

УДК 632.4:577.112.042.2

В. И. ДОМАШ, М. С. МУНТЯН, Т. П. ШАРПИО, С. А. ЗАБРЕЙКО, Т. Г. ШАБАШОВА

ПРОТЕАЗЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* И УЧАСТИЕ БЕЛКОВ-ИНГИБИТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ИХ АКТИВНОСТИ

Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск,
e-mail: valdomash@mail.ru

(Поступила в редакцию 20.03.2014)

Введение. Фитопатогенные грибы рода *Fusarium* – наиболее распространенные возбудители болезней сельскохозяйственных культур во всем мире, приводящие к ухудшению качества и значительным потерям урожая. На сегодняшний день лишь отбор устойчивых сортов является эффективной мерой борьбы с фузариозами. Именно поэтому изучение механизмов патогенеза и поиск фунгицидов нового поколения особенно актуальны. Как известно, фитопатогенные грибы способны продуцировать сложную смесь экстрацеллюлярных гидролаз, в том числе протеаз, с помощью которых происходит преодоление защитных барьеров растительной клетки и развитие болезни [1]. Целый ряд исследователей подтверждает участие протеаз различных классов в инфекционном процессе [2]. В совместной эволюции растения выработали ряд очень эффективных механизмов, обеспечивающих их защиту от атаки фитопатогенов и насекомых – вредителей. Важнейшими составляющими этих механизмов являются вещества белковой природы. В их число входят хитиназы, липоксигеназа, ингибиторы протеиназ, лектины и другие белки, обладающие антимикробной активностью [3,4]. Белковые ингибиторы протеолитических ферментов, например, обладают защитными свойствами благодаря связыванию протеаз фитопатогенов в неактивный комплекс [5].

Цель работы – изучение компонентов протеиназно-ингибиторной системы фитопатогенных грибов рода *Fusarium* для установления их роли в патогенезе.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили фитопатогенные грибы рода *Fusarium* из Национальной коллекции ИЭБ НАН Беларуси: *Fusarium trichothecioides*; *F. graminearum*; *F. gibbosum*; *F. sambucinum*; *F. moniliforme*; *F. semitectum*; *F. macroceras*; *F. culmorum*; *F. avenaceum*. Поверхностное культивирование проводили на агаризованной среде сусло – агар. Погруженное культивирование проводили на среде Чапека с различными добавками. В качестве источника секретируемых протеаз использовали культуральную жидкость. Для определения оптимума pH выращивания патогенов использовали буферы в диапазоне pH 4,0–12. Проводили также исследование действия температуры и времени культивирования на степень секреции протеаз.

Активность нейтральных протеиназ определяли по методу Ансона [6] в нашей модификации.

Активность щелочных протеиназ определяли по методу Эрлангера [7], используя синтетический Na –бензоил- DL-аргинин-п-нитроанилид (БАПА).

Активность ингибиторов трипсина определяли по методу Гофмана и Вайсблая [8]. Она сводилась к измерению уменьшения активности трипсина в присутствии ингибиторов. Трипсин расщепляет синтетический субстрат БАПА с высвобождением п-нитроанилина, что приводит к увеличению экстинкции при 405 нм. В работе использовали хроматографические методы анализа.

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли [9]. Содержание белка определяли спектрофотометрически [10] и по методу Бредфорд [11].

Результаты и их обсуждение. Наши исследования показали, что синтез экстрацеллюлярных протеаз фитопатогенных грибов зависит от состава среды, pH, температуры выращивания и времени культивирования. В ходе исследований установлено, что выращивание фитопатогенных микроорганизмов на среде Чапека не дает возможности получить секрецию протеаз высокой активности. Поэтому была проведена модификация среды Чапека, которая состояла в том, что в нее добавляли картофельный отвар и вместо NaNO_3 вносили дрожжевой экстракт. Далее проводили исследование действия pH, температуры и времени культивирования на секрецию фитопатогенами протеолитических ферментов. Результаты исследований показали, что максимальная секреция протеаз происходит на 20-е сутки выращивания при pH 7,0 и температуре 25 °С. При установленных оптимальных условиях выращены для работы 9 видов грибов рода *Fusarium*. Изучение секретируемых в культуральную жидкость протеаз показало, что уровень казеинолитической активности варьировал от 0,5 (*F. avenaceum*) до 56–70 ЕА/мл (*F. semitectum* и *F. sambucinum*). Наиболее высокая БАПА– гидролизующая активность протеаз отмечена у *F. sambucinum* (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Активность нейтральных и щелочных протеаз в культуральной жидкости фитопатогенов рода *Fusarium*

№ п/п	Наименование гриба	Активность нейтральных протеаз, ЕА/мл	Активность БАПАзы, ЕА/мл
1	<i>F. moniliforme</i>	11,0±0,2	3,0±0,2
2	<i>F. culmorum</i>	21,0±0,4	1,0±0,05
3	<i>F. avenaceum</i>	0,5±0,0	1,0±0,06
4	<i>F. macroceras</i>	9,0±0,06	2,0±0,1
5	<i>F. graminearum</i>	48,0±1,2	1,0±0,02
6	<i>F. sambucinum</i>	70,0±2,4	85,0±1,8
7	<i>F. trichothecioides</i>	10,0±1,1	2,0±0,2
8	<i>F. gibbosum</i>	24,0±1,9	0,0
9	<i>F. semitectum</i>	56,0±2,1	3,0±0,02

Некоторые авторы указывают на связь между патогенностью гриба и активностью его секретируемых трипсиноподобных протеиназ, в нашем случае такая закономерность не наблюдалась. Хотя среди наиболее распространенных возбудителей корневой гнили многих культур (например, гороха, фасоли, огурцов, дыни, арбузов, томатов) упоминаются такие виды, как *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. semitectum*, *F. javanicum*, *F. heterosporum*, они не были выявлены нами как виды, обладавшие высокой трипсиноподобной (БАПА-гидролизующей) активностью. Это может быть объяснено тем, что синтез протеаз во внеклеточное пространство индуцируется различными факторами, специфичными для разных видов грибов. Мы исследовали также мицелий экспериментальных образцов *Fusarium* на наличие у них активности протеаз и ингибиторов трипсина (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Активность нейтральных, щелочных протеаз (БАПАзы) и ингибиторов трипсина в мицелиях фитопатогенов рода *Fusarium*

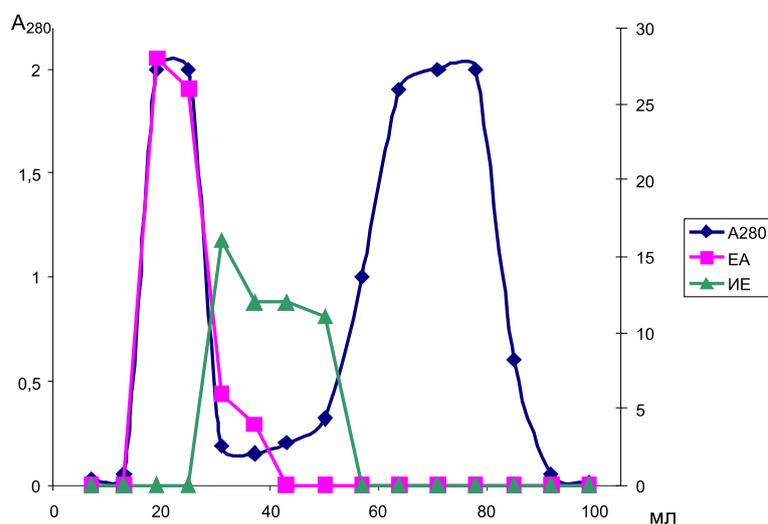
№ п/п	Наименование гриба	Активность нейтральных протеаз, ЕА/г абсолютно сухой массы	Активность БАПАзы, ЕА/г абсолютно сухой массы	Активность ингибиторов трипсина, ИЕ/г абсолютно сухой массы
1	<i>F. moniliforme</i>	0	0	3,22±0,61
2	<i>F. culmorum</i>	13,9±0,4	2,4±0,1	0,23±0,02
3	<i>F. avenaceum</i>	20,3±0,9	27,0±1,2	8,72±0,09
4	<i>F. macroceras</i>	0	32,5±1,4	3,09±0,05
5	<i>F. graminearum</i>	66,3±1,3	0	3,95±0,11
6	<i>F. sambucinum</i>	51,9±2,0	65,1±1,8	0,25±0,02
7	<i>F. trichothecioides</i>	23,9±1,8	191,5±4,2	6,20±0,15
8	<i>F. gibbosum</i>	362,7±3,2	243,6±3,5	7,16±0,32
9	<i>F. semitectum</i>	0	94,8±3,4	0,39±0,06

Как видно из табл. 2, такие виды как *F. graminearum*, *F. sambucinum* и *F. gibbosum* сохраняли высокую активность нейтральных протеаз и в культуральной жидкости и в мицелии. БАПА-гидролизующая способность также оставалась высокой в мицелии у некоторых видов, обладающих высокой активностью фермента в культуральной жидкости, а именно *F. sambucinum* и *F. semitectum*. Однако не во всех случаях наблюдается связь между наличием активности данных ферментов в культуральной жидкости и мицелии.

Поскольку активность протеаз в клетке подвергается тонкой регуляции, в том числе при помощи белков-ингибиторов, для нас представляло интерес исследование мицелия грибов данного рода на наличие ингибиторов трипсина. Как видно из табл. 2, активность ингибиторов трипсина в мицелии патогенов варьировала от 0,23 (*F. culmorum*) до 8,72 ИЕ/г абсолютно сухой массы (*F. avenaceum*). Интересно было исследовать также функциональную активность мицелиальных ингибиторов протеиназ из *Fusarium avenaceum*. Для получения частично очищенных фракций с протеиназной и ингибиторной активностью нами проведена экстракция мицелия гриба фосфатным буфером, рН 7,8. Экстракт после центрифугирования наносили на колонку с Р-30. Результаты представлены на рисунке. Исследовали активность фракций, обладающих общей протеолитической активностью и фракций с ингибиторной активностью по отношению к трипсину. Для анализа использовали ингибиторную фракцию, содержащую в 1 мл 250 мкг белка и активность 16 усл.ед. (наиболее высокое содержание). Проводили исследование действия ингибиторной фракции на угнетение активности различных концентраций фермента фитопатогена. За единицу активности фермента принимали изменение поглощения при 280 нм на 0,01. Результаты представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Изменение активности эндогенной протеиназы мицелия *Fusarium avenaceum* под действием мицелиального ингибитора

Концентрация фермента, мг/мл	Активность фермента, усл. ед/мл	Активность фермента после взаимодействия с ингибитором, усл. ЕА/мл	Угнетение активности фермента, %
0,71	8,5±0,2	3,0±0,3	64,8
0,42	7,0±0,9	2,0±0,1	71,5
0,14	5,0±0,4	1,0±0,02	80,0



Хроматография на акрилексе Р-30 экстракта из мицелия *Fusarium avenaceum*. Колонка 30×2,0 см. Нанесено на колонку 18 мг белка (по Бредфорд). EA и IE – в усл. ед/мл

Как видно из представленных данных, внутриклеточные ингибиторы трипсина, выделенные из мицелия *F. avenaceum*, до 80 % снижают активность эндогенной трипсиноподобной пептидазы. Подобные результаты были получены и для *F. graminearum*.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что у грибов существуют два пула пептидазных ингибиторов: один – внутриклеточный, используемый для регуляции активности собственных пептидаз, другой – секретлируемый, используемый фитопатогенным грибом для защиты от конкурирующих агентов.

Кроме того, наши исследования показали, что ингибиторы протеиназ растительного происхождения (из семян сои) оказывают инактивирующее действие на экзогенные протеазы фитопатогенных грибов. Так, концентрация ингибитора в 25 мг/мл подавляла активность протеаз *F. culmorum* и *F. sambucinum* в среднем на 90 %. Полученные данные подтверждают наши и литературные сведения [12] о белковых ингибиторах протеиназ как фунгицидном средстве нового поколения.

Закключение. Установлено, что максимальный выход внеклеточных протеаз фитопатогенных грибов рода *Fusarium* обеспечивается путем выращивания на модифицированной нами среде Чапека. Максимальный синтез внеклеточных протеаз фитопатогенов наблюдается на 20-й день культивирования при температуре 25 °С и рН 7,0. Определены спектры протеолитической активности нейтральных и щелочных протеаз в культуральной жидкости и мицелии 9 видов грибов рода *Fusarium*, а также получены данные об активности ингибиторов трипсина и ингибиторов экзогенных протеиназ в мицелии некоторых видов *Fusarium*. Полученные результаты вносят определенный вклад в изучение сложного биохимического механизма взаимодействия «патоген – растение» и могут быть использованы в разработке способов защиты растений. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор Б12Р-152).

Литература

1. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. М., 1987.
2. Иевлева Е. В., Ревина Т. А., Кудрявцева Н. Н. и др. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т.42, №3. С. 338–344.
3. Дунаевский, Я. Е., Цыбина Т. А., Белозерский М. А. // Агрэкология. 2000. № 10. С. 56–61.
4. Ryan C. A. // Biochim Biophys Acta. 2000. Vol. 1477. P. 112–121.
5. Мосолов В. В., Валуева Т. А. // Прикл. биохим. и микробиол. 2005. Т. 41, №3. С. 261–283.
6. Anson M. Z. // J. Gen. Physiol. 1938. Vol. 22, N 1. P. 79–89.
7. Erlanger F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. and Biophys. 1961. Vol. 96. P. 271–278.
8. Гофман Ю. Я., Вайсблай И. М. // Прикл. биохим. и микробиол. 1975. Т. 11, вып. 5. С. 777–787.
9. Laemmli U. K. // Nature. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680–685.
10. Бэйли Дж. Методы химии белков. М., 1965.
11. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, N 1. P. 248–254.
12. Lorito M., Broadway R. M., Hayes C. K. et al. // Mol. Plant-Microbe Interact. 1994. N 7. P. 525–527.

V. I. DOMASH, M. S. MUNTIAN, T. P. SHARPIO, S. A. ZABREIKO, T. G. SHABASHOVA

PROTEASE OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* AND PART OF PROTEIN PROTEASE INHIBITORS IN REGULATING THEIR ACTIVITY

Summary

This research is devoted to examining of *Fusarium* (wide spread pathogen's) proteases. As far as pathogen's proteases are supposed to be one of infection agent they are released into surrounding medium and their synthesis is induced by different factors which were established. Spectrum of alkalic and neutral proteases activities are studied as well as inhibitory activity toward trypsin both in culture medium and mycelium. It was shown that inhibitors derived from mycelium and plant inhibitors effectively suppressed pathogen's protease activity. Research results contribute to disclosure of mechanism.