

10. *Morphological and molecular characterization of fertile tetraploid somatic hybrids produced by protoplast electrofusion and PEG-induced fusion between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* Mill.* / L. H. San, F. Vedel, D. Si-hachakr, R. Remy // Mol. and Gen. Genet.— 1990.— 221, N 1.— P. 17—26.
11. *McGuire D. C., Rick C. M. Self-incompatibility in species of *Lycopersicon* sect. *Eriopersicon* and hybrids with *Lycopersicon esculentum** // Hilgardia.— 1985.— 23, N 2.— P. 101—124.
12. *Косова А. И., Кукун В. Н. Цитозембриология томата.*— Кишинев: Штиинца, 1986.— С. 230.
13. *Самсонова И. А. Изучение изменчивости пластома томата. 1. Характеристика пластоного мутанта томата* // Генетика.— 1970.— 6, № 1.— С. 36—41.
14. *Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts* / V. A. Sidorov, L. Menczel, F. Nagy, P. Maliga // Planta.— 1981.— 152, N 4.— P. 341—345.
15. *Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids* / L. Menczel, F. Nagy, Z. R. Kiss, P. Maliga // Theor. and Appl. Genet.— 1981.— 59, N 3.— P. 191—195.
16. *Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures* // Physiol. Plant.— 1962.— 15, N 3.— P. 473—497.
17. *Shahin E. A. Totipotency of tomato protoplasts* // Theor. and Appl. Genet.— 1985.— 69, N 3.— P. 235—240.
18. *Brewer G. J. An introduction to isozyme techniques.*— New York: Acad. press, 1970.— P. 230.
19. *Maurer H. R. Disk electrophoresis and related techniques of poly-acrylamide gel electrophoresis.*— Berlin: Walter de Gruyter, 1976.— P. 187.
20. *Wilson A. J., Chourey P. S. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources* // Plant Cell Rep.— 1984.— 3, N 6.— P. 237—239.
21. *Bookjans G., Stummann B. M., Henningsen K. W. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength* // Anal. Biochem.— 1984.— 141, N 4.— P. 244—247.
22. *Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ рода *Lycopersicon* Tourn.* / Под. ред. Е. Я. Глушенко и др. // Генет. ресурсы.— Л.: Изд-во ВНИИР им. Н. И. Вавилова, 1979.— С. 1—35.
23. *Грати И. Г. Цитологические основы формообразования и создания идентифицированного генофонда у томата: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.*— Тирасполь, 1986.— 32 с.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

УДК 577.1.11:632.938

Г. Ю. Перковская, А. М. Бейдер, А. П. Дмитриев

ИНДУЦИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЛУКА К БОЛЕЗНЯМ С ПОМОЩЬЮ БИОГЕННЫХ ИНДУКТОРОВ

*Методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) проведен анализ жирных кислот спиртового экстракта мицелия фитопатогенного гриба *Botrytis allii* Munn. Показано наличие C_{18} и C_{20} ненасыщенных жирных кислот. Проведенные полевые испытания препарата, содержащего смесь C_{18} ненасыщенных жирных кислот, и арахидоновой кислоты подтверждают возможность использования этих кислот в качестве биогенных индукторов. Разработан способ повышения устойчивости растений к болезням, включающий предпосевную обработку семян биогенными индукторами защитных реакций.*

Введение. В последние годы обнаружены метаболиты фитопатогенных микроорганизмов, которые распознаются растением-хозяином и служат индукторами защитных реакций. До настоящего времени мало известно об активном начале индукторов устойчивости растений (элиситоров), выделенных из микроорганизмов [1].

Ранее [2] нами показано, что элиситор из мицелия *Botrytis allii* Munn. индуцировал накопление фитоалексинов 1д и 2д и повышал болезнеустойчивость лука. Обнаруженные в цитоплазме *B. allii* индукторы защитных реакций оказались высокомолекулярными соединениями

© Г. Ю. Перковская, А. М. Бейдер, А. П. Дмитриев, 1991.

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1991. Т. 7. № 4

91

белковой и углеводной природы, содержащими липидный компонент.

Известно, что ненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая, входящие в состав биогенного индуктора из возбудителя фитофтороза картофеля, играют важную роль в процессах узнавания патогена [3—5].

В настоящем сообщении изложены результаты исследования состава жирных кислот липидного компонента биогенного индуктора из *B. allii*. Осуществлена попытка использования отечественного препарата «Линетол» и коммерческой ненасыщенной кислоты (арахидоновой, $C_{20:4}$) в качестве биогенных индукторов при защите лука в поле против пероноспороза.

Материалы и методы. Объектами исследований служили лук сорта «Сквирский» и его специфический патоген *B. allii*, вызывающий серую шейковую гниль. Культуру патогена поддерживали на питательном агаре. Мицелий гриба, выращенный на жидкой среде Чапека, экстрагировали 70 %-ным раствором этилового спирта. После удаления спирта водный остаток центрифугировали при 16 000 g 30 мин. Полученный осадок использовали для выделения липидов по методу Фолча и др. [6] смесью хлороформ : метанол : вода (2 : 1 : 0,8 по объему). Метиловые эфиры жирных кислот синтезировали способом, описанным в работе [7]. Жирные кислоты анализировали на газожидкостном хроматографе Хром-5 (ЧСФР) на колонке Silar 5CP (5 % на ChromosorbW-AW 100—120 меш). Параметры колонки: внутренний диаметр 3 мм, длина 2,5 м. Газ-носитель — гелий. Линейная скорость 40 мл/мин. Детектор пламенно-ионизационный. Скорость водорода 30 мл/мин, воздуха — 250 мл/мин. Режим изотермический. Для кислот C_{12} — C_{16} температура колонки 150 °С, инжектора — 200 °С, детектора — 250 °С. Для кислот C_{16} — C_{22} температура колонки 215 °С, инжектора — 230 °С, детектора — 250 °С. В качестве стандартов применяли коммерческие жирные кислоты.

Индуктирование защитных реакций и накопление антибиотических веществ в тканях лука определяли с помощью модифицированного метода капельных диффузатов [8]. Собранные диффузаты трижды экстрагировали бензолом, упаривали при 40 °С, перерастворяли в этиловом спирте и испытывали на прорастание тестовых спор *Fusarium solani*.

Были проведены полевые испытания защитного действия биогенных индукторов против наиболее вредоносного заболевания лука — пероноспороза. В качестве индукторов использовали препарат «Линетол», содержащий (%) 15 олеиновой, 15 линолевой, 57 линоленовой, 9—11 насыщенных жирных кислот и арахидоновую кислоту ($C_{20:4}$). Конечную концентрацию «Линетола» рассчитывали по сумме ненасыщенных жирных кислот, входящих в его состав. Лук обрабатывали предпосевным замачиванием семян в растворах биогенных индукторов непосредственно перед высевом. Развитие болезни учитывали по стандартной шкале. Подавление болезни рассчитывали по формуле

$$П = \frac{C_k - C_0}{C_k} \cdot 100,$$

где C_k — развитие болезни в контроле; C_0 — соответственно в опыте.

Результаты и обсуждение. При разделении методом ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот, выделенных из спиртового экстракта мицелия гриба *B. allii*, показано наличие ненасыщенных жирных кислот: миристоолеиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, эйкозаеновой. Известно, что наибольшей способностью индуцировать защитные реакции у картофеля в ответ на заражение *Phytophthora infestans* обладали C_{18} и C_{20} полиеновые ненасыщенные жирные кислоты [4]. В нашей системе лук — *B. allii* потенциальными индукторами могут быть олеиновая, линолевая, линоленовая и эйкозаеновая жирные кислоты. Их сумма составляет 59 % (табл. 1). В составе экстракта мицелия *B.*

allii имеется 28,5 % линолевой и 6,1 % линоленовой кислот (полиеновые ненасыщенные жирные кислоты), что составляет более 1/3 процентного содержания жирных кислот. Представляет интерес наличие у *B. allii* гептадекановой кислоты (C₁₇:0).

Поскольку арахионовая кислота, активное начало биогенного индуктора из возбудителя фитофтороза, эффективно индуцировала защитные реакции у картофеля [5], мы решили сравнить ее действие с теми ненасыщенными жирными кислотами, которые входят в состав биогенного индуктора из *B. allii*. Концентрационная зависимость индуцирующей активности арахионовой кислоты приведена в табл. 2. Максимальный защитный эффект наблюдался при концентрации арахионовой кислоты $10^{-6} \div 10^{-7}$ М.

Таблица 1
Состав жирных кислот спиртового экстракта мицелия *B. allii* Munn.

Жирная кислота	Номенклатура, C _x :y	Содержание от суммы кислот, %	Жирная кислота	Номенклатура, C _x :y	Содержание от суммы кислот, %
Каприловая	8:0	0,10	Пальмитиновая	16:0	23,32
Каприновая	10:0	0,58	Гептадекановая	17:0	3,14
Ундекановая	11:0	2,09	Стеариновая	18:0	7,33
Тридекановая	13:0	0,80	Олеиновая	18:1	14,94
Миристиновая	14:0	1,77	Линолевая	18:2	28,47
Миристоолеиновая	14:0	1,13	Линоленовая	18:3	6,08
Пентадекановая	15:0	0,63	Эйкозеновая	20:1	7,94
Пальмитиновая (разветвленная)	16:0	1,65			

Примечание. x — число атомов углерода в молекуле; y — число двойных связей.

Таблица 2
Зависимость антибиотической активности тканей лука от концентрации арахионовой кислоты (испытание токсичности — споры *Fusarium solani*)

Вариант	Концентрация, М	Проращение тестовых спор	
		Число проросших спор из 100	Отношение к контролю, %
Контроль — вода	—	91	100
Арахионовая кислота	10^{-5}	80	87,9
	10^{-6}	67	73,6
	10^{-7}	79	86,8
	10^{-8}	87	95

Таблица 3
Влияние предпосевной обработки семян лука на пораженность пероноспорозом

Вариант	Степень развития болезни, %		Подавление болезни, %
	10.08	22.08	
Необработанные семена — К ₁	4,6	35,6	—
Семена в 0,1 %-ном DMSO	3,6	18,5	48,0
Линетол, 10^{-6} М	4,2	14,4	59,6
Арахионовая кислота, 10^{-7} М	4,2	15,1	57,6

Проведенные полевые испытания показали возможность использования «Линетола» и арахионовой кислоты в качестве иммунизаторов растений. Предпосевное замачивание семян лука в растворах этих препаратов одновременно уменьшало распространение болезни и степень ее развития (табл. 3). Подавление пероноспороза при обработке «Линетолом» было на 11,6 % больше, чем в контроле, при обработке арахионовой кислотой — на 9,6 %.

Таким образом, в составе липидной фракции спиртового экстракта мицелия фитопатогенного гриба *B. allii* обнаружены ненасыщенные

жирные кислоты, способные включать защитные реакции в тканях лука. Индукция устойчивости с помощью ненасыщенных жирных кислот ($C_{18}:1$, $C_{18}:2$, $C_{18}:3$), входящих в состав препарата «Линетол», и арахидоновой кислоты обладает свойствами, характерными для других биогенных индукторов, а именно: иммунизация является системной, долгосрочной и неспецифической.

Изучение природы биогенных индукторов открывает пути к познанию молекулярных механизмов фитоиммунитета и разработке биотехнологии индуцирования устойчивости растений к болезням.

Резюме

Методом газорідинної хроматографії зроблений аналіз жирних кислот спиртового екстракту міцелію фітопатогенного гриба *Botrytis allii* Munn. Показана наявність C_{18} і C_{20} ненасичених жирних кислот. Проведені польові випробування препарату, що містить суміш C_{18} ненасичених жирних кислот, та арахідонової кислоти підтверджують можливість використання цих кислот як біогенних індукторів. Розроблено спосіб підвищення стійкості рослин до хвороб, який включає передпосівну обробку насіння біогенними індукторами захисних реакцій.

Summary

Fat acids contents of alcohol extract of *Botrytis allii* Munn. mycelium was performed by gas-liquid chromatography. C_{18} and C_{20} unsaturated fat acids were shown to be present in the extract. Field experiments of the preparation contained the mixture of C_{18} unsaturated fat acids have confirmed a possibility to use them as biotic elicitors. The method to induce disease resistance in plants has been developed including a pretreatment of seeds by elicitors of defence reactions.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Озерецковская О. Л., Чалова Л. И. Биогенные индукторы образования фитоалексинов в растениях // Микология и фитопатология.— 1985.— 19, № 3.— С. 260—268.
2. 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.— 1988.— № 1.— С. 66—69.
3. Bostock R. M., Kuč J., Laine R. A. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in potato // Science.— 1981.— 212, N 4490.— P. 67—69.
4. Preisig C. L., Kuč J. Arachidonic acid-related elicitors of hypersensitive response in potato and enhancement of their activities by glucans from *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // Arch. Biochem. and Biophys.— 1985.— 236.— P. 379—389.
5. Арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты как активное начало индуктора из возбудителя фитофтороза / О. Л. Озерецковская, С. А. Авдюшко, Л. И. Чалова и др. // Докл. АН СССР.— 1987.— 292, № 3.— С. 738—741.
6. Кейтс М. Техника липидологии.— М.: Мир, 1975.— 73 с.
7. Синяк К. М. Метод приготовления липидов крови для ГЖХ // Лаб. дело.— 1976.— № 1.— С. 37.
8. Дмитриев А. П., Тверской Л. А., Гродзинский Д. М. Индуцированные антибиотические вещества лука // Докл. АН УССР.— 1984.— № 10.— С. 72—75.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев
УкрНИИ овощеводства и бахчеводства Госагропрома УССР,
Харьков

Получено 14.01.91