

ПРЕПАРАТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Л.Ф.ГОРОВОЙ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,

И.И. КОШЕВСКИЙ

Национальный аграрный университет

В.В. РЕДЬКО, В.В. ТЕСЛЮК

Институт последипломного образования Национального университета пищевых технологий

Аннотация

В докладе представлен анализ перспективного, быстро развивающегося направления в защите растений от заболеваний, которое основано на индуцировании устойчивости с помощью определенных классов химических соединений биогенного происхождения. Рассмотрены современные представления о ключевых механизмах индукции устойчивости растений. Основное внимание уделено элиситорам полисахаридной природы – хитозану и глюканам. Представлен пример разработки нового украинского препарата “Микосан” для обработки семян и растений в период вегетации.

Потери урожая от болезней растений во всем мире имеют тенденцию к увеличению по многим культурам. Использование болезнеустойчивых сортов и пестицидов не может противостоять этому. Истребительные мероприятия создают много экологических проблем. Осознание того, что на поля ежегодно вносится от 11 до 18 кг/га сильных ядохимикатов в развитых странах вызывает серьезное беспокойство. В сознании народов этих стран исчез страх голода из-за неурожая, и поэтому государственная политика развитых стран направляется на повышение качества жизни и, прежде всего качества питания, огромные ресурсы тратятся на решение экологических проблем. С каждым годом проявляется все больший интерес к экологически чистым технологиям и биологически обоснованным методам борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур.

В связи с тяжелым экономическим и экологическим положением сельскохозяйственного сектора на поля вносится приблизительно в три раза меньшая норма ядохимикатов. Однако и это очень высокая нагрузка на экологическую систему в целом в связи с тем, что у нас самая большая в Европе доля пахотных земель – 57 % от общей территории страны.

На сегодняшний день самый экологически чистый метод защиты растений – это традиционная селекция болезнеустойчивых сортов. Однако патогенные микроорганизмы преодолевают такие барьеры и вырабатывают гены вирулентности по всем генам устойчивости гораздо быстрее, чем создаются устойчивого сорта. Новые расы патогенных организмов становятся более агрессивными. В то же время, в науке приходят к пониманию, что генетический потенциал устойчивости культурных растений достаточно высокий, но не реализуется в стрессовых условиях агроценозов. Поэтому идут поиски новых методов защиты от болезней, более совершенных по сравнению с традиционными подходами. Большой прогресс фундаментальных исследований молекулярно-генетических основ иммунитета растений открывает новые возможности повышения устойчивости растений к патогенам за счет стимулирования и управления иммунной системой с помощью биологически активных веществ. Хотя явление индуцированной устойчивости растений известно около 100 лет, практическое значение оно начало приобретать только в самые последние десятилетия.

Одной из последних монографий, в которой представлены достижения теории индуцированной болезнеустойчивости растений и методологические подходы к практической реализации накопленных знаний, является книга российского ученого, профессора С.Л.Тютерева из Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений РАСХН, изданная в 2002 г. (1). Исходя из постулата, что все растения обладают генами устойчивости и способны отвечать на заражение, С.Л.Тютерев выдвинул гипотезу о том, что можно найти

вещества стимуляторы фитоиммунных реакций и на их основе создать препараты, активирующие эти реакции в растениях против возбудителей болезней. При этом меняется вся схема защиты растений. Биологически активные вещества индукторы устойчивости растений не обладают биоцидным действием и не убивают патогена. Они позволяют только реализовать генетический потенциал устойчивости, в результате чего растение справляется с инфекцией с помощью собственных метаболитов. Объектом воздействия при таком методе является растение, а не патоген. Это позволяет индуцировать системную устойчивость растений на весь период вегетации, поэтому кратность обработок можно сократить до 1 – 2 раз за сезон.

Само воздействие должно быть направлено на экспрессию генов устойчивости растения. Для этого необходимо знать особенности функционирования иммунной системы растений и найти средства и методы воздействия на ключевые этапы реализации иммунного ответа. В настоящее время достигнут высокий уровень знаний молекулярно-биологических и генетических основ иммунитета растений (2). Хотя в этой быстро развивающейся области науки имеется много неясных вопросов и общая теория иммунитета растений еще не завершена, накопленные знания уже начинают использоваться для решения практических задач сельского хозяйства. На рынках многих стран мира появляются препараты нового поколения, способные индуцировать устойчивость растений к инфекционным заболеваниям. В большинстве случаев они еще уступают по эффективности традиционным биоцидным препаратам, но имеют важное преимущество перед ними – они не токсичны, не оказывают губительного влияния на экологическую систему и безопасны для человека. По мнению многих ученых таким биологически активным препаратам принадлежит будущее.

Целенаправленная разработка индукторов устойчивости растений и методов их применения требует знаний ключевых биохимических реакций, воздействуя на которые можно активизировать весь генетический потенциал защитных средств растений. При этом обязательно необходимо учитывать, что растение находится в эволюционно сложившейся целостной системе с окружающей средой, патогенами и другими организмами, которые могут оказывать существенное влияние на экспрессию отдельных реакций устойчивости. Для успешной защиты растений с использованием биологически активных препаратов требуется решение многофакторных задач, сложность которых на порядки выше, чем при использовании биоцидных препаратов. Это направление по праву можно отнести к самым современным высоким наукоемким технологиям.

Современный уровень знаний о молекулярно-генетических механизмах иммунитета растений говорит о большой сложности причинно-следственных и временных отношений между огромным комплексом различных биохимических реакций в растении и в клетках паразита. Часть реакций, особенно на ранних стадиях, протекает в строгой последовательности и подавление одной реакции может блокировать дальнейшее развитие иммунного ответа. Многие реакции на поздних этапах протекают одновременно, и иммунный ответ развивается лавинообразно, параллельно по многим направлениям. Между отдельными реакциями существуют регулировки по принципу обратной связи, когда продукты более поздних реакций усиливают или тормозят предыдущие реакции. Различные этапы иммунного ответа могут усиливаться или ингибироваться метаболитами патогена или условиями внешней среды.

Для определения возможностей воздействия на клеточные механизмы защиты от инфекции рассмотрим упрощенную модель протекания реакций, обеспечивающих устойчивость растений.

1. Иммунный ответ растения на контакты с патогеном начинается с реакций “узнавания” патогена по сигнальным молекулам - элиситорам. Элиситоры могут взаимодействовать с рецепторными центрами на поверхности клеточных мембран растения хозяина и включать ту или иную схему защиты. Проблемы защиты растений фактически определяются способностью вирулентных штаммов патогенов нападать “незаметно”, когда защитные реакции не включаются или включаются слишком поздно. Это так называемая система “ген-на-ген”, когда на ген устойчивости растения имеется комплементарный ген вирулентности у патогена.

2. Одновременно с реакцией “узнавания” проявляются первые ответные реакции растительной клетки на контакт с патогеном – это увеличение потока ионов кальция в клетку,

который включает комплекс ферментов фосфорилирования белков. При этом резко меняется рН – среда в межклеточном пространстве защелачивается, а внутри клетки закисляется.

3. Среди таких фосфорилируемых белков имеются гистоны и негистоновые белки, которые тесно связаны с хроматином. Они участвуют в индуцировании генов устойчивости растений. В частности, фосфорилирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы увеличивает ее активность до 9 раз.

4. Важным звеном в дальнейшем развитии иммунного ответа является активация пероксидазы и НАДФН-оксидазы. Пероксидаза участвует в двух основных защитных реакциях – лигнификации клеточных стенок растения для механической изоляции патогена, а также в образовании активных форм кислорода. НАДФН-оксидаза также запускает реакции образования активных форм кислорода, а основным продуктом этого фермента – перекись водорода, усиливает активацию пероксидазы. Быстрое образование активных форм кислорода (окислительный взрыв) с одной стороны является оружием прямого действия растения против патогена, а с другой стороны они участвуют в реакциях лигнификации клеточных стенок. Активные формы кислорода участвуют также в индукции на генном уровне специальных белков устойчивости. В результате всех предшествующих событий образуются активные комплексы сигнальных молекул с белками рецепторами и растение переходит к генной регуляции устойчивости против патогенов.

5. Считается, что описанные выше реакции мало зависят от экспрессии генов. Окислительный взрыв служит одним из активаторов второй фазы защитных реакций – транскрипции генов устойчивости. При действии активаторов устойчивости в геноме происходят существенные изменения: возрастает относительное содержание ДНК-азы и РНК-зы, увеличивается количество лабильной ДНК и РНК, полисом и активных рибосом. Об экспрессии генов свидетельствуют синтез специальных белков устойчивости и прохождение серии биохимических реакций, которые не проявляются без активации генов устойчивости или имеют низкий уровень активности. Это индукция образования фенилаланин амиак-лиазы, повышение содержания салициловой кислоты, активация фенилпропаноидного метаболизма, изменение состава фенолов, усиление антиоксидантной защиты, изменение метаболизма терпенов, усиление лигнификации, усиление синтеза фитоалексинов и ряд других реакций.

К белкам устойчивости относят, прежде всего, хитиназы и глюканазы. Это ферменты прямого действия, которые могут разрушить клеточную стенку гриба. Они считаются важнейшим компонентом природной защиты растительной клетки. Маркером индуцированной болезнеустойчивости растений является повышение активности фенилаланин амиак-лиазы. Конечными продуктами этого фермента являются несколько важных компонентов клеточной защиты – это предшественники лигнина, флавоноидов, изофлавоноидов, кумаровой кислоты, которая выступает индуктором синтеза пероксидазы и салициловой кислоты. Эти продукты обеспечивают укрепление клеточной стенки растения и приводят к образованию фитоалексинов, непосредственно действующих на патогена.

Экспрессия генома приводит к формированию индуцированной системной устойчивости или к системной приобретенной устойчивости. Сущность индуцированной устойчивости сводится к усилению синтеза ферментов, обеспечивающих противостояние инфекции, и переключение некоторых метаболических реакций с биосинтеза соединений конститутивного обмена на синтез фитоалексинов и других антипатогенных веществ.

Эти процессы допускают возможности активного влияния на естественное протекание различных реакций иммунного ответа по нескольким направлениям:

- 1) прежде всего, это использование для повышения устойчивости растений натуральных или синтетических элиситоров;
- 2) обработка растений доступными для них продуктами промежуточных реакций иммунного ответа, недостаток которых в клетке лимитирует скорость экспрессии генов устойчивости, интенсивность образования защитных белков и других фитоалексинов;
- 3) использование средств, позволяющих ускорить изменения внутренней среды и строения клеток растения в неблагоприятную для патогена сторону;

4) несомненно, большие перспективы имеют методы генетической инженерии по переносу в растения генетических конструкций, обеспечивающих усиленное антипатогенное действие. Наибольший эффект, очевидно, может принести использование этих подходов в оптимальном для каждого случая сочетании друг с другом.

Первое направление имеет большой исторический опыт. Сюда можно отнести эксперименты по иммунизации растений продуктами убитых патогенов, бактериальных и грибных культур, ослабленными или авирулентными штаммами, которые проводятся около 100 лет. В настоящее время ассортимент таких препаратов достаточно большой. Это, например, *агат-25К*, *серинаде*, *экогард*, *валеро*, *циннамит*, *T-22*, *кодиак*, *биосейв 110*, *эйкю-10*, *компаньон* и др. За два последние десятилетия это направление получило развитие во многих странах на солидном научном фундаменте и произошел переход от тотальных грибных или бактериальных культур к препаратам очищенных элиситоров. Изучаются различные химические соединения. Наибольший интерес вызывают индукторы синтеза хитиназ – хитин, хитозан и их производные. Это направление уже дает практические результаты. На рынке средств химической защиты растений появились препараты нового поколения, например, *хитозар*, *нарцисс*, *фитохит*, *агрохит* и др., которые являются индукторами устойчивости на основе хитозана. Хотя эти препараты пока уступают по эффективности биоцидным средствам защиты, но они имеют большие перспективы для совершенствования и вызывают интерес у потребителей, заботящихся об экологической безопасности.

Использование возможностей индукции устойчивости растений путем влияния на промежуточные реакции иммунного ответа до настоящего времени носит скорее научный характер. Из коммерческих продуктов известен препарат *бион* фирмы Новартис Кроп Протекшн и препарат *строби* фирмы БАСФ. Описаны и другие синтетические вещества, способные индуцировать устойчивость. Из натуральных продуктов промежуточных реакций иммунного ответа наибольшее внимание уделяется салициловой кислоте и ее производным. Эффективность обработки салициловой кислотой достаточно высокая и может сравниться с препаратами, содержащими медь. Однако, несмотря на интенсивные исследования, использование салициловой кислоты и ее производных в качестве индукторов устойчивости не находит промышленного использования по ряду причин. Во-первых, она не может конкурировать по своей биологической эффективности с *бионом* и известными биоцидными препаратами. Во-вторых, между стимулирующей и фитотоксической дозами имеется только небольшая разница. Среди других органических кислот, способных повышать устойчивость растений к заболеваниям, исследованы аминокислоты, жасмоновая, арахидоновая, щавелевая, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. Во всем мире ведутся работы по созданию индукторов устойчивости с использованием в качестве активных компонентов таких кислот.

Сочетание элиситора (хитозана) с органическими кислотами использовано при создании российских препаратов *хитозар*, *нарцисс*, *фитохит*, *агрохит*. Такое сочетание существенно повысило биологическую эффективность этих препаратов по сравнению с чистым хитозаном. Однако, несмотря на исследования большого числа композиций с хитозаном, эффективность таких препаратов отстает от эффективности биоцидных препаратов. Поэтому интенсивные работы в данном направлении продолжаются.

В нашей работе по созданию препарата индуктора устойчивости растений использовались такие же принципы, но основное внимание было уделено другим соединениям, обладающим свойствами элиситоров. Эти исследования базировались, прежде всего, на знаниях строения клеточной стенки грибов (3). Ультраструктура и биохимический состав клеточных стенок исследованы у всех групп грибов. Для нашего подхода важными являются следующие факты: 1) хитин составляет самый внутренний слой клеточной стенки, а клеточная стенка грибов такой важной в фитопатологическом отношении группы как Оомицеты вообще не содержит хитина; 2) у всех групп грибов имеются глюканы, которые составляют основную часть массы клеточной стенки и являются цементирующим матриксом для хитиновых микрофибрилл; 3) из глюканов состоят наружные слои клеточной стенки и именно они первыми контактируют с клеточной стенкой растения-хозяина; 4) часть глюканов клеточной стенки имеет небольшую молекулярную массу, растворяется в воде и выделяется грибом в ближайшее окружение гифы; 5) хитиновые микрофибриллы ковалентно связаны с глюканами и поэтому труднодоступны для ферментов, в то время как глюканы клеточной стенки легко доступны для литических ферментов.

Из этих фактов мы сделали вывод, что при разработке препаратов индукторов болезнестойкости растений среди многих сигнальных молекул приоритет должны иметь глюканы как элиситоры, способные включать гены устойчивости и приводить к усиленному синтезу глюканаз и других фитоалексинов. Элиситорные свойства глюканов известны давно (4). Существует огромное разнообразие глюканов, которые отличаются друг от друга типом и местом глюкозидных связей (*a-1,3-*, *b-1,3-*, *b-1,4-*, *b-1,6-*), молекулярной массой, местом и длиной боковых ответвлений, наличием в молекулах кроме глюкозы других сахаров. Многие глюканы могут легко биодegradировать и образовывать из высокомолекулярных соединений низкомолекулярные цепочки и олиоглюканы, что увеличивает их разнообразие. Это существенно затрудняет их изучение. Далеко не всякие глюканы являются элиситорами. Например, из клеточных стенок гриба *Phytophthora megasperma f.sp. glycinea* было выделено 300 глюканов и только один из них обладал элиситорными способностями. Это глюкан, в котором 5 остатков глюкозы линейно связаны *b-1,6-* связями, а у второго и четвертого остатков имеются боковые ответвления, связанные с основной цепочкой *b-1,3-* связями (5). Этот глюкан обладает элиситорной активностью в концентрации 10 нМ, в то время как его многочисленные аналоги не проявляют активности даже при концентрации 200 мкМ. Элиситорными способностями обладают не только грибные глюканы, но и глюканы

водорослей. Некоторые низкомолекулярные грибные глюканы могут обладать свойствами супрессоров реакций устойчивости растений. Их синтез, вероятно, контролируется генами вирулентности патогена.

Все эти сложности тормозят создание коммерческих препаратов для защиты растений на основе глюканов. Из таких препаратов нам известен *политран* L. Наши исследования были направлены на поиски биологически активных глюканов у высших базидиальных грибов. Эта группа исследована в наименьшей степени. С учетом технико-экономических критериев мы ограничили скрининг потенциальных грибов продуцентов только широко распространенными видами дереворазрушающих афиллофоральных грибов. В наибольшей степени всем критериям удовлетворяет трутовик обыкновенный - *Fomes fomentarius*. Учитывая, что одной из самых первых реакций растения на контакт с патогеном является защелачивание среды в межклеточном пространстве, мы отказались от использования в своем препарате органических кислот, которые играют важную роль в иммунном ответе на более поздних стадиях. Щелочная среда препарата способствует лучшему растворению глюканов. Щелочной экстракт глюканов афиллофоральных грибов мы дополнили углеаммонийными солями. Созданный препарат получил название “Микосан” и имеет две модификации: “Микосан-Н” для предпосевной обработки семян и “Микосан-В” для обработки растений в период вегетации. Он прошел полную программу лабораторных, мелкоделяночных, полевых промышленных испытаний на многих сельскохозяйственных культур и зарегистрирован в Украине в начале 2002 г. В Украине создано производство бифунгицида “Микосан” на предприятии ООО “Микотон-Агликон”, в Киевской области город Боярка.

По токсикологическим исследованиям препарат отнесен к четвертой, самой низкой категории токсичности и является экологически безопасным. Основным критерием для широкого использования биопрепаратов для защиты растений является их эффективность. Уже первые исследования, проведенные И.И.Кошевым в Национальном аграрном университете Украины показали, что “Микосан” не уступает, а по некоторым показателям эффективности превосходит известные химические препараты западных фирм (табл.) (6, 7). Композиции “Микосана” с хитозаном дали более низкие показатели эффективности, чем чистый “Микосан”, но эти показатели были выше, чем у хитозана с добавкой углеаммонийных солей. Аналогичные результаты позже были получены по многим другим культурам.

Результаты многолетних испытаний “Микосана” в разных организациях и сельхозпредприятиях в различных эколого-климатических зонах Украины, в России и в

Таблица. Влияние предпосевной обработки семян ярового ячменя на основные показатели эффективности препарата (6)

| Вариант опыта | Энергия прорастания, % | Полевая всхожесть, % | Длина растений, см | Биологическая эффективность, % | | | Масса 1000 зерен, г | Урожайность, ц/га |
|-------------------|------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| | | | | Fusarium spp. 23 этап | Fusarium spp. 73 этап | Ustilago nuda | | |
| Контроль | 45,3 | 78,2 | 62,0 | - | - | - | 47,1 | 30,6 |
| Витавакс 200 ФФ | 56,9 | 83,9 | 70,0 | 63,8 | 72,7 | 100 | 50,6 | 36,2 |
| Микосан | 60,7 | 88,9 | 78,4 | 61,1 | 70,8 | 100 | 51,4 | 37,6 |
| Микосан + хитозан | 52,7 | 80,2 | 77,0 | 55,5 | 66,4 | 100 | 49,8 | 35,9 |
| хитозан +УАС | 49,2 | 81,4 | 68,6 | 52,7 | 52,6 | 87,5 | 48,2 | 31,4 |
| НСР ₀₅ | 4,73 | 4,65 | 5,21 | 4,5 | 4,4 | 4,8 | 3,1 | 0,9 |

УАС – углеаммонийные соли

Германии подтверждают, что выбранные нами подходы к созданию препаратов индукторов устойчивости растений являются правильными и перспективными. “Микосан” фактически является первым препаратом среди аналогов, который удовлетворяет трем главным критериям, предъявляемым к новым средствам защиты растений: эффективность, экономичность, экологическая безопасность и безвредность для человека. По эффективности он не уступает современным биоцидным препаратам ведущих фирм мира, а по некоторым показателям даже превосходит их. В частности, он проявляет свойства биостимулятора – увеличивает энергию прорастания и повышает всхожесть семян, улучшает биометрические показатели. “Микосан” не дорогой в производстве и предлагается по более низкой цене, чем другие современные химические препараты. Он не токсичен и безопасен во всех отношениях. Это открывает реальные перспективы перехода от опасных биоцидных препаратов к современным биологическим методам защиты растений от заболеваний. Потенциал такого направления только начинает открываться. Для его развития требуется углубление и расширение фундаментальных исследований, а также разработки новой методологии практического применения таких препаратов.

Список литературы

1. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. Санкт-Петербург, 2002. 328 с.
2. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. Москва: Изд-во Общества фитопатологов, 2001. 302 с.
3. Горовой Л.Ф., Бурдюкова Л.И. Цитология и генетика, 1997, Т. **31**, 1. №. 70-81
4. Ayers A.R., Ebel J., Rinelli F., Berger N., Albersheim P. *Plant Physiol.* 1976. V. **57**, p. 751-759.
5. Yoshikawa M., Yanoaka N., Takeuchi Y. *Plant Cell Physiol.* 1993. V. **34**, p.1163-1173.
6. Горовой Л.Ф., Кошевский И.И., Теслюк В.В., Трутнева И.А. Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. Мат. 6-й конф. Москва-Щелково, 22-24 октября, 2001. М.: Изд-во ВНИРО, 2001. С. 78-81.
7. Кошевский И.И., Теслюк В.В. Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. Мат. 6-й конф. Москва-Щелково, 22-24 октября, 2001. М.: Изд-во ВНИРО, 2001. С. 85-87.