungus, agricultural cultures, hydrolase, pathogeny, phytotoxic.