

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ РАЗНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП

Проведено сравнительное изучение полигалактуроназной активности 85 сапрофитных, фитопатогенных и эндофитных штаммов *Fusarium roae*, *Alternaria alternata*, *Penicillium funiculosum* и *Mycelia sterilia*. Установлено, что в целом ферментативная активность штаммов *Mycelia sterilia* и *P. funiculosum* была значительно выше, чем штаммов *A. alternata* и *F. roae*. Большинство изученных штаммов проявляли средний уровень полигалактуроназной активности. Высокая активность была характерна лишь для эндофитных штаммов *F. roae*, *P. funiculosum* и *Mycelia sterilia*. Не установлено четкой зависимости уровня полигалактуроназной активности изученных штаммов от скорости линейного роста, времени культивирования, а также вида и органа растения-хозяина, из которых они были выделены. Наличие полигалактуроназы у доминирующих и часто встречающихся видов эндофитных грибов болотных растений Полесья Украины свидетельствует о том, что эндофитные микроскопические грибы играют существенную роль в гидролизе пектиновых веществ растительных тканей, а также миграции минеральных элементов в болотных экосистемах.

Ключевые слова: микроскопические грибы, фитопатогены, сапрофиты, эндофиты, полигалактуроназная активность.

Связи грибов с растениями очень древние и весьма разнообразные, их можно свести к двум главным типам: взаимоотношения грибов с живыми растениями и деструкция мертвых растений. Грибы характеризуются осмотротфным типом питания, причем для паразитов, симбионтов и сапротрофов в большинстве случаев растительными тканями. Гидролитические ферменты грибов нацелены на разложение углеводов – строительного материала и запасных веществ растений [1].

Клеточные стенки растений состоят из полисахаридов: крахмала (амилоза и амилопектин), целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ и соединений не углеводного характера, к которым можно отнести лигнин, кутин, суберин, фосфолипиды, белки, воски и минеральные соединения.

Пектиновые вещества – это гетерополисахариды, состоящие из основной цепи частично метилэтерифицированного α -1,4-D-галактуронана [8, 16]. Пектины обычно сосредоточены в срединной пластинке, имеют коллоидные свойства и могут связывать большое количество воды. Их основная биологическая роль сводится к сохранению структурной целостности компонентов растительной клетки.

Ряд авторов отмечают наличие у эндофитов сложного комплекса ферментов – целлюлаз, гемицеллюлаз, полифенолоксидаз, полигалактуроназ, разлагающих растительные ткани [1, 10], что позволило предположить возможность функционирования сложной трофической цепи между сфагновыми мхами, сосудистыми растениями и эндофитными грибами.

Полигалактуроновые комплексы сфагновых мхов связывают большую часть минеральных элементов, в том числе K^+ и $^{137}Cs^+$, которые становятся доступными для сосудистых растений в результате действия полигалактуроназы эндофитных микромикетов [22]. Это имеет значение для обмена калия и миграции $^{137}Cs^+$ в олиготрофных болотных экосистемах в целом [6, 17]. Поэтому определение полигалактуроназной активности эндофитных грибов имеет большое значение для установления их роли в переносе элементов минерального питания, в том числе ионов K^+ и Cs^+ , в системе «гриб-эндофит – растение-хозяин».

При изучении видового состава эндофитных грибов, развивающихся во мхах, кустарничках порядка Ericales и других травянистых и древесных растениях мезоолиготрофных и олиготрофных болот Ровенской и Житомирской областей нами

© И. Н. Курченко, 2013

выявлены общие для этих растений виды грибов-эндофитов [5]. Для дальнейших исследований были отобраны виды эндофитных грибов, относящиеся к доминирующим и часто встречающимся, а для сравнения – штаммы соответствующих видов микроскопических грибов, известных как патогены растений и сапрофиты, существующие в почве: *Ceratocystis* sp., *Mycelia sterilia* (orange), *Mycelia sterilia* (dark green), *Mycelia sterilia* (dark red), *Fusarium poae*, *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata*. Ранее нами были изучены ферментативные активности ряда гидролаз микроскопических грибов отмеченных выше видов разных трофических групп [2–5]. Целью настоящего исследования было сравнительное изучение полигалактуроназной активности сапрофитных, фитопатогенных и эндофитных штаммов микроскопических грибов для выявления ее роли в патологическом процессе и механизмах сосуществования растений и микроскопических грибов.

Материалы и методы. Объектами исследований были 85 штаммов *Fusarium poae* (25), *Alternaria alternata* (30), *Penicillium funiculosum* (15) и *Mycelia sterilia* (15) из коллекции культур микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Сапрофиты *F. poae* были выделены из ризосферы овса и лесных почв Киевской области; фитопатогенные – из зерна пшеницы, семян эхинацеи и стебля льна в Киевской области; эндофитные – из разных органов растений клюквы, сабельника и других болотных растений сфагновых болот Житомирской и Ровенской областей в 1997–2007 гг. (табл. 1). Фитопатогенные штаммы *A. alternata* были выделены из корней сосны, зерна озимой пшеницы, томатов и перца в Житомирской, Херсонской и Киевской областях; эндофиты – из разных органов сфагновых и зеленых мхов, эрикоидных кустарничков, травянистых и древесных растений сфагновых болот Житомирской и Ровенской областей в 1999–2009 гг. (табл. 2). Сапрофитные штаммы *P. funiculosum* были выделены из черноземов Днепропетровской и Запорожской областей, лесных почв Житомирской и Киевской областей, садовой почвы в Херсонской области, а также ризосферы ячменя в Днепропетровской; эндофитные – из разных органов болотных растений в Житомирской и Ровенской областях в 1999–2006 гг. (табл. 3). В работе использовали только эндофитные штаммы *Mycelia sterilia* (15), которые выделялись с высокой частотой встречаемости из травянистых и древесных растений сфагновых болот Полесья Украины в 1999–2004 гг. (табл. 4), поскольку *Mycelia sterilia* из других местообитаний могли впоследствии оказаться другими видами [5].

Культуры изученных грибов предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в чашках Петри. Для посева на чашки с агаризованной средой с пектином (5 г/л) использовали инокулом (3 x 3 мм) с края колонии. Инокулированные чашки заклеивали пленкой «Parafilm» для сохранения влажности питательной среды с пектином и инкубировали при $26 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 3 – 14 сут.

Скорость линейного роста грибов определяли на агаризованной питательной среде с яблочным пектином. Дважды в сутки измеряли диаметр грибной колонии в трех направлениях. На основе полученных данных определяли радиальную скорость роста (K_r) по формуле [7]:

$$K_r = \frac{R_t - R_o}{t - t_o},$$

где R_o – радиус колонии в момент времени t_o ; R_t – радиус колонии в момент t .

Ферментативную активность определяли качественным методом [19]. О полигалактуроназной активности судили по величине зоны просветления, которую определяли как разницу между средним радиусом зоны просветления среды и средним радиусом колонии гриба. По этому параметру полученные данные были разделены нами на три группы активности: низкая – ≤ 2 мм; средняя – 2,1–6,9 мм; высокая – ≥ 7 мм. Зоны активности полигалактуроназы фотографировали цифровой камерой Nikon MH-60 (Япония) (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Excel.

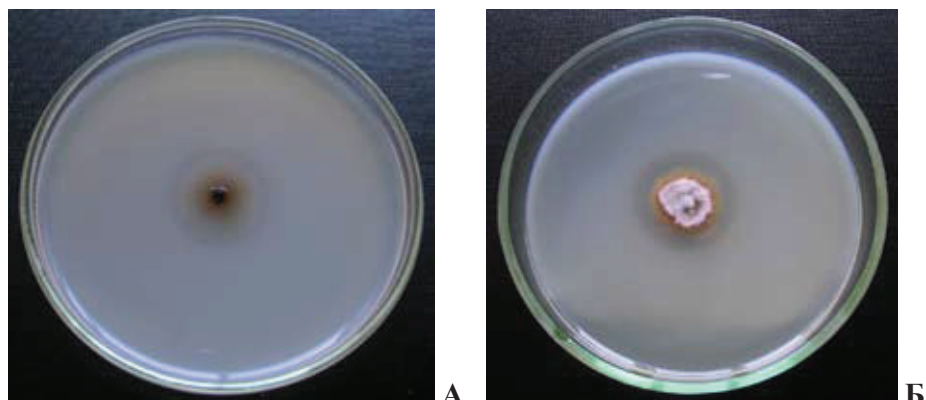


Рис. 1. Полигалактуроназная активность изученных штаммов микроскопических грибов: А) низкая; Б) высокая.

Результаты. Установлено, что штаммы *F. roae* отличались самой высокой скоростью линейного роста среди всех изученных (табл. 1). В общем, скорость роста эндофитных штаммов была ниже, чем у фитопатогенов и почти вдвое меньше, чем у сапрофитов. Диапазон варьирования этого признака у фитопатогенных штаммов ($0,051 \pm 0,001 - 0,227 \pm 0,032$) был больше, чем у эндофитных ($0,078 \pm 0,016 - 0,154 \pm 0,025$) и сапрофитных ($0,123 \pm 0,019 - 0,231 \pm 0,043$). Скорость роста штаммов *F. roae* всех трофических групп на средах с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), ксиланом и крахмалом была выше, чем на среде с пектином, однако диапазон изменчивости этого признака почти вдвое превышал таковой на среде с пектином, особенно у фитопатогенов [2, 4].

Величина скорости роста штаммов *P. funiculosum* на среде с пектином была ниже, чем штаммов *F. roae*, диапазон ее варьирования был шире у эндофитных штаммов ($0,080 \pm 0,012 - 0,136 \pm 0,017$) (табл. 1, 3).

Таблица 1

Скорость линейного роста* и динамика полигалактуроназной активности штаммов *Fusarium roae* разных трофических групп

Штамм	Источник выделения	К, мм/час на среде с пектином	Активность (зона, мм)		
			3 сут	5 сут	7 сут
<i>Фитопатогенные штаммы</i>					
50657	Зерно пшеницы	$0,206 \pm 0,024$	1,5	1,7	2,0
50668	Зерно пшеницы	$0,170 \pm 0,022$	0,5	0,8	1,2
50673	Зерно пшеницы	$0,171 \pm 0,022$	2,2	1,5	0,8
50674	Зерно пшеницы	$0,162 \pm 0,010$	1,7	2,5	2,2
50675	Зерно пшеницы	$0,128 \pm 0,013$	0	0	5,2
50693	Зерно пшеницы	$0,051 \pm 0,001$	0,8	0,7	0,5
50694	Зерно пшеницы	$0,134 \pm 0,012$	1,8	1,2	0,8
50697	Семена эхинацеи	$0,227 \pm 0,032$	1,2	0,7	1,2
50701	Стебель льна	$0,171 \pm 0,029$	3,0	5,3	0,5
50704	Колос пшеницы	$0,118 \pm 0,023$	4,2	4,0	5,7
<i>Сапрофитные (почвенные) штаммы</i>					
50660	Лесная почва под липой	$0,128 \pm 0,025$	2,0	1,3	1,8
50661	Лесная почва под липой	$0,131 \pm 0,007$	0	1,0	0,5
50699	Лесная почва под липой	$0,141 \pm 0,033$	1,2	1,3	2,2
50700	Лесная почва под ивой	$0,129 \pm 0,022$	0,7	1,2	2,2

Продолжение табл. 1					
50702	Лесная почва	0,156 ± 0,019	0,9	1,7	5,3
50703	Ризосфера овса	0,231 ± 0,043	0,5	1,5	1,5
50705	Лесная почва под орешником	0,123 ± 0,019	1,7	1,8	3,2
Эндوفитные штаммы					
50685	Корень клюквы	0,140 ± 0,031	0,8	1,7	2,2
50686	Лист сабельника	0,137 ± 0,009	1,0	1,8	1,5
50687	Стебель осоки	0,078 ± 0,016	1,2	2,2	0,2
50688	Лист клюквы	0,149 ± 0,008	0,9	1,7	1,2
50689	Стебель сабельника	0,154 ± 0,025	1,7	11,8	2,5
50690	Стебель камыша	0,132 ± 0,015	1,2	0	0
50691	Лист камыша	0,116 ± 0,011	0,8	0	0
50692	Корень камыша	0,152 ± 0,017	1,0	3,8	2,3

Примечание: *приведены средние значения этого параметра в динамике роста; **жирным** шрифтом отмечены максимальные значения.

Таблица 2

Скорость линейного роста* и динамика полигалактуроназной активности штаммов *Alternaria alternata*, выделенных из разных местообитаний

Штамм	Источник выделения	K, мм/час на среде с пектином	Активность (зона, мм)		
			3 сут	7 сут	10 сут
Фитопатогенные штаммы					
16762	Зерно пшеницы	0,036 ± 0,006	1,0	3,8	3,5
16765	Зерно пшеницы	0,051 ± 0,014	0	1,3	0,3
16817	Корень сосны	0,070 ± 0,003	2,5	2,8	5,8
16818	Зерно пшеницы	0,134 ± 0,011	0,2	0,7	0,7
16819	Плоды томата	0,066 ± 0,009	0	2,8	2,0
16820	Плоды томата	0,031 ± 0,009	1,3	1,2	0,8
16827	Плоды томата	0,041 ± 0,007	0,3	2,5	2,2
16821	Плоды перца	0,087 ± 0,008	0,7	0,7	2,3
16822	Плоды перца	0,048 ± 0,008	1,5	1,8	0
16823	Плоды томата	0,054 ± 0,007	2,7	1,5	0,2
16824	Плоды томата	0,073 ± 0,006	0	0	0
Эндوفитные штаммы					
16796	Ветка березы	0,039 ± 0,002	0,3	0,3	0
16797	Стебель андромеды	0,031 ± 0,004	3,2	3,5	3,0
16798	Стебель фиалки	0,045 ± 0,003	1,7	3,7	3,3
16799	Хвоя сосны	0,047 ± 0,012	1,2	1,5	0,2
16800	Лист калгана	0,063 ± 0,019	6,2	3,2	0,2
16801	Стебель сабельника	0,083 ± 0,007	0,2	2,3	1,5
16815	Стебель молинии	0,040 ± 0,005	3,3	6,0	5,3
16816	Почка березы	0,018 ± 0,005	0	2,5	3,3
16828	Верхушка сфагнума	0,055 ± 0,023	0,8	0,7	0
16829	Корень клюквы	0,047 ± 0,022	2,2	3,2	2,0
16830	Лист андромеды	0,032 ± 0,004	1,0	0	0,7
16831	Хвоя сосны	0,062 ± 0,007	2,8	2,8	0,5
16832	Стебель пушицы	0,057 ± 0,007	0,3	0,7	0
16833	Лист сфагнума	0,129 ± 0,031	1,0	3,7	5,7
16834	Стебель осоки	0,079 ± 0,021	1,5	2,5	4,5
16835	Лист клюквы	0,089 ± 0,028	0,3	1,8	1,7
16836	Стебель дрозды	0,045 ± 0,007	3,2	6,8	3,5
16837	Стебель клюквы	0,045 ± 0,004	0,7	5,5	3,8
16838	Верхушка кукушкина льна	0,041 ± 0,006	0,8	2,2	1,7

Примечание: *приведены средние значения этого параметра в динамике роста; **жирным** шрифтом отмечены максимальные значения.

Таблица 3

Скорость линейного роста* и динамика полигалактуроназной активности сапрофитных и эндофитных штаммов *Penicillium funiculosum*

Штамм	Источник выделения	K _p , мм/час на среде с пектином	Активность (зона, мм)		
			3 сут	5 сут	7 сут
<i>Сапрофитные штаммы</i>					
16783	Садовая почва	0,127 ± 0,013	1,5	2,7	6,3
19789	Чернозем	0,099 ± 0,015	2,0	2,3	2,3
16790	Чернозем	0,105 ± 0,002	2,0	0,8	1,0
16791	Лесная почва	0,106 ± 0,017	2,7	4,3	5,3
16792	Чернозем	0,110 ± 0,012	2,5	2,8	1,5
16793	Чернозем	0,113 ± 0,013	2,3	2,7	2,0
16794	Чернозем	0,116 ± 0,011	4,0	2,5	1,8
16825	Ризосфера ячменя	0,132 ± 0,012	2,2	2,5	1,5
16826	Лесная почва	0,125 ± 0,011	3,2	4,0	2,8
<i>Эндофитные штаммы</i>					
16784	Стебель клюквы	0,106 ± 0,011	0,2	1,5	3,0
16785	Лист пушицы	0,098 ± 0,008	0,7	2,3	1,8
16786	Стебель пушицы	0,103 ± 0,005	0,5	2,3	1,4
16787	Лист сабельника	0,136 ± 0,017	1,7	3,7	8,3
16788	Стебель клюквы	0,080 ± 0,012	0,8	2,0	1,7
16795	Лист клюквы	0,098 ± 0,014	1,8	2,3	2,0

Примечание: *приведены средние значения этого параметра в динамике роста; **жирным** шрифтом отмечены максимальные значения.

Штаммы *Alternaria alternata* практически не отличались по скорости линейного роста от штаммов *P. funiculosum* (табл. 2, 3). Следует отметить, что диапазон варьирования скорости линейного роста эндофитных штаммов *A. alternata* (0,018 ± 0,005 – 0,129 ± 0,031) был в 2 раза больше, чем фитопатогенных (0,031 ± 0,009 – 0,134 ± 0,011). Скорость роста штаммов *A. alternata* на средах с КМЦ, ксиланом и крахмалом была значительно выше, чем на среде с пектином, особенно у эндофитных; диапазон ее изменчивости превышал таковой на среде с пектином в 1,7 – 2,7 раза у фитопатогенных штаммов и в 4,0–4,5 раза у эндофитных [2, 3].

Штаммы *Mycelia sterilia* росли медленнее всех изученных на среде с пектином, однако диапазон варьирования этого признака был самым широким (варьирование в 3,4–6,4 раза) (табл. 1–4).

Таким образом, скорость линейного роста на среде с пектином штаммов *F. roae* была максимальной, а штаммов *Mycelia sterilia* – минимальной. В общем, скорость роста эндофитных штаммов изученных видов была ниже, а диапазон варьирования шире, чем у фитопатогенов и сапрофитов.

Для преобладающего количества исследованных фитопатогенных и сапрофитных (почвенных) штаммов *F. roae* был характерен средний уровень полигалактуроназной активности (зона просветления среды составляла 2,1–6,9 мм) (табл. 1, рис. 2). У эндофитных штаммов *F. roae* была выявлена несколько другая закономерность – активность полигалактуроназы варьировала в более широких пределах, чем у штаммов других трофических групп; половина изученных штаммов проявила низкий и 37,5 % – средний уровень активности. Только у одного из эндофитных штаммов *F. roae* 50689, выделенного из стебля сабельника, был отмечен высокий уровень активности (зона 11,8 мм) (табл. 1, рис. 2). Для большинства сапрофитных и половины фитопатогенных штаммов *F. roae* полигалактуроназная активность возрастала пропорционально времени культивирования, однако для большинства эндофитных штаммов такая зависимость не была отмечена.

Таблица 4

Скорость линейного роста* и динамика полигалактуроназной активности
эндофитных штаммов *Mycelia sterilia*, выделенных из разных органов
болотных растений

Штамм	Источник выделения	K _p , мм/час на среде с пектином	Активность (зона, мм)		
			7 сут	10 сут	14 сут
<i>Mycelia sterilia</i> (orange)					
16839	Лист сабельника	0,036 ± 0,009	1,7	12,5	16,7
16840	Лист лапчатки	0,068 ± 0,016	0	2,2	12,0
16841	Стебель молинии	0,026 ± 0,002	0,3	2,2	4,8
16842	Стебель клюквы	0,088 ± 0,020	4,0	1,5	5,2
<i>Mycelia sterilia</i> (dark green)					
16843	Лист андромеды	0,072 ± 0,080	0	3,8	1,2
16844	Стебель андромеды	0,027 ± 0,009	0	11,5	9,2
16845	Стебель клюквы	0,083 ± 0,009	0	2,5	1,8
16846	Корень вербейника	0,079 ± 0,011	5,8	5,0	1,0
16847	Стебель осоки	0,070 ± 0,014	8,0	15,0	2,7
16848	Верхушка сфагнума	0,013 ± 0,001	0,7	0,3	8,0
<i>Mycelia sterilia</i> (dark red)					
16849	Корень клюквы	0,047 ± 0,006	1,7	6,3	9,8
16850	Стебель клюквы	0,019 ± 0,002	12,3	16,5	8,5
16851	Корень березы	0,035 ± 0,008	9,8	0,7	10,5
16852	Лист осоки	0,056 ± 0,006	0	2,3	0,5
16853	Лист клюквы	0,086 ± 0,008	0	1,5	2,2

Примечание: *приведены средние значения этого параметра в динамике роста; **жирным** шрифтом отмечены максимальные значения.

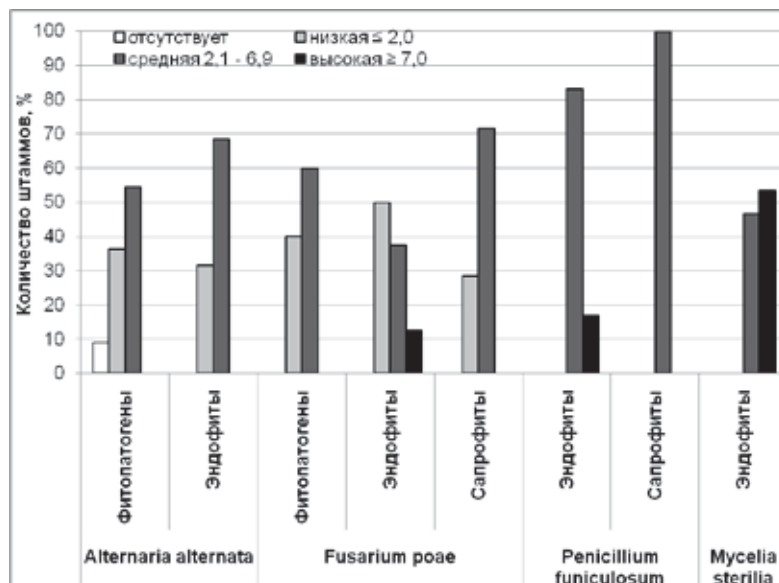


Рис. 2. Полигалактуроназная активность изученных микроскопических грибов разных трофических групп.

Большинство изученных фитопатогенных и эндофитных штаммов *A. alternata*, как и штаммы *F. poae*, проявляли среднюю полигалактуроназную активность (табл. 2, рис. 2). У 54,5 % фитопатогенных штаммов отмечена средняя полигалактуроназная активность, у 36,4 % – низкая, а у штамма 16824, выделенного из плодов томатов, она вообще не была отмечена. Большинство эндофитных штаммов (68,4 %) также имели среднюю полигалактуроназную активность, а 31,6 % – низкую. У половины

фитопатогенных штаммов *A. alternata* она увеличивалась в зависимости от времени культивирования, однако у большинства эндофитных штаммов – не зависела от времени культивирования.

У штаммов *P. funiculosum* в целом зарегистрирована более высокая полигалактуронозная активность, чем у штаммов *A. alternata* и *F. poae*. Для всех почвенных сапрофитов этого вида был характерен средний уровень активности, эндофиты *P. funiculosum* оказались более активными – наряду со средним уровнем, у штамма *P. funiculosum* 16787, выделенного из листьев сабельника, отмечали высокий уровень активности (табл. 3, рис. 2). Только у трети изученных сапрофитных и эндофитных штаммов *P. funiculosum* полигалактуронозная активность возрастала с увеличением времени культивирования.

Изученные эндофитные штаммы *Mycelia sterilia* (orange), *Mycelia sterilia* (dark green) и *Mycelia sterilia* (dark red) проявили максимальную среди всех изученных штаммов полигалактуронозную активность: примерно половина штаммов проявила средний, а другая – высокий уровень полигалактуронозной активности (табл. 4, рис. 2). Только у штаммов *Mycelia sterilia* (orange) ферментативная активность зависела от времени культивирования, а для штаммов *Mycelia sterilia* (dark green) и *Mycelia sterilia* (dark red) такая зависимость не обнаружена.

Установлено, что полигалактуронозная активность изученных штаммов *Mycelia sterilia* и *P. funiculosum* в общем была значительно выше, чем у штаммов *A. alternata* и *F. poae* (табл. 1 – 4). У 84 из 85 изученных штаммов было отмечено наличие полигалактуронозной активности, большинство штаммов всех видов проявили средний ее уровень. Следует подчеркнуть, что высокая активность отмечена только у десяти эндофитных штаммов – *F. poae* 50689, *P. funiculosum* 16787 и 8 штаммов *Mycelia sterilia* (табл. 1, 3, 4, рис. 2). Не установлено четкой зависимости уровня полигалактуронозной активности изученных микроскопических грибов от скорости их линейного роста, времени культивирования, а также вида и органа растения-хозяина (табл. 1–4).

Обсуждение. Как правило, первый контакт патогенов с растениями-хозяевами происходит на поверхности растений. Проникновению возбудителей в паренхиматозные ткани способствует разрушение внутренних слоев клеточных стенок, состоящих из целлюлозы, пектина, гемицеллюлозы и структурных белков, а также срединной пластинки, которая состоит, в основном, из пектиновых веществ. Гидролиз каждого из этих веществ зачастую обусловлен действием комплекса секретируемых патогеном ферментов [8, 12, 20, 21, 23].

Расщепляющие пектин ферменты, в основном, продуцируют грибы и бактерии. Среди них следует отметить микроскопические грибы родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* и др. [8, 9, 15, 18, 21, 23].

Грибы, синтезирующие пектолитические ферменты, минерализуют растительные остатки, т.е. способствуют круговороту органических веществ в природе. Для почвенных сапрофитов, принимающих участие в почвообразующих процессах, характерно наличие полигалактуронозной активности [1, 8, 20].

Результатом расщепления пектиновых веществ, удерживающих вместе растительные клетки, является их разжижение и, соответственно, ослабление клеточной стенки. Это приводит к мацерации растительных тканей, т.е. нарушению их целостности и разделению на отдельные клетки. Ослабление клеточных стенок и мацерация тканей, несомненно, способствуют проникновению патогена в клетки тканей растений. Пектолитические ферменты обеспечивают патогенов источниками питания внутри инфицированных тканей. Вследствие образованных ими остатков растительных полимеров они могут быть вовлечены в индукцию процесса закупорки сосудов при вилте. Существует мнение, что отмирание клеток растения является результатом ослабления первичной клеточной стенки под действием пектолитических ферментов, в результате чего она не может поддерживать осмотически хрупкий протопласт и предотвращать его разрушение [8, 12].

Известно, что пектолитические ферменты участвуют в возникновении многих грибных и бактериальных заболеваний растений. Патогены продуцируют комплексы пектиназ и их изоферментов [8, 12]. Так, при черной гнили канталупы (мускусной дыни), вызванной грибом *Didymella bryoniae*, наблюдается корреляция между величиной участков гниющей ткани растения и общей полигалактуроназной активностью гриба [8, 23].

После короткого периода биотрофного роста возбудитель антракноза *Colletotrichum lindemuthianum* развивается в клетках листьев, вызывая серьезные изменения клеточной стенки и гибель протопластов. Базовый уровень эндополигалактуроназы увеличивается в несколько раз при распространении гриба в тканях растения-хозяина. Фермент вызывает интенсивное разложение пектиновых веществ первичной клеточной стенки и матрикса срединной пластинки с высвобождением пектиновых фрагментов и их накоплением в межклеточных пространствах и агрегированной цитоплазме инфицированных клеток хозяина [9, 15].

При некоторых антракнозах, вызванных видами рода *Colletotrichum*, гриб продуцирует пектинлиазу, являющуюся ключевым фактором вирулентности в развитии заболевания [21]. Некоторые пектинразрушающие ферменты способны влиять на вирулентность патогенов у разных растений-хозяев, т.е. на степень специализации патогена. Пектинразрушающие ферменты продуцируются прорастающими спорами и, вероятно, действуя в комплексе с другими гидролазами фитопатогенов, способствуют проникновению в растение-хозяин [8, 12, 15, 20].

При заражении корней пшеницы грибом *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* продуцируются эндополигалактуроназа и β -глюкозидаза [14]. При изучении образования целлюлозолитических и пектолитических ферментов разными видами рода *Fusarium* в связи с их патогенностью для проростков кукурузы установлено, что степень патогенности грибов зависит не от целлюлазной, а именно от полигалактуроназной активности возбудителя [18].

Активность пектинразрушающих ферментов грибов обнаруживали в экстрактах из здоровых яблок и яблок, пораженных различными гнилями. При гнилях, вызванных *Sclerotinia fructigena* и *Botrytis cinerea*, активность полигалактуроназы была низкой или вообще отсутствовала, а при поражении *P. expansum* активность этого фермента была очень высокой. Экстракты из каждого вида гнилей обладали очень высокой пектинэстеразной активностью и содержали галактуроновую кислоту, при этом ни в одном из них не выявлена целлюлазная активность [11].

Пектиназы *Verticillium albo-atrum*, в частности, эндопектинлиазы, являются факторами вирулентности гриба, но не определяют его патогенность, поскольку колонизация растений-хозяев может продолжаться и в отсутствие этих ферментов [15].

Таким образом, расщепляющие пектин ферменты фитопатогенных микроорганизмов относят к числу патогенных факторов, однако четкой зависимости между активностью образования пектиназ и вирулентностью фитопатогенов не установлено [8, 20].

Для олиготрофных сфагновых болот особое значение имеет полигалактуроназа эндофитных грибов, расщепляющая полигалактуроновые соединения сфагновых мхов. Именно с этими химическими соединениями у сфагновых мхов связана большая часть минеральных элементов, в том числе K^+ и $^{137}Cs^+$, которые становятся доступными для сосудистых растений благодаря действию полигалактуроназы эндофитных микромицетов [22]. В клеточных оболочках сфагновых мхов происходит ионизация слабой кислотной обменной связи полигалактуроната, что обуславливает специфическую избирательность связывания одновалентных катионов [13]. Высокую ионообменную способность сфагнумов определяет именно ионизация цепочек полигалактуроната [22], что имеет принципиально важное значение для обмена и миграции K^+ и $^{137}Cs^+$ у представителей биоты олиготрофных болотных экосистем в целом [6, 17]. Поэтому важное значение для установления роли эндофитных грибов в переносе элементов минерального питания, в том числе ионов K^+ и $^{137}Cs^+$, в системе «гриб-эндофит – растение-хозяин» имеет изучение их полигалактуроназной активности.

Нами встановлено, що в цілому полігалактуроназна активність изучених штамів *Mycelia sterilia* і *P. funiculosum* була значительно вище, чем у штамів *A. alternata* і *F. poae*. Большинство штамів изучених видів проявили середній рівень полігалактуроназної активності. Высокая активність була характерна только для ендодітних штамів. Наличие полігалактуронази у домінуючих і часто зустрічаються видів ендодітних грибів болотних рослин Полісся України свідечує о том, что ендодітніе мікроскопіческие гриби играють сушественную роль в гідролізі пектинових веществ растительних тканей, а также міграції мінеральних елементів в болотних екосистемах.

I.M. Курченко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ПОЛІГАЛАКТУРОНАЗНА АКТИВНІСТЬ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ РІЗНИХ ТРОФІЧНИХ ГРУП

Резюме

Проведено порівняльне вивчення полігалактуроназної активності 85 сапрофітних, фітопатогенних та ендодітних штамів *Fusarium poae*, *Alternaria alternata*, *Penicillium funiculosum* і *Mycelia sterilia*. Встановлено, що загалом ферментативна активність штамів *Mycelia sterilia* і *P. funiculosum* була значно вищою, ніж штамів *A. alternata* та *F. poae*. Більшість вивчених штамів проявляли середній рівень полігалактуроназної активності. Высока активність була характерною лише для ендодітних штамів: *F. poae*, *P. funiculosum* і *Mycelia sterilia*. Не встановлено чіткої залежності рівня полігалактуроназної активності вивчених штамів від швидкості лінійного росту, терміну культивування, а також виду й органу рослини-хазяїна, з яких вони були виділені. Наявність полігалактуронази у домінуючих видів та видів, що часто зустрічаються, ендодітних грибів болотних рослин Полісся України свідчить про те, що ендодітні мікроскопічні гриби відіграють суттєву роль в гідролізі пектинових речовин рослинних тканин, а також міграції мінеральних елементів в болотних екосистемах.

Ключові слова: мікроскопічні гриби, фітопатогени, сапрофіти, ендодіти, полігалактуроназна активність.

I.N. Kurchenko

Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

POLYGALACTURONASE ACTIVITY OF MICROSCOPIC FUNGI OF DIFFERENT TROPHIC GROUPS

Summary

A comparative study of polygalacturonase activity of 85 saprophytic, plant pathogenic and endophytic strains of *Fusarium poae*, *Alternaria alternata*, *Penicillium funiculosum* and *Mycelia sterilia* was conducted. It was established that in general polygalacturonase activity of *Mycelia sterilia* and *P. funiculosum* strains was significantly higher than that of *A. alternata* and *F. poae* strains. The majority of the studied strains showed a middle level of polygalacturonase activity. High activity was characteristic of only endophytic *F. poae*, *P. funiculosum* and *Mycelia sterilia* strains. The dependence of polygalacturonase activity of the studied strains on their rate of linear growth, cultivation time, as well as species and organs of host plants, which they were isolated from, was not established. The polygalacturonase presence in the dominant and common species of endophytic fungi of the bog plants of Ukrainian Polesie suggests that endophytic microscopic fungi play an important role in the hydrolysis of pectic substances of plant tissues, as well as in migration of mineral elements in wetland ecosystems.

The paper is presented in Russian.

Key words: microscopic fungi, plant pathogens, saprophytes, endophytes, polygalacturonase activity.

The author's address: *I.N. Kurchenko*, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv MSP, D 03680, Ukraine.

1. Дьяков Ю.Т. Грибы и их значение в жизни природы и человека // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 38–45.
2. Курченко И.Н. Амилитическая активность видов *Fusarium* Lk: Fr. и *Alternaria* Nees: Fr. // Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 3. – С. 36–43.
3. Курченко И.М., Соколова О.В., Жданова Н.М., Яринчин А.М., Йовенко О.М. Порівняльне вивчення целюлазної та ксиланазної активностей у фітопатогенних та ендofітних штамів грибів *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler // Там само. – 2008 а. – 70, № 4. – С. 25–30.
4. Курченко И.М., Соколова О.В., Жданова Н.М., Яринчин А.М., Йовенко О.М. Целлолазна та ксиланазна активності грибів роду *Fusarium* Lk: Fr., що належать до різних трофічних груп // Там само. – 2008 б. – 70, № 5. – С. 27–35.
5. Курченко И.Н., Соколова Е.В., Орлов А.А., Жданова Н.Н. Эндofитные микромицеты высших растений и их экологическая роль в круговороте ¹³⁷Cs в биогеоценозах сфагновых болот Украинского Полесья // Прикладная радиоэкология леса / Под ред. В.П. Краснова. – Житомир, 2007. – С. 359–412.
6. Орлов О.О., Долін В.В. Біогеохімія цезію-137 у лісоболотних екосистемах Українського Полісся / За ред. акад. НАН України Е.В. Собоновича. – К.: Наук. думка, 2010. – 198 с.
7. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
8. Agrios G.N. Plant Pathology. – New York: Academic Press, 2005 – 922 p.
9. Benhamou N., Lafitte C., Barthe J.P., Esquerré-Tugayé M.T. Cell surface interactions between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum*. Cytochemical aspects of pectin breakdown and fungal endopolygalacturonase accumulation // Plant Physiol. – 1991. – 97, N 1. – P. 234–244.
10. Cairney J.W.G., Burke R.M. Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf et Kernan: their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil // Plant and soil. – 1998. – 205, N 1. – P. 181–192.
11. Cole M., Wood R.K.S. Pectic enzymes and phenolic substances in apples rotted by fungi // Annals of Botany. – 1961. – 25, N 4. – P. 435–452.
12. Collmer A., Keen N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis // Annu. Rev. Phytopathol. – 1986. – 24. – P. 383–409.
13. Dainty J., Richter C. Ion behavior in Sphagnum cell walls // Advances in Bryology. – Vol. 5. – Biology of Sphagnum. – Berlin–Stuttgart, 1993. – P. 107–127.
14. Dori S., Solel Z., Barash I. Cell-wall-degrading enzymes associated with take-all disease of wheat: 14th Congr. Isr. Phytopathol. Soc., Bet Dagan., Febr. 15–16, 1993 // Phytoparasitica. – 1993. – 21, N 2. – С. 143.
15. Durrands P.K., Cooper R.M. The role of pectinases in vascular wilt disease as determined by defined mutants of *Verticillium albo-atrum* // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 1988. – 32, N 3. – P. 363–371.
16. Fogarty W.M., Ward O. P. Pectic substances and pectolytic enzymes // Process Biochem. – 1972. – 7, N 8. – P. 13–17.
17. Malmer N. Mineral nutrients in vegetation and surface layers of Sphagnum dominated peat-forming systems // Advances in Bryology. – V. 5. – Biology of Sphagnum. – Berlin–Stuttgart: J. Kramer, 1993. – P. 223–248.
18. Manka M. Cellulolytic and pectolytic activity of *Fusarium* isolates pathogenic to corn seedlings // Acta microbiol. pol. – 1981. – 30, N 1. – P. 25–32.
19. Molitoris H.P., Schaumann K. Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi: The Biology of Marine Fungi / Eds. Moss S.T. – Cambridge: Cambridge University Press, 1986. – P. 35–47.
20. Petrini O., Ouellette G.B. Host Wall Alterations by Parasitic Fungi. – St Paul, Minnesota, United States: APS Press, 1994. – 160 p.
21. Prusky D., McEvoy J.L., Leverenz B., Conway W.S. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence // Mol. Plant–Microbe Interact. – 2001. – 14, N 9. – P. 1105–1113.
22. Richter C., Dainty J. Ion behavior in Sphagnum cell walls. – IV. Selective cation binding by *Sphagnum russowii* cell walls // Canadian Journal of Botany. – 1990. – 68, N 4. – P. 773–781.
23. Zhang J.X., Bruton B.D. Relationship of developmental stage of cantaloupe fruit to black rot susceptibility and enzyme production by *Didymella bryoniae* // Plant Disease. – 1999. – 83, N 11. – P. 1025–1032.

Отримано 15.10.2012