

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

КУЛЕШОВА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАЗНЫХ СОРТОВ
ЯЧМЕНЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Павловская Н. Е.

Орел – 2014

Оглавление

Список сокращений	4
1. Введение	5
2. Литературный обзор	8
2.1. Значение ячменя в народном хозяйстве	8
2.2. Химический состав зерна ячменя	11
2.3. Болезни и микробиота ячменя	16
2.4. Роль антибиотиков и рынок	21
2.5. Влияние антибиотиков на животные организмы.	30
2.6. Влияние антибиотиков на сельскохозяйственные растения	33
2.7. Устойчивость ячменя к возбудителям болезней	38
2.8. Цель и задачи работы	62
3. Объект и методы исследования	62
3.1. Ботаническое описание генотипов ячменя	63
3.2. Методы выделения гордецина и его спектрофотометрическое определение, очистка и идентификация методами ВЭЖХ, масспектрофотометрии и ЯМР	67
3.3. Методы выращивания растений гороха	71
3.4. Инфицирование гороха возбудителем корневых гнилей <i>Fusarium oxysporum</i> L.	71
3.5. Видовая принадлежность плесени, образующейся на корнях ячменя	72
3.6. Методы выделения антибиотиков из плесени ячменя	74
Глава 4. Результаты и обсуждение	76
4.1. Скрининг генотипов ячменя коллекции ВИР на содержание гордецина	76
4.2. Динамика синтеза гордецина в проростках ячменя	78
4.3. Химическая природа гордецина из ячменного зерна	80

4.4. Видовая принадлежность плесени, образующейся на корнях ячменя...	87
4.5. Наличие антибиотиков в корневой плесени ячменя	96
4.6. Исследования биологической активности антибиотиков на растительных тканях	99
4.7. Влияние гордецина и плесени на активность антиоксидантных ферментов проростков гороха сорта Батрак, зараженного <i>Fusarium oxysporum</i>	102
5. Заключение.	108
6. Выводы.....	111
7. Список литературных источников.	113
8. Приложение.	127

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

БАД - биологически активные добавки

ВИР - Всероссийский институт растениеводства

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГО - гиперчувствительный отклик

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТНБ - дитионитробензоат

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ - колониеобразующая единица

ЛПУ - локальная приобретенная устойчивость

МПА – мясо-пептонный агар

ПОЛ - перекисное окисление липидов

РАК – разновидности активного кислорода

СПУ - системная приобретенная устойчивость

СОД - супероксиддисмутаза

ЯМР – ядерно- магнитный резонанс

1. Введение

Сложившаяся к настоящему времени в России критическая ситуация с производством антибиотиков диктует необходимость изыскания новых источников для их выделения и производства. По оценкам маркетологов, в ближайшие годы ожидается падение российского производства антибиотиков. Основными причинами являются изношенность основных фондов, морально устаревшая номенклатура субстанций в условиях необходимости создания новых более эффективных лекарств, мощная конкуренция со стороны зарубежных производителей. «В России выпускать составляющие для производства антибиотиков стало невыгодно, так как отечественные фармпроизводители не могут составить конкуренцию таким странам, как Китай и Индия, субстанции которых гораздо дешевле», - считает гендиректор НПО "Микроген" Минздрава РФ Антон Катлинский.[137]

подавляющее большинство антибиотиков, нашедших применение в медицине и народном хозяйстве, получено из грибов - представителей рода *Aspergillus*, которые используются в виде настоев, вытяжек, мазей, порошков, таблеток, входят в составы многочисленных БАДов, и могут служить сырьем для промышленного производства антимикробных соединений.

Однако в настоящее время многие антибиотики стали неэффективны, в связи с чем требуется усилить исследования по поиску веществ, обладающих антимикробной и противовирусной активностью. Источниками получения подобных веществ, кроме микроорганизмов, являются растения и в том числе злаковые, к которым относится ячмень.

Солод, являющийся основой приготовления пива, представляет собой пророщенное зерно ячменя, который отличается повышенным содержанием противовирусных и антибактериальных веществ, в том числе лизина и гордецина. В связи с этим ячменные отвары и настои являются популярным средством народной медицины для лечения грибковых и воспалительных заболеваний кожи, желудочно-кишечного тракта и органов дыхания. Зерна ячменя служат

сырьем для производства бактерицидных и противовирусных фармацевтических препаратов.

В середине прошлого века Новотельновым Н.В. и Ежовым И.С. (1957) из солодовой воды на пивоваренном заводе был выделен гордецин и установлена его химическая структура, проведены исследования его влияния на патогенную микрофлору. Однако исследования были свернуты и это интересное и перспективное вещество предано забвению.

Целью данной работы было выявление источника гордецина из зерен и антимикробных веществ из корневых плесеней ячменя.

Задачи:

- Провести скрининг генотипов ячменя коллекции Всероссийского института растениеводства на наличие гордецина.
- Установить видовую принадлежность плесени и бактериальной обсемененности на корнях ячменя.
- Выявить наличие антибиотиков в корневой плесени ячменя.
- Провести исследования биологической активности антибиотиков на растительных тканях.
- Изучить влияние гордецина на активность антиоксидантных ферментов гороха, зараженного *Fusarium oxysporum* L.
- Выявить связь между содержанием антибиотиков и устойчивостью ячменя к болезням.

Научная новизна. Впервые проведен скрининг генотипов ячменя коллекции ВИР им.Н.И.Вавилова на содержание антибиотических веществ.

Разработана оригинальная методика выделения гордецина из малых проб зерна ячменя и высокоэффективная жидкостная хроматография для очистки гордецина. Гордецин в условиях снятия масс-спектра переходит в окисленную форму.

Впервые установлено, что развитие плесени на корнях различных генотипов ячменя обратно пропорционально содержанию гордецина в зерновках и строго повторяется по образцам.

Установлена избирательность действия гордецина на возбудителя корневых гнилей *Fusarium oxysporum*.

Практическое значение. Выявленная четкая зависимость между содержанием гордецина, полеганием и устойчивостью к грибным заболеваниям у отдельных генотипов, что дает возможность отбора соответствующих по данным признакам образцов для включения их в селекционную программу создания устойчивых сортов ячменя.

У инфицированных проростков гороха гордецин оказывает избирательное действие на гриб *Fusarium oxysporum*, угнетая его развитие и оказывая выздоравливающее влияние на больные проростки гороха, что дает основание отнести гордецин к компоненту защиты клеток растений от возбудителя корневых гнилей и увядания. Гордецин может стать компонентом для создания новых биологических средств защиты растений.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработана оригинальная методика выделения гордецина из малых проб зерна ячменя и ВЭЖХ для его очистки.
2. Разброс данных на содержание антибиотических веществ в зерне генотипов ячменя коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова составляет 1 мг/% - 12 мг/%.
3. Развитие и объем плесени на корнях различных генотипов ячменя обратно пропорционально содержанию гордецина в зерновках и строго повторяется по образцам.
4. Гордецин в нанодозах (10^{-12} М) угнетает развитие здоровых побегов гороха, увеличивает образование свободных радикалов в клетках, что выражается в снижении активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы.

5. У инфицированных проростков гороха гордецин оказывает избирательное действие на гриб *Fusarium oxysporum*, угнетая его развитие и оказывая выздоравливающее влияние на инфицированные проростки гороха, усиливая ростовую активность корней и повышая активность антиоксидантных ферментов.

2. Литературный обзор

2.1. Значение ячменя в народном хозяйстве

(лат. *Hórdeum*) — род растений семейства Злаки, один из древнейших злаков, возделываемых человеком. История культивирования ячменя, одной из наиболее распространенных в мире злаковых культур, начала свой отсчет в глубокой древности. На территории нынешней России ячмень выращивают более 5000 лет. На Руси ячмень издавна находил широкое кулинарное применение. Пророщенные зерна этого злака являлись основным сырьем для приготовления кваса, пива, ячменного уксуса, выпечки, а отвары из ячменных зерен в русской кухне использовали в приготовлении супов, каш, киселей и похлебок.

Основная часть посевных площадей ярового пивоваренного ячменя сосредоточена в европейских странах, где благоприятные погодно-климатические условия способствуют получению высоких урожаев зерна, соответствующего ГОСТу на пивоваренный ячмень. Если в мировом производстве зерна ячмень занимает четвертое место после пшеницы, риса и кукурузы, то в Украине эта культура является второй зерновой культурой после пшеницы. В отдельные годы посевная площадь занимает свыше 5,0 млн. га. Его выращивают во всех почвенно-климатических зонах, особенно, в Степи и Лесостепи.[129]

Большое кормовое значение зерна ячменя, неприхотливость возделывания и довольно высокая урожайность определяют значительное распространение этой культуры. По данным ФАО, в мире ячмень занимает 60-70 млн. га. Россия значительно уступает по урожайности этой культуры

странам Европы. Урожайность ячменя в таких странах как Дания, Франция, Германия превышает 50 ц/га. Сбор ячменя с площади около 10 млн. га в этих странах составляет более 48 млн. тонн, тогда как в нашей стране с той же площади собирают лишь 19 млн. тонн зерна ячменя.[131; 133]

Основное количество зерна ячменя используется на фуражные цели. Зерно ячменя является отличным концентрированным кормом с высоким содержанием белка. Оно содержит весь набор незаменимых аминокислот, в том числе лизин и триптофан. В его зерне содержится 11,8% протеина, 2,3% жира, 2,8% золы и 65—72% безазотистых экстрактивных веществ.

При откорме свиней зерном ячменя получен более высокий производственный и экономический эффект, чем при кормлении зерном других зерновых культур. На 1 кг привеса свиней расходуется 4 – 4,5 кг ячменя, тогда как кукурузы 5,0 – 5,3 кг, а пшеницы 6,0 – 7,9 кг.

На фураж используются более высокобелковые сорта ячменя. Благодаря своим высоким кормовым качествам зерно ячменя и продукты его переработки намного питательнее других концентрированных кормов. Так, в 1кг зерна содержится 1,2 кормовые единицы и 100 граммов переваримого протеина.

Ячневая крупа — это дроблёные ячменные ядра, освобождённые от цветочных плёнок. Преимущество ячневой крупы в том, что в отличие от перловки она не подвергается шлифовке, поэтому в ней больше клетчатки. Перловая крупа — это цельные ячменные зёрна, очищенные и шлифованные. Своё название перловка получила потому, что цветом и формой напоминает речной жемчуг.

Ячневую и перловую крупы получают из ярового и озимого ячменя. В народной медицине отвар ячменной и перловой круп используют при воспалительных заболеваниях желудка и кишечника, как общеукрепляющее средство после операций на органах брюшной полости и для смягчения кашля. Несколько лет назад ученые обнаружили в белке ячменя такие вещества как триглицерид и токотриенол, способные значительно снижать уровень холестерина в крови. Ячменную муку добавляют (10-15%) при выпекании ржаного и пшеничного хлеба. Через низкое качество клейковины хлеб из

чистой ячменной муки малообъемной, слабопористой, быстро черствеет. Из зерна ячменя изготавливают суррогат кофе.

Особенностью ячменной муки является большое количество полисахарида β глюкана, обладающего холестерин-понижающим эффектом, хорошее соотношение между белком и крахмалом, богатое содержание провитамина А, витаминов группы В и минеральных веществ: кальция, фосфора, йода, особенно много кремниевой кислоты.[131]

Известно около 30 видов ячменя, из которых наибольшее значение имеют *Hordeum distichon* — Ячмень двухрядный и *Hordeum vulgare L.* — Ячмень обыкновенный.[35] Ячмень обыкновенный подразделяется на два подвида - двухрядный и многорядный. Некоторые исследователи считают эти подвиды самостоятельными видами. Возделываются двухрядные и многорядные, преимущественно пленчатые ячмени. Озимые ячмени почти все многорядные, ярые — преимущественно двухрядные.

В России на кормовые цели используют до 70 % ячменя, возделываются по преимуществу яровые сорта.

Озимый ячмень младше, чем ярый примерно на 2000 лет. В настоящее время в многих странах наблюдается переход по выращиванию озимого ячменя. Практически полностью на осенний сев перешли Румыния и Болгария. Яровой ячмень возделывают на всей земледельческой территории России - от Заполярья до субтропиков. Однако в тех районах, где обеспечивается хорошая перезимовка озимых, например на Северном Кавказе, Крыму, Закавказье, целесообразно выращивать более урожайный озимый ячмень.

Для создания новых сортов сельскохозяйственных растений, обладающих комплексом ценных признаков, высокой урожайностью и высоким качеством продукции в разнообразных условиях среды, пригодных для энергосберегающих и природоохраняющих агротехнологий, требуется хорошо изученный исходный материал. Вопрос о выборе наиболее перспективных родительских форм для скрещиваний из имеющегося разнообразия

генетических ресурсов сельскохозяйственных растений до сих пор остается одним из самых трудных и ответственных моментов в селекционном процессе.

Коллекция зернофуражных культур ВНИИР им. Н.И. Вавилова является основным источником нового исходного материала для обеспечения селекционных программ по созданию новых конкурентоспособных сортов. В институте собрана одна из самых больших коллекций. Она насчитывает около 18000 образцов по ячменю разного географического происхождения.[33]

Практически все мировое разнообразие форм озимого ячменя представлено в коллекции ВИР. Коллекция озимого ячменя насчитывает 3400 образцов. Генетическое разнообразие РФ представлено 500 образцами, в основном, это местные формы и стародавние сорта (320 образцов), собранные в 20-30-е годы XX столетия в Ставропольском и Краснодарском краях, Ростовской области, Чечено-Ингушетии, Кабардино-Балкарии и Дагестане, и новые сорта и селекционные линии. Среди образцов зарубежного происхождения 1150 образцов - это местные формы стран Европы, Азии и республик бывших СССР. В основном коллекция озимого ячменя представлена сортами озимого ячменя Европейских стран. За последние 5 лет коллекция пополнилась 100 образцами озимого ячменя. В основном это сорта Франции, Германии, Югославии. При работе с коллекцией зернофуражных культур особое внимание уделяется комплексному изучению образцов по важным хозяйственно ценным признакам и выявлению источников и доноров, которое проводится согласно методике ВИР.[34]

2.2.Химический состав зерна ячменя.

Хозяйственное значение и использование ячменя обыкновенного, или озимого (*Hordeum vulgare*) определяется его химическим составом. Зерно содержит в среднем 12% белка, 65% углеводов, 2,1 % жира и идет на приготовление перловой и ячневой круп, суррогата кофе, муки для выпечки лепешек, реже - хлеба, который получается низким, слабопористым, быстро черствеющим из-за невысоких качеств клейковины. Озимый ячмень в составе

своего белкового комплекса имеет больше 20 аминокислот, 8 из них незаменимые. Белок ячменя более полноценен, чем у других культур, но содержит мало лизина - 2,5-3,2%.

Ячмень состоит на 12—20% из воды и 88—80% сухого вещества. Влагосодержание спелого ячменя перед уборкой зависит от погодных условий при созревании и от урожая: в районах с теплым сухим климатом оно составляет 12—14%, в районах с климатом прохладным и влажным.

К углеводам в ячмене относятся — 16—20 и даже более процентов, в основном крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза, гумми, водорастворимый сахар, продукты расщепления различных полисахаридов.

Моносахариды в зерне представлены главным образом глюкозой, фруктозой; дисахариды - сахарозой. Сахароза в основном находится в зародыше и алейроновом слое, фруктоза и глюкоза - в эндосперме.

В состав зерна ячменя входит относительно небольшое количество крахмала (по сравнению с рожью, пшеницей, горохом, кукурузой) и достаточно много клетчатки (до 9%) (по ее количеству ячмень превосходит большинство известных злаковых культур, уступая лишь овсу). В ячменном зерне содержание крахмала колеблется от 55 до 66%, в пшеничном — от 53 до 70%.

Основное количество целлюлозы находится в цветковой оболочке, следы ее имеются в зародыше, а также в плодовой и семенной оболочке. Состав зерна ячменя (как и состав овсяного зерна) характеризуется высоким содержанием водорастворимых пищевых волокон бета-глюканов, способствующих очищению организма от вредных веществ и снижению в крови уровня сахара и «плохого» холестерина.

Именно благодаря пониженному содержанию крахмала и значительному количеству бета-глюкановых волокон крупы, выработанные из ячменных и овсяных зерен, имеют с точки зрения диетологов явное преимущество перед другими крупами (пшеничной, ржаной, гречневой и др.), и в связи с этим могут претендовать на звание наиболее полезных диетических продуктов питания.

На гемицеллюлозы и гумми приходится около 10% сухого вещества ячменя. Их количество колеблется в зависимости от степени спелости ячменя и зависит также от климатических условий во время роста.[125]

Состав ячменного зерна отличается оптимальным соотношением белков (до 15,5%). Основная часть белковых веществ находится в ячменном зерне. В солоде она состоит из высокомолекулярных, преимущественно нерастворимых в воде и не содержащих фосфора белковых веществ, систематизированных по Осборну. Выделяют четыре большие группы таких веществ: альбумин ячменя, на долю которого приходится около 4% белковых веществ, называют также «лейкозином»; глобулины ячменя имеют также название «эдестин», от них зависит мутность пива. Проламин ячменя горденин играет роль как составная часть обратимого и необратимого помутнения пива.

В пивоваренном производстве высокое содержание белка в ячмене нежелательно, так как сопровождается пониженным содержанием крахмала, что отрицательно сказывается на экстрактивности солода.

Содержание белка в ячмене обусловлено сортом, но прежде всего факторами окружающей среды. Особенно важны погодные условия во время роста и созревания, вегетационный период, предшественник и удобрения. По данным Глуховцева В.В и др. (2011), формирование количественного и качественного состава белка в зерне различных по происхождению и характеру использования сортов ярового ячменя меняются под влиянием резко контрастных природно-климатических условий.[7]

Выявлена определенная корреляционная зависимость содержания белка и ряда аминокислот от условий вегетации культуры.

Для оценки биологической ценности белка зерна целесообразнее определять аминокислотный состав суммарного белка зерна, а не отдельных белковых фракций. Поэтому в ходе исследований аминокислотный состав был изучен в суммарном белке зерна ряда сортов ярового ячменя. Для конечной стадии созревания зерна, формирования завершённой картины его

аминокислотного состава большое значение имеют погодные условия в период вегетации.[22]

Ячмень содержит растворимые в эфире жиры (липиды) в количестве около 2% по сухому веществу. Две трети жиров находятся в алейроновом слое и одна треть — в зародыше. Присутствие жиров в сусле нежелательно, так как они отрицательно влияют на ценообразование, стабильность и вкус пива.

Ячмень и солод богаты витаминами, которые локализуются в живых тканях зародыша и алейронового слоя. В 100 г сухого вещества ячменя содержится 8—15 мг никотиновой кислоты, 0,12—0,74 мг витамина В1 0,3—0,4 мг витамина В6(пиридоксина) и 0,1 — 0,37 мг витамина В2 (рибофлавина). За время проращивания содержание последнего увеличивается в 1,5 раза. Наряду с этим в ячмене имеются еще витамин Н (биотин), пантотеновая, фолиевая и гамма-аминобензойная кислоты. Содержащийся в составе ячменного зерна комплекс витаминов группы В принимает активное участие во многих процессах, протекающих в человеческом организме (энергетический, белковый, жировой, водно-солевой обмена, процесс кроветворения), регулирует функции нервной, сердечно-сосудистой, мышечной и пищеварительной системы, способствует поддержанию нормального гормонального баланса в организме человека.

Входящие в состав зерна ячменя витамины А, Е и D в комплексе с витаминами группы В способствуют полноценному росту организма человека, нормализации зрения, улучшению состояния хрящевой и костной ткани, кожного покрова, слизистых оболочек внутренних органов, а также играют значительную роль в укреплении иммунитета, профилактике инфекционных и онкологических заболеваний.[8; 24] К фенольным веществам относятся простые фенольные кислоты и высокомолекулярные полифенолы, обладающие способностью осаждать белки. Из фенольных кислот в ячмене обнаружены ванилиновая кислота, локализованная в мякинной оболочке как в свободной, так и в связанной форме, сиреневая, феруловая, пара-оксибензойная и кумариновая кислоты.

Общее содержание минеральных веществ ячменя составляет 2,5—3,5% по сухому веществу. В зависимости от дозы внесенных удобрений, особенностей климата и почвы соотношение минеральных веществ может колебаться. Большая часть минеральных веществ состоит из калия и фосфорной кислоты, т. е. из фосфатов калия. На биологическое состояние ячменя сильное воздействие оказывают содержащиеся в нем микроэлементы магний, никель, сера, марганец, селен, йод, цинк, бром, медь, кобальт, хром, фтор и др. Ферменты играют важную роль во всех жизненных процессах, в том числе в процессе обмена веществ при проращивании ячменя, в процессах жизнедеятельности клетки. Их действие продолжается и после прекращения жизнедеятельности организма.

Едва ли другая отрасль промышленности в такой же степени опирается на действие ферментов, как солодоращение и пивоварение; именно ферменты вызывают изменения при проращивании; основные процессы при затирации идут с помощью ферментов солода; наконец, после разрушения этих ферментов при варке сусла с хмелем после введения дрожжей начинают действовать новые комплексы ферментов, которые затем участвуют в сбраживании сусла.[29; 132]

Поведение ферментов класса оксидоредуктаз при солодоращении и парке исследовано наиболее детально, так как можно предположить, что в процессе окисления они влияют на фенольные вещества солода и свойства пива, и прежде всего на его цвет и стабильность.

В ячмене каталаза содержится в малом количестве. При проращивании она возрастает в 40—70 раз, но уже при замачивании быстро уменьшается. В высушенном солоде каталаза не содержится.

Пероксидазы расщепляют перекись водорода или органические перекиси в присутствии донора водорода, в качестве которого может выступать фенол, ароматический амин или ароматическая кислота.

В ячмене пероксидаза содержится в малом количестве, которое при проращивании увеличивается в 7—9 раз, но при замачивании и сушке вновь

сокращается на треть. При затирании фермент хорошо переносит температуру 50° С, при температуре 65° С частично инактивируется.

Полифенолоксидазы являются оксидазами со смешанными функциями, у которых продукт окисления, дифенол, одновременно играет роль донора водорода.

Большая часть полифенолоксидаз окисляет дифенолы. Под действием этого фермента могут окисляться антоцианогены, причем продукты реакции образуют с себе подобными или с протеинами продукты конденсации и уже не обнаруживаются как антоцианогены.

В ячмене полифенолоксидаза проявляет относительно высокую активность, которая при проращивании увеличивается вдвое. Активность зависит от сорта, места возделывания и климатических особенностей года. При поддержании в течение 4 ч температуры сушки 100° С солод сохраняет еще 60% активности.

С точки зрения технологии солодоращения и пивоварения представляют интерес ферменты, относящиеся к классам гидролаз (3 класс) и оксидоредуктаз (1 класс). Гидролазы расщепляют гликозидные (карбоксихидролазы), эфирные (эстеразы) и пептидные связи (пептидазы) путем присоединения радикалов воды. Оксидоредуктазы катализируют отделение или присоединение водорода. Это каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза, липоксигеназа. Все эти ферменты находятся либо в зародыше, либо в алейроновом слое, либо и в зародыше и алейроновом слое одновременно, например, β -амилаза, пептидаза. [94]

2.3. Болезни и микробиота ячменя

Одной из причин снижения урожая у озимого ячменя нередко является поражение растений и зерна болезнями. Наиболее распространенными и вредоносными в зоне возделывания являются мучнистая роса, карликовая ржавчина, листовые пятнистости. Потери урожая от этих болезней составляют от 10 до 50 %. В связи с изменением климатических условий в сторону

потепления увеличилась частота эпифитотий листостебельных болезней. Селекция на устойчивость к патогенам является наиболее экономичным и экологически чистым методом борьбы с болезнями. К тому же непрерывные изменения в системе растение - хозяин и патоген делают ее высоко актуальной во времени и в пространстве. Успех селекционной работы по созданию высокопродуктивных, устойчивых к болезням сортов базируется на знаниях вредоносности каждого патогена, структуры популяций, динамики развития, наличия эффективных доноров и источников резистентности, закономерностей наследования признаков резистентности, взаимосвязи устойчивости к патогенам с продуктивностью и другими хозяйственно важными признаками. [28]

Совместная работа русских ученых с американскими коллегами из университета штата Миннесота по яровому ячменю и ВИЗР по овсу позволила выделить источники устойчивости зерна обеих культур к фузариозу и стеблевой ржавчине, а также к накоплению микотоксинов в зерновках. Установлено, что наибольшей устойчивостью обладают голозерные формы ячменя и овса, но были также выделены и единичные пленчатые устойчивые образцы.

Экономическая значимость данных болезней обусловила проведение многочисленных экспериментов по изучению устойчивости, наследованию признака, а в ряде случаев и к идентификации эффективных генов устойчивости. Следует особо отметить, что в нашей стране большая часть таких исследований проводилась достаточно давно [36; 38; 46; 65], так что выделенные источники и доноры устойчивости в настоящее время могут быть восприимчивыми в результате накопления в популяциях возбудителей вирулентных либо более агрессивных генотипов патогенов. Кроме того, в том случае, когда устойчивость оценивали на естественных инфекционных фонах, неравномерное распределение инфекции могло привести к случайной классификации восприимчивых генотипов как устойчивых, так и неустойчивых генотипов ячменя. [66]

Ячмень заражен микрофлорой, из которой даже в ранней стадии развития зерна в микробиоте ячменя численно преобладают бактерии. Так, на стадии восковой спелости в 1 г ячменя было выделено 108 клеток бактерий. Данных о более подробном исследовании этих бактерий ячменя нет, однако известно, что в готовом к сбору ячмене преобладают *Erwinia herbicola* и *Xanthomonas campestris* [90; 96], хотя, вероятно, до момента сбора урожая на ячмене присутствуют и другие бактерии — в частности, псевдомонады, микрококки и *Bacillus spp.*, которые были выделены из сухого ячменя, предназначенного для солодоращения. Как правило, количество актиномицетов на ячмене в поле относительно невелико, и большая их часть относится к *Septomyces spp* с преобладанием *S. griseus*, хотя довольно часто встречаются и *S. albus*, и *S. Thermoviolaceus*. [103] Наиболее частой причиной респираторных заболеваний фермеров является *Thermoactinomyces vulgaris*: он может присутствовать как в созревающем и в готовом к уборке ячмене, так и в зернах недавно убранного ячменя.

Второе после бактерий место по количеству жизнеспособных микроорганизмов в еще не собранном зерне ячменя занимают дрожжи, хотя на поздней стадии созревания их количество повышается за счет мицелиальных грибов. [56]. К моменту уборки ячменя колонии дрожжей могут присутствовать на 50-85% зерновок. Учитывая общее сходство микробиоты ячменя и пшеницы, вполне вероятно, что в обеих зерновых культурах присутствуют также виды родов *Cryptococcus* и *Trichosporon*, выявленные в пшенице. [96; 97].

В Европе, в Северной и в Южной Америке наиболее распространенным в зерновках полевым грибом является *Altemaria altemata* (*Alt. tenuis*). [90] В большом количестве зерновок могут также присутствовать *Cladosporium spp.* (в основном *Clad., cladosporioides* и *Clad, herbarum* . Например, было обнаружено, что в некоторых партиях готового к уборке урожая 90% зерен заражены *Cladosporium*, и все 100% — *Alt. altemata*. К другим часто встречающимся сапрофитам (но все же в меньшем количестве, чем *Alt. altemata* и *Cladosporium spp.*) относятся *Epicoccum nigrum* (*E.purpurascens*)

и *Aureobasidium (Pullularia) pullulans*. [97] Отмечено также присутствие *Acremonium (Cephalosporium) spp*, а гриб *Verticillium lecanii* в некоторых партиях может присутствовать в каждом зерне. Однако, в настоящее время основной проблемой при выращивании ячменя является его заражение *Fusarium*, поражающим во время созревания колосья мелкозерных злаков при влажных климатических условиях

Преобладающие в европейских ячменях *Fusarium spp.*, выращенных в Европе или происходящих из Европы, ячменях, представлены видами, вызывающими корневую гниль (*F. culmorum* [97] и *F. avenaceum*), а в более теплых регионах преобладают *F. graminearum* и *F. poae*). Белая плесень *Microdochium (Monographella) nivalis (ana. F. nivale)*, по мнению Jenkins, J.E.E., Clarke, W.S., and Buckle, A.E., (1988), преобладает в более холодных районах [56], а *F. sporotrichioides (F. tricinctum)* более распространены в финском ячмене (выращенном или происходящем из Финляндии). Современные исследования свидетельствуют, что из одиннадцати видов *Fusarium*, выделенных из ячменя, наиболее распространен *F. graminearum*.

Ежедневно в рацион питания человека входят растительные продукты, в том числе ячмень. Зерно ячменя в настоящее время широко используют для продовольственных, технических и кормовых целей, в том числе в пивоваренной промышленности, при производстве перловой и ячневой круп. Ячмень относится к ценнейшим концентрированным кормам для животных, так как содержит полноценный белок, и богат крахмалом. В России на кормовые цели используют до 70 % ячменя. [131] Существует обширная литература о химическом составе зерна ячменя, представляющих питательную ценность: белках, углеводах, жирах, органических кислот, микроэлементов, биологически активных веществах.

Вместе с тем, имеются определенные риски, возникающие как в процессе выращивания, так и переработки ячменя на пивоваренных предприятиях и пищевой промышленности. Зерно ячменя является переносчиком ряда

микроорганизмов, называемых в настоящее время микробиотой.[56] Микробиота ячменя в основном включает в себя бактерии (*Eubacteria* и мицелиальные *Actinomycetes*), мицелиальные грибы и дрожжи. Степень контоминации зерна микроорганизмами зависит от условий произрастания и хранения. К полевым грибам, или так называемым «плесеням», относятся *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* и некоторые другие. К плесеням относят также грибы хранения, среди которых *Aspergillus*, *Eurotium* *Penicillium*. По сравнению с данными, приведенными авторами в 1963 году, список микроорганизмов пополнился, однако неизменным остаются сведения о том, что микробиота разных сортов ячменя и других злаков в большой степени схожа, с преобладанием ограниченного числа видов.[56]

Причиной низкого качества зерна ячменя является высокая восприимчивость культуры к комплексу фитопатогенных микроорганизмов, которые приводят к значительному снижению его жизнеспособности, изменению химического состава и ухудшению органолептических показателей. Все изменения, происходящие в зерне под воздействием микроорганизмов, отрицательно сказываются на качестве солода, сусла и пива, кормов и пищевых продуктов.[56] Основной причиной низкого качества зерна ячменя пивоваренного является развитие фитопатогенной микрофлоры, представленной в основном мицелиальными грибами родов: *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Известно, что в полевых условиях повреждение всходов и корневая гниль вызываются жизнедеятельностью *Fusarium spp.* и *Cochliobolus sativus*.

Продукты метаболизма грибов способны вырабатывать токсичные вещества, опасные для здоровья человека и животных. Несмотря на то, что на настоящий момент определено уже довольно большое количество микотоксинов, лишь пять из них важны с точки зрения сельского хозяйства. К ним относятся афлатоксины, ОЛ, фузариотоксины DON (в некоторых регионах — NIV), ZEA и фумонизин.[110]

Несмотря на то, что некоторые виды рода *Fusarium* оказывают вредное влияние на рост зародышевых корешков во время солодоращения, существуют виды *F. Culmorum* и *F. moniliforme*, которые усиливают рост корешков. *F. Moniliform* продуцирует гиббереллиновую кислоту, способствующую ускорению солодоращения.[56]

2.4. Роль антибиотиков и рынок

Вместе с тем, в настоящее время вновь возрос интерес к еще одной группе веществ, называемых веществами вторичного обмена, к которым относятся антимикробные соединения, прежде всего, фунгициды и антибиотики.

В 1929 г. Александром Флемингом был открыт новый препарат пенициллин, который только в 1940 г удалось выделить в кристаллическом виде. Это эффективное химиотерапевтическое вещество получено в результате жизнедеятельности микроорганизма, т.е. биосинтетическим путем. С открытием пенициллина возникло новое направление в науке – учение об антибиотиках.

Микроскопические грибы и, в первую очередь, такие, как пенициллы, фузариум, триходерма, мукооровые, аспергиллы, широко распространены в природе (30000 видов микроскопических грибов, основным местом обитания которых является почва).[21]

Интерес к антимикробным веществам растений связан с открытием советского ученого Токина Б.П.(1967) согласно которого, растения продуцируют бактерицидные вещества – фитонциды, играющие роль в иммунитете растений. Действие подобных веществ связано с явлением, названным антагонизмом.

Антагонизм — подавление развития одних форм микробов другими с помощью вырабатываемых ими антимикробных веществ. Этими веществами могут быть: химические соединения неспецифического действия (кислоты, спирты, перекиси и др.), которые подавляют рост микробов при высоких

концентрациях; антибиотики, обладающие специфичностью действия и проявляющие антимикробные свойства при низких концентрациях. Именно с явлением антагонизма в мире микробов было связано открытие антибиотиков. Антагонизм широко распространен в природных микробных сообществах, состоящих из бактерий, грибов, актиномицетов, дрожжей, водорослей, простейших и других микроорганизмов. Широкое понятие антагонизма включает и такие формы взаимоотношений, как конкуренция, хищничество, паразитизм. В данном случае важен антагонизм в узком смысле, т. е. антагонизм, обусловленный образованием антимикробных веществ и, в частности, антибиотиков.[69]

В 1871 —1872 гг. появились работы русских исследователей В. А. Манассеина и А. Г. Полотебнова, в которых сообщалось о практическом использовании зеленой плесени для заживления кожных язв у человека. Первые сведения об антагонизме бактерий были обнародованы основоположником микробиологии Луи Пастером в 1877 г. Он обратил внимание на подавление развития возбудителя сибирской язвы некоторыми сапрофитными бактериями и высказал мысль о возможности практического использования этого явления. С именем русского ученого И. И. Мечникова (1894) связано научно обоснованное практическое использование антагонизма между энтеробактериями, вызывающими кишечные расстройства, и молочнокислыми микроорганизмами, в частности болгарской палочкой («мечниковская простокваша»), для лечения кишечных заболеваний человека.

Русский врач Э. Гартье (1905) применил кисломолочные продукты, приготовленные на заквасках, содержащих ацидофильную палочку, для лечения кишечных расстройств. Как оказалось, ацидофильная палочка обладает более ярко выраженными антагонистическими свойствами по сравнению с болгарской палочкой.

В конце XIX — начале XX в. были открыты антагонистические свойства у спорообразующих бактерий. К этому же периоду относятся первые работы, в которых описываются антагонистические свойства у актиномицетов. Позднее

из культуры почвенной спороносной палочки *Bacillus brevis* Р. Дюбо (1939) удалось выделить антибиотическое вещество, названное тиротрицином, которое представляло собой смесь двух антибиотиков — тироцидина и грамицидина. В 1942 г. советскими исследователями Г.Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой был выделен из подмосковных почв новый штамм *Bacillus brevis*, синтезирующий антибиотик грамицидин С, отличающийся от грамицидина Дюбо.

В 1939 г. Н. А. Красильников и А. И. Кореняко из культуры фиолетового актиномицета *Actinomyces violaceus*, выделенного ими из почвы, получили первый антибиотик актиномицетного происхождения — мицетин — и изучили условия биосинтеза и применения мицетина в клинике.

А. Флеминг, изучая стрептококков, выращивал их на питательной среде в чашках Петри. На одной из чашек вместе со стафилококками выросла колония плесневого гриба, вокруг которой стафилококки не развивались. Заинтересовавшись этим явлением, Флеминг выделил культуру гриба, определенную затем как *Penicillium notatum*. Выделить вещество, подавляющее рост стафилококков, удалось только в 1940 г. оксфордской группе исследователей. Полученный антибиотик был назван пенициллином.

С открытия пенициллина началась новая эра в лечении инфекционных болезней — эра применения антибиотиков. В короткий срок возникла и развивалась новая отрасль промышленности, производящая антибиотики в крупных масштабах. Теперь вопросы микробного антагонизма приобрели важное практическое значение и работы по выявлению новых микроорганизмов — продуцентов антибиотиков стали носить целенаправленный характер.

После открытия Флемингом пенициллина и широкому использованию антибиотиков, часто без особой надобности и учета возбудителя болезни, многие антибиотики потеряли свою актуальность и эффективность.

По оценкам Busines Stat, с 2006 по 2010 гг стоимостный объем рынка антибиотиков в России вырос на 90% – с 13,2 до 25,1 млрд руб. Стоимостной объем продаж антибиотиков рос темпами, опережающими рост рынка в

натуральном выражении. Опережение было обусловлено быстрым ростом цен на антибиотики: с 2006 по 2010 гг средняя цена 1 упаковки антибиотиков выросла на 66% – с 55,7 до 92,6 руб.

В 2010 г продажи антибиотиков выросли на 9% и достигли 271,0 млн упаковок. В 2011-2015 гг продажи антибиотиков вырастут на 43% – с 292,0 до 390,0 млн упаковок. Продажи антибиотиков растут благодаря высокому спросу, который во многом обусловлен тем, что микроорганизмы быстро становятся резистентными к новым препаратам, поэтому существует необходимость постоянно расширять ассортимент. Но в это же время ожидается падение российского производства антибиотиков до 173,7 млн упаковок. Основными причинами падения производства станут изношенность основных фондов, морально устаревшая номенклатура субстанций в условиях необходимости создания новых более эффективных лекарств, мощная конкуренция со стороны зарубежных производителей. В России перестали выпускать составляющие для производства антибиотиков, так как отечественные фармпроизводители не могут составить конкуренцию таким странам, как Китай и Индия, субстанции которых гораздо дешевле", - считает гендиректор НПО "Микроген" Минздрава РФ Антон Катлинский.[137]

Кроме того, микроорганизмы становятся все более агрессивными: если раньше некоторые заболевания можно было вылечить одним уколом, то теперь требуется длительный курс лечения.

Вместе с тем, в выступлении доктора Маргарет Чен 14 марта 2012 года в Копенгагене, Дания на тему: «Борьба с устойчивостью к противомикробным препаратам – время действовать» подчеркивалось, что «устойчивость к противомикробным препаратам в Европе, как и в других частях мира, возрастает. Мы теряем наши антибиотики первой линии. Для их замены используются более дорогие и более токсичные препараты, курсы лечения такими препаратами значительно удлиняются, а для их проведения могут требоваться отделения интенсивной терапии.

Среди пациентов, инфицированных некоторыми лекарственно-устойчивыми патогенами, смертность возросла примерно на 50%. При сохранении нынешних тенденций будущее легко предсказать. Некоторые эксперты считают, что мы возвращаемся в доантибиотиковую эру. Нет. Это будет постантибиотиковая эра. Что касается новых лекарств, предназначенных для замены старых антибиотиков, они практически не разрабатываются, особенно против грамотрицательных бактерий. Ресурсы практически исчерпаны.

Постантибиотиковая эра, в действительности, означает конец той современной медицины, которую мы знаем. Такие распространенные состояния, как стрептококковое воспаление горла или царапина на коленке ребенка, смогут снова приводить к смерти.

Проведение некоторых сложных мер вмешательства, таких как эндопротезирование тазобедренного сустава, трансплантация внутренних органов, химиотерапия при онкологических заболеваниях и уход за преждевременно рожденными детьми, значительно усложнится или даже станет слишком опасным».

В связи со сложившейся ситуацией в настоящее время требуется усилить исследования по поиску веществ, обладающих антимикробной и противовирусной активностью. Источниками получения подобных веществ являются растения и в том числе злаковые, к которым относится ячмень.

Ячмень отличается повышенным содержанием противовирусных и антибактериальных веществ, таких как лизин и гордецин. В связи с этим ячменные отвары и настои являются популярным средством народной медицины для лечения грибковых и воспалительных заболеваний кожи, ЖКТ и органов дыхания. Зерна ячменя служат сырьем для производства бактерицидных и противовирусных фармацевтических препаратов.[44]

Как установили антропологи и медицинские химики из Университета Эмори (Джорджия, США), проводившие химический анализ останков, у жителей

современного Судана, живших 2 тысячи лет назад, в костях обнаружен антибиотик тетрациклин, входивший, видимо, в состав пива.[79]

Известно, что древние египтяне и иорданцы использовали пиво, чтобы лечить пародонтит и другие недуги. Возможно, сложная технология ферментации (брожения) с получением антибиотиков была довольно распространена в древние времена и передавалась из поколения в поколение. Как это умение было утеряно, остается неизвестным.

Однако первый современный тетрациклин был выделен только в 1948 году. В настоящее время число известных антибиотиков приближается к 2000, но в клинической практике используется всего около 50.

Тетрациклины, группа близких по химической структуре и биологической активности природных и полусинтетических антибиотиков. По химическому строению представляют собой четырехъядерную конденсированную систему с различными заместителями (рис.1).

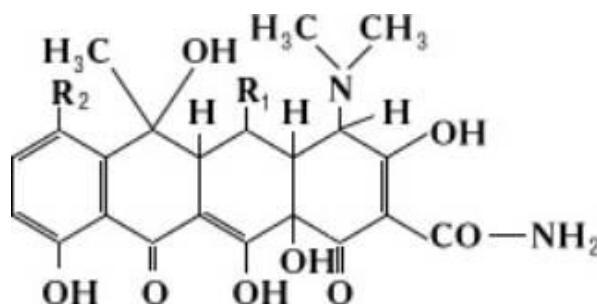


Рис.1. Структура тетрациклина

Природные тетрациклины – окситетрациклин (террамицин), полученные из растений, так называемые фитонциды, были открыты советским биологом Б. П. Токиным в 1928 г. Он обнаружил, что многие высшие растения образуют летучие вещества, способные убивать микробы. Особенно сильными антибактериальными свойствами обладают лук, хрен, чеснок, свежесрезанная черемуха и др. Фитонциды не только защищают клетки растений от размножения в них фитопатогенных микробов, но и активизируют жизненные функции растений. В чистом виде получить фитонциды очень сложно, так как

по химической природе это летучие эфирные масла. Аллилсат — препарат, выделенный из чеснока, применяется при хронических колитах; аллилчеп — спиртовая вытяжка из лука; рекомендуется применять при атонии кишечника и диареях. Волшебные травы, которые используют в качестве средства против чумы: лаванда, тимьян, розмарин, шалфей и чеснок, листья оливкового дерева — очень сильное антибактериальное и противовирусное средство; куркума или желтый имбирь, семечки грейпфрута; эхинацея.

В состав биологических препаратов, применяемых против вредителей и болезней, входят средства на основе бактерий, вирусов, грибов и антибиотики в Белоруссии на их основе применяется 15 биопрепаратов или 4,3 % от общей численности пестицидов, которые разрешены к применению в стране. Мировое производство их составило в начале 90-х годов прошлого века от 4000 до 5000 т в год. Только в Германии препараты на основе *B. thuringiensis* применяют на площади 21,5 тыс. га. Из обработанной площади 40-60 % занимала борьба с гроздевой и двухлетней виноградной листовёртками, 5-15 % — с зимней пяденице.

Обоснованность концепции активного защитного механизма у растений была доказана спустя 30 лет. Токиным Б 1928 г. выдвинуто предположение, что в клетках стойкого растения-хозяина, в которые проник паразит, образуется химическое вещество, оказывающее антибиотическое действие на паразита. Это вещество получило название фитоалексина. Но к такой защитной реакции способны лишь клетки, зараженные грибами или непосредственно их окружающие.

Образование фитоалексина стимулируется одним или несколькими метаболитами, которые паразит вводит в клетки растения-хозяина. Следует подчеркнуть, что образование фитоалексина — не единственный механизм, с помощью которого растение защищается от патогенных грибов. Ткань кожицы, например, образует механический и химический барьеры против инфекции. А система фитоалексина — это, вероятно, последний «резерв» обороны, который вводится в действие лишь после того, как патогенный организм вступит в

физиологический контакт с растением-хозяином, прорвав остальные барьеры.[134]

В зерне ячменя обнаружены вещества, действующие губительно на бактерии, в основном лортетрациклин (ауреомицин) и тетрациклин – обнаружены и выделены в 40-50-е гг. 20 века из продуктов жизнедеятельности актиномицетов (*Actinomyces rimosus*, в зарубежной литературе род *Actinomyces* называется *Streptomyces*).

Они нашли применение в растениеводстве и животноводстве. Тетрациклиновые антибиотики обладают широким спектром действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии, спирохеты, крупные вирусы. Окситетрациклины применяют для борьбы с бактериальными заболеваниями пчел, а также растений – бобовых, хлопка и плодовых культур. Хлортетрациклин используют в животноводстве в качестве стимулятора роста (препарат биомицин).

Получают тетрациклин биотехнологическим методом на почвенном актиномицете *Streptomyces virnorus* или других культурах с использованием среды, приготовленной на кукурузном экстракте, крахмале и солей аммония, натрия и кальция при хорошей аэрации (27 °С, 100 ч).[60]

Хлортетрациклин производят на основе барды – отходов, получаемых при ферментации сахаров на спиртовых заводах, или на гидролизованной картофельной мезге – отходах крахмальных заводов. В качестве продуцента используют актиномицет вида *Streptomyces aureofaciens*. Процесс развития производственного штамма – посевного мицелия – завершается за 30-45 часов при 27° С и рН 6-7. Исходная среда, которую чаще всего используют для переработки на хлортетрациклин, включает сахарозу, кукурузный экстракт, соли аммония и кальция, хлорид натрия.[60]

Грибы актиномицеты имеют хорошо развитый мицелий; из них наиболее многочисленен род *Streptomyces*, насчитывающий около 400 видов.

В медицинской практике применяют также препараты, полученные путем химических модификаций природных тетрациклинов – реверин, морфоциклин,

гликоциклин, и полусинтетические производные тетрациклинов – метациклин (рондомицин), доксициклин (вibraмицин), миноциклин.

Вместе с тем, совершенно не изученным является возможность получать антибиотики из микробиоты, поселяющейся на тех или иных растительных культурах.[126] Среди бактерий наиболее часто явление антагонизма встречается у спороносных палочек, принадлежащих к роду *Bacillus* (*B.subtilis*, *Bac.mesentericus*, *B.brevis*, *B.полумуха* и др.), и неспороносных из рода *Pseudomonas* (*P. fluorescens* и др.). Из культуры неспороносной бактерии антибактериальное вещество пиоцианаза (от устар. *Bacillus pyocyaneus* синегнойная палочка) смесь продуктов жизнедеятельности синегнойной палочки, обладающих бактерицидными свойствами; ранее применялась как местное антисептическое средство) было выделено Р. Эммерихом и О. Лоу в конце прошлого века. Позже были обнаружены антибиотические вещества в культурах чудесной палочки (*Bacterium prodigiosum*), молочнокислых стрептококков, микрококков, азотобактера и др.

В качестве примера можно назвать несколько антибиотиков, образуемых различными бактериями (таблица 1).[126]

Таблица 1

Бактерии-продуценты антибиотиков

Организм-продуцент	Антибиотик
<i>Bacillus brevis</i>	Грамицидин и тироцидин
<i>Bacillus brevis</i> var. G.-B.	Грамицидин С
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bac. Mesentericus</i>	Бацитрацин
<i>Bacillus полумуха</i>	Плимиксин
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	Поцианин
<i>Streptococcus lactis</i>	Низин

Самой богатой антагонистами группой почвенных микроорганизмов оказалась группа лучистых грибов, актиномицетов, а среди них — представители рода *Actinomyces*. Подавляющее большинство антибиотиков, нашедших применение в медицине и народном хозяйстве, получено именно из этой группы микроорганизмов.[5; 41; 71; 95]

2.5. Влияние антибиотиков на животные организмы.

Антибиотики применяются в следующих отраслях народного хозяйства: в ветеринарии, для лечения и профилактики инфекционных заболеваний животных; в животноводстве как новый фактор в увеличении производства продуктов животноводства в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных; в растениеводстве в качестве активных средств борьбы и профилактики бактериальных и грибковых заболеваний растений; в пищевой промышленности при консервировании различных пищевых продуктов с максимальным сохранением питательных веществ, разрушающихся при термической обработке; для консервирования свежельвленной рыбы, повышения стойкости мяса; в ряде отраслей бродильной промышленности как средства борьбы с чужеродными микроорганизмами; в научных исследованиях для ингибирования определенных этапов биохимических превращений; при выделении чистых культур отдельных патогенных микроорганизмов, культивировании вирусов; генетических исследованиях и др.[10; 27; 41; 61; 95]

Антибиотические вещества оказались наиболее эффективными лечебными средствами при лечении более 60 тяжелых бактериальных, грибковых и некоторых паразитарных заболеваний крупного и мелкого рогатого скота, верблюдов, оленей, лошадей, домашних птиц, пушных зверей, прудовых рыб, пчел и шелкопрядов.[43]

Практическое использование антибиотиков в качестве добавок в корм сельскохозяйственных животных впервые начало широко применяться в 50-е годы. Исследование действия антибиотиков на рост и развитие

сельскохозяйственных животных проводятся учеными многих стран: США, Великобритании, Франции, Польской Народной Республики, Германской Демократической Республики, Швеции, Италии и других. Значительные успехи в этом направлении достигнуты в Советском Союзе благодаря работам, проведенным под руководством З. В. Ермольевой, Н. А. Красильникова, Н. И. Леонова, К. М. Солнцева, А. Х. Саркисова и других ученых.[50; 140]

В настоящее время производство антибиотиков, используемых для добавки в корм животных, достигает значительного объема. Для того чтобы удовлетворить нужды сельского хозяйства, создана специальная отрасль промышленности для производства кормовых антибиотиков. Первые опыты по изучению действия антибиотиков на рост животных были проведены с использованием кристаллических медицинских антибиотиков. В дальнейшем для этой цели стали использовать неочищенные антибиотические препараты, содержащие мицелий и культуральную жидкость продуцентов. Оказалось, что такие комплексные препараты антибиотиков еще более эффективны при добавке в корма сельскохозяйственных животных, чем очищенные антибиотики, так как, помимо антибиотиков, содержат и другие микробные метаболиты, способные оказывать положительное воздействие на обмен веществ животных. К таким биологически активным продуктам жизнедеятельности микроорганизмов в первую очередь следует отнести витамины группы В, некоторые незаменимые аминокислоты, гормоноподобные вещества и ряд неидентифицированных факторов роста.[42]

Введение антибиотиков в рацион сельскохозяйственных животных и птиц позволяет значительно увеличить прирост веса, иногда до 50% по сравнению с контролем. Помимо стимуляции роста, антибиотики способствуют повышению аппетита животных и лучшему использованию питательных веществ корма, что дает возможность сократить расходы корма до 10 — 20% на единицу привеса. При этом также появляется возможность сокращения сроков откорма на 10 — 15 дней. Под влиянием антибиотиков использование питательных веществ рациона повышается на 8—12%. [84]

Применение малых доз антибиотиков в кормлении сельскохозяйственных животных в значительной степени (2—3 раза) сокращает гибель молодняка, в результате предупреждения расстройств пищеварения и других заболеваний. Скармливание антибиотиков курам увеличивает их яйценоскость, улучшает оплодотворяемость и повышает жизнеспособность и выводимость высиживаемых яиц. Очевидно, что использование антибиотиков в качестве ростстимулирующих добавок в корма сельскохозяйственных животных чрезвычайно эффективно и экономически выгодно, так как позволяет получить дополнительные количества продукции животноводства без особых дополнительных затрат.

Дозировки антибиотиков, применяемые для стимуляции роста животных, очень малы («низкий уровень в кормах»), от 10—20 г на 1 т корма. При этом антибиотик не обнаруживается в мышечной ткани и внутренних органах животных. Иногда рекомендуют применение кормов, содержащих 50—100—200 г антибиотика на тонну корма («высокий уровень в кормах»). Это создает профилактические условия против возникновения инфекционных заболеваний и значительно снижает падеж молодняка.

Анализ литературы, посвященной изучению этого вопроса, позволяет думать, что действие малых доз антибиотиков на организм животного осуществляется двумя путями: положительное действие на кишечную микрофлору и непосредственное влияние антибиотиков на организм животного.

Рынок антибиотиков в животноводстве включает: промоторы роста – объем продаж составляет от 1.0 до 1.7 млрд. долларов, антибиотики для терапии и профилактики – до 2.0 млрд. долларов, антипаразитные средства – 3.3 млрд. долларов и другие профилактические средства и вакцины – 2.0 млрд. долларов. Специалисты считают, что антибиотики как промоторы роста в кормовых добавках в ближайшее время будут заменены пробиотиками, аминокислотами, витаминами, ферментами и растительными экстрактами. В данное время рынок витаминов достаточно стабилен и составляет порядка 40 –

50 млн. долларов. Высоки перспективы продаж для ферментов, способствующих пищеварению, и инкапсулированных средств для поддержания кислотности в пищеварительном тракте животных.[12; 135]

Между тем, нельзя не отметить, что с уже в 70-е годы прошлого столетия в некоторых странах введен запрет на применение антибиотиков в животноводстве и птицеводстве. В конце июля текущего года Европарламент и Совет Европы одобрили правила, запрещающие использование антибиотиков в качестве стимуляторов роста в животных кормах после соответствующих рекомендаций ученых. По новым правилам, будут изыматься вещества, которые уже и так запрещены в медицинских целях для использования человеком. Это монезим содиум, салиномицин содиум, авиламицин и флавофосфолипид. Запрет введен по совету научного комитета по качеству и безопасности продовольствия. Комитет рекомендовал вообще отказаться от использования антибиотиков в качестве стимулятора роста животных и средства лечения.[141]

2.6. Влияние антибиотиков на сельскохозяйственные растения

В настоящее время значительная часть урожая сельскохозяйственных растений — около 30% — гибнет от вредителей и болезней. Усилия специалистов в области защиты растений пока не дают желаемых результатов. В связи с этим необходимо искать принципиально новые подходы к решению чрезвычайно актуальной проблемы защиты растений. И здесь на помощь человеку приходит биотехнология. Так, например, использование метода культуры изолированных органов и тканей растений позволяет получать в большом количестве оздоровленный (безвирусный) посадочный материал. [4; 75]

Развитие биотехнологии позволило совершенно по-новому оценить методы, используемые для защиты растений. Во-первых, мы явно недооцениваем возможности биологического метода борьбы с вредителями и

болезнями сельскохозяйственных растений и, напротив, переоцениваем роль химического метода. Именно благодаря развитию биотехнологии стало возможным создание промышленности инсектицидных вирусов, их производство и культивирование в клетках животных.

Среди биологического метода борьбы с вредителями и болезнями растений особое место занимают антибиотики. По данным Гудмана [100], различные антибиотики были испытаны с целью применения их для борьбы с различными заболеваниями растений, вызываемых бактериями и грибами. Наилучший эффект наблюдался при использовании стрептомицина, циклогексамида, тетрациклинов и др.

Стремление использовать антагонизм микроорганизмов против фитопатогенной микрофлоры возникло задолго до открытия антибиотиков. Еще в 20-х годах изучали возможность использования бактерий-антагонистов против возбудителей заболеваний растений.[59]

Положительные результаты получены при использовании некоторых актиномицетов и миколитических бактерий в борьбе с болезнями льна, сеянцев сосны, хлопчатника, овощных культур, садовых косточковых пород и др. Показана также возможность практического применения микробов-антагонистов для общего оздоровления почвы. После открытия антибиотиков они стали применяться для борьбы с заболеваниями растений.[115; 127]

Антибиотики обладают рядом ценных преимуществ в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами по сравнению с другими используемыми для этой цели веществами: легко проникают в органы и ткани растений, поэтому их действие в меньшей степени зависит от неблагоприятных климатических условий; обладают антибактериальным действием в тканях растений и сравнительно медленно инактивируются в них; основные антибиотики, используемые в лечебных дозах, нетоксичны для растений. Особенно широкое распространение в растениеводстве антибиотики получили после того, как стали очевидными неблагоприятные последствия использования ядохимикатов, которые наряду с подавлением фитопатогенной

микрофлоры отравляют полезные виды птиц и животных, питающихся опыленными растениями. Попадая из почвы в водоемы, ядохимикаты отравляют рыб и другие виды водной фауны. Все это в конечном счете оказывает вредное влияние на человека.

Антибиотики, в отличие от ядохимикатов, обладают избирательностью действия и, подавляя развитие фитопатогенных бактерий и грибов, практически безвредны для растений и животных.[31]

Многочисленные экспериментальные исследования показали, что большинство используемых антибиотиков хорошо проникает в ткани растений через корни, стебли, листовую поверхность, впитывается в семена и т. д. Скорость проникновения в растение определяется свойствами антибиотика. Особенно быстро проникают в ткани растений антибиотики нейтральной и кислой природы (хлорамфеникол, пенициллин), медленнее — амфотерные антибиотики (хлортетрациклин, окситетрациклин) и антибиотики-основания (неомицин, стрептомицин).[11; 69]

Проникнув в растение, антибиотик распространяется в его тканях в концентрации, убывающей при удалении от места, введения. Пенициллин при введении через корни обнаруживается в верхушечных листьях томатов через 30—40 мин, стрептомицин — через 2—3 суток; медленно распространяется в тканях растений хлортетрациклин. Очень плохо проникают в растение и почти не распространяются в тканях грамицидин, мицетин и субтилиин.

Существуют различные способы введения антибиотиков в ткани растений. Они определяются такими факторами, как вид и размеры растения, стадия его развития, место и способ посадки, характер заболевания. Наиболее широко применяются методы опрыскивания или опыления надземных частей растения, замачивания семян, непосредственной обработки почвы и др.[126]

Один из наиболее эффективных методов — введение антибиотиков через листовую поверхность: листья пораженных растений либо опрыскивают из пульверизатора, либо смачивают при помощи ваты. Этот метод обработки дает хорошие результаты в борьбе с болезнями, возбудители которых развиваются

на поверхности и в тканях растений, и может быть рекомендован как для древесных, так и для травянистых видов. Для опрыскивания применяют растворы, содержащие 200 мг% антибиотика. Опрыскивание повторяют несколько раз во время наибольшей опасности заболевания.

Многочисленные экспериментальные данные показывают, что биологическая активность антибиотиков проявляется в тканях растений значительно сильнее, чем в тканях животных. Основные применяемые антибиотики (тетрациклины, стрептомицин, неомицин, полимиксин и др.) подавляют большинство видов возбудителей заболеваний растений.

При выборе антибиотика необходимым условием является отсутствие токсичности. Некоторые антибиотики, такие, как мицетин, клавацин, субтилин, глиотоксин, токсичны для растений даже в сравнительно малых дозах: субтилин угнетает прорастание семян пшеницы и гороха в разведении 1 : 100 000, клавацин подавляет рост корней злаков в разведении 1 : 1 000 000.

В лабораторных условиях возможны случаи хронического отравления растений даже слаботоксичными антибиотиками, которые применялись длительно и бессистемно. Проявления токсического действия антибиотиков очень разнообразны: задержка роста и развития растения, подавление прорастания семян, угнетение роста корней или надземных частей растения, нарушение процесса образования хлорофилла и др.[126]

Использование антибиотиков в растениеводстве основано на их свойстве подавлять развитие патогенной микрофлоры. Кроме того, антибиотики, как и другие микробные метаболиты, могут оказывать непосредственное воздействие на обмен веществ и развитие растений. Антибиотики могут оказывать и стимулирующее влияние на рост и развитие растений, определенным образом активировать отдельные процессы и функции. Чаще всего это действие выражается в ускорении роста растений и повышении прироста зеленой массы (в отдельных случаях на 15—50%). Например, внесение в почву отходов производства пенициллина (мицелия продуцента) положительно влияло на

урожаи ячменя и зеленой массы. Отмечено стимулирующее влияние хлорамфеникола на яровизацию озимой ржи.[126]

Некоторые антибиотические вещества специфически стимулируют рост и развитие отдельных частей или органов растений. Так, возможна стимуляция роста только корней или надземных частей растения, процессов цветения и плодоношения. Например, обработка хлопчатника препаратом гризина увеличивает число цветков и коробочек на 100% и значительно повышает урожай хлопка. Пенициллин стимулирует рост семян льна, кукурузы, сеянцев яблони и др. Подбирая соответствующие антибиотики, можно избирательно стимулировать те или иные функции растений.

Механизм стимулирующего влияния антибиотиков на жизнедеятельность растительных организмов изучен еще недостаточно.[37]

Антибиотические препараты испытаны при лечении заболеваний фруктовых деревьев, хлопчатника, зерновых и овощных культур, декоративных растений как в лабораториях, так и в производственных условиях. Например, хорошие результаты получены при использовании ауреофунгина в борьбе с грибковыми заболеваниями семян и ложной мучнистой росой. Предпосевная обработка семян хлопчатника антибиотиком позволила в 5—6 раз снизить заболевания хлопчатника гоммозом и вертициллезным увяданием. Перспективно использование антибиотиков в окулировке растений. Черенки, обработанные антибиотиком, практически стерильны, и растения после прививки не заболевают, в то время как контрольные, не обработанные антибиотиком, часто погибают от внесения инфекции. Очень эффективно применение антибиотиков при заболеваниях растений бактериального происхождения: бактериоз яблони и груш, гниль грецкого ореха, бактериальная пятнистость томатов и перца, мокрая гниль картофеля, бактериальная пятнистость бобовых, бактериоз табака, гниение посадок картофеля, бурая гниль кочерыжек капусты, бактериальная пятнистость хризантем и т. д.[25; 101]

Применяемые препараты представляют собой как известные медицинские антибиотики, так и специальные смеси антибиотических веществ. В США, например, выпускают препараты агримидин-100, агристреп, фитомидин, аккострептомицин и другие, которые представляют собой смесь стрептомицина, тетрациклина низкой степени очистки с другими антибиотиками. Среди новых антибиотиков наиболее перспективны казидомицин, гризеофульвин, цитовиридин. Цитовиридин и пуромидин активны и против вирусных заболеваний растений. Необходимо отметить, что в растениеводстве не требуется применение высокоочищенных препаратов антибиотиков. Хорошие результаты дает применение так называемых нативных препаратов — культуральной жидкости.[49; 101]

2.7. Устойчивость ячменя к возбудителям болезней

В процессе эволюции у растений выработались разнообразные защитные реакции на воздействие патогенов: вирусов, актиномицетов, грибов, бактерий. Такими реакциями могут быть физические: фенотипические, морфологические, структурные изменения в органах и тканях, а также появление в клетках растений - хозяев биохимических метаболитов и белков, которые могут ингибировать развитие патогена (таблица 2).[72]

Таблица 2

Примеры индуцированной защиты растений от воздействия различных патогенов

Механизм защиты	Индукторы	Спектр действия
-----------------	-----------	-----------------

PR –белки – PR- 1, β-1,3-глюканаза, хитиназа	Салициловая кислота (СК); конститутивно присутствуют в некоторых тканях	Антимикробные белки со специфичной активностью (например против ооцитов и/или грибов)
Дефенсины – антимикробные белки	Янтарная кислота	Антимикробные белки
Фитоалексины – писатин, ришитин	Микробные полисахариды	Антимикробные вторичные метаболиты
Лигнин	Патогены, элиситоры	Физический барьер (например клеточная стенка)
Каллоза - - 1,3-глюкан	Патогены, повреждения тканей	
Белки клеточной стенки – гидроксипролин-богатые гликопротеины, глицин- богатые белки	Патогены, элиситоры	
Гиперчувствительный отклик (ГО) – запрограммированная локальная гибель клеток	Продукты Avr – генов, формы активного кислорода	Ограничение роста патогена (особенно биотрофов), формирование вторичных сигналов.
СПУ – системная	Патогены, ГО, СК	Широкий спектр

приобретенная устойчивость		индуцированной устойчивости
ИСУ – индуцированная системная устойчивость	Непатогенные ризобактерии	

Молекулы соединений, распознаваемые при такой активации получили название элиситоров. Один и тот же элиситор может быть синтезирован растением при взаимодействии с различными патогенами.[72]

Механизмы защиты индуцируются воздействием патогенов или присутствуют в клетках и тканях растений конститутивно. Появление методов молекулярной биологии сделало возможным не только идентифицировать гены устойчивости, но и манипулировать с помощью антисмысловой РНК, изменяющей результат взаимодействия в уменьшении инфекционности патогена.[92] Механизмы защиты включают индукцию запрограммированной гибели клеток и появление структурных изменений в клеточной стенке. Патогены в процессе инфицирования вырабатывают в большом количестве разнообразные химические соединения, а растения в свою очередь выработали возможность различать некоторые из этих молекул и использовать процесс распознавания для активации своих собственных защитных ответов.

Проведенные в 30-е годы прошлого века исследования Честером [89] показали, что растения могут вырабатывать иммунитет к бактериям, вирусам или грибам вслед за предварительной инокуляцией некротическим патогеном. Первый вид устойчивости назван локальной приобретенной устойчивостью (ЛПУ), а второй тип – системной приобретенной устойчивостью (СПУ) подробно описан Россом.[117] В настоящее время такая возможность индуцирования СПУ была выявлена у растений многих видов в ответ на воздействие различных бактериальных, грибных и вирусных патогенов, а также для обработки химическими препаратами. Так, показано, что ЛПУ может

служить эффективной формой защиты листьев многих злаков от инфицирования грибами мучнистой росы.

Развитие молекулярных методов позволило изучить гены, которые индуцируются при защите растений. В работе Руштана и Сомсиха [119], перечислено более 100 подобных генов, выделенных из растений всех изученных видов, при этом многие из них идентичны.

Около 100 лет тому назад было обнаружено, что у некоторых устойчивых растений наблюдаются локальные некрозы инфицированных тканей, которые часто ограничены одной или несколькими клетками. Этот феномен сейчас известен как ГО (Гиперчувствительный отклик). ГО обычно ограничивает рост патогена, который, вследствие этого, часто погибает в некротических тканях, особенно если он биотроф. ГО запускается патогеном (но не сапрофитом) и может привести к гибели клетки-хозяина всего за несколько часов. ГО ассоциирован как с расоспецифичной устойчивостью, так и с нехозяйской устойчивостью. ГО трактуется как запрограммированная гибель клеток. Термин «апоптоз», который применяют для аналогичной разновидности запрограммированной гибели клеток у животных, был использован для описания ГО в системах растение-патоген.[72]

Устойчивость растений к патогенам зависит как от конститутивных, так и от индуцированных механизмов.[47; 64] Конститутивные барьеры включают наличие растительной кутикулы, возможно образование и папилл — индуцированных структур клеточной стенки, которые образуют преграду для проникновения или инфицирования патогеном у растений многих видов.[121] В образовании папилл в зависимости от вида растений участвуют соединения широкого спектра, например такие, как элементарная сера, силикон, каллоза (3-1,3-глюкан), структурные белки и фенольные соединения (лигнин), причем отдельные компоненты папилл часто ковалентно связаны друг с другом посредством окислительно-восстановительных реакций. В последнем случае, по-видимому, используются перекись водорода и пероксидаза. Перекись водорода обнаруживается в папиллах во время их формирования. Авторы

считают, что у неустойчивых к мучнистой росе растений ячменя практически одни и те же составляющие (например, фенольные компоненты — лигнин, а также гуанидин-содержащие вещества, белки и H_2O_2) накапливаются как в клеточных стенках, подвергшихся ГО, так и в папиллах.

Некоторые компоненты клеточной стенки (например мономеры лигнина) обладают прямой антимикробной активностью [124], другие могут ингибировать действие микробных гидролитических ферментов, вовлеченных в повреждение клеточной стенки.[72]

О роли антиоксидантной системы, в том числе пероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы и синтеза лигнина как конститутивного механизма защиты, отражено в монографии Павловской Н.Е. и др.(2012), посвященной изучению механизмов устойчивости гороха к возбудителям болезней.

В ответ на внедрение паразита в растениях вырабатывается класс антимикробных веществ- фитоалексины и фитоантисипины , представляющие собой химически разнообразные антимикробные вещества небелковой природы с низкой молекулярной массой.[72] Фитоантисипины — это преобладающие в клетках антимикробные вещества, к которым относятся такие разнообразные соединения, как сапонины и фенилпропаноиды, включающие стилбены, алкалоиды, цианогенные глюкозиды и глюкозинолаты. Фитоалексины, напротив, образуются в растении в ответ на атаку патогена или иные формы стресса, которые чем-то напоминают действие патогенов. К фитоалексинам принадлежат разнообразные фенилпропаноиды, алкалоиды, терпены и элементарная сера. В то же время наблюдается существенное перекрытие между веществами этих двух классов. Например, те вещества, которые по характеру действия являются фитоалексинами у растений одних видов, могут быть фитоантисипинами у таковых других видов, и наоборот. Имеется ряд доказательств важности роли, которую играют как фитоалексины, так и фитоантисипины в защите растений. В частности, они принимают участие в ограничении круга хозяев для патогенов. В некоторых патосистемах

фитоалексины накапливаются при разрушении клеток, происходящем в процессе развития ГО. Важность этих соединений в защите растений была показана на простейших примерах, когда они аккумулируются как при совместимом, так и несовместимом взаимодействии.

Адаптация патогенов была детально исследована при изучении фитоалексинов и предсинтезированных фитоантисипинов. Так, было показано, что многие патогены гороха (*Pisum sativum*) продуцируют фермент писатиндеметилазу, который может модифицировать фитоалексин писатин до формы, которая менее токсична.[123]

В исследованиях Павловской Н.Е. и др. (2002), показано, что сорта гороха устойчивые к заболеванию фузариозом и аскохитозом, вырабатывают при инфицировании значительно больше фитоалексинов, чем восприимчивые сорта, что может служить признаком при оценке вновь выводимых сортов на устойчивость.

Gaeumannomyces graminis является патогеном злаков, вызывающим множественные заболевания. Изоляты *G. graminis var. avenae*, выделенные из зараженных образцов овса (*Avena sativa*) инфицировали как растения овса, так и пшеницы (*Triticum aestivum*), в то время как изоляты *G. graminis var. tritici* из зараженных форм пшеницы атаковали только растения последней. У растений овса образуются сапониновые фитоантисипины, известные как авенацины. *G. graminis var. avenae* выделяет фермент авенациназу, который гидролизует авенацины до менее токсичных форм.[107] Мутант *G. graminis var. Avenae*, у которого ген, кодирующий авенациназу, был поврежден, утрачивал способность инфицировать растения овса.[87] Из этих примеров следует, что невозможность детоксификации фитоалексинов или фитоантисипинов ограничивает круг хозяев специфического патогена.

Значительное разнообразие фитоалексинов позволяет с целью повышения устойчивости растений к патогенам применять методы трансгеноза. Основная

проблема, возникающая при этом, это слишком сложные пути биосинтеза большинства фитоалексинов.

Чесноков (2007) констатирует, что некротический и биотрофный образ жизни требуют от хозяина распознавания присутствия патогенов и использования против них защиты. Это означает, что, во-первых, существование защиты со стороны хозяина оказывает селективное давление на патогены и заставляет их развивать механизмы выживания, которые как маскируют их присутствие, так и подавляют ответы хозяина. Такая коэволюция привела к появлению у растений более сложных механизмов регуляции защитных ответов, чем при абиотических стрессах. Во-вторых, патогены представляют собой очень разнообразные организмы: вирусы, бактерии, оомицеты (водоросли), простейшие и грибы (аскомицеты и базидиомицеты). Биотрофный и некротрофный образ жизни обнаружены у таксономически различных патогенов. В связи с этим необходимо разнообразие в определении систем, используемых хозяином при защите от патогенов. Поэтому, как правило, у растения-хозяина всегда активизируется весь арсенал защиты.

В растениях был идентифицирован целый ряд химических субстанций, которые могут индуцировать их устойчивость против патогенов. Такие химические индукторы включают в себя разновидности активного кислорода (РАК), СК и ее различные аналоги, жасмонаты (ЖА) и этилен. РАК действует локально и вовлечены в индукцию ГО. Салицилаты и ЖА являются компонентами системной индукции устойчивости. Роль этилена менее ясна. По поводу СК было высказано предположение, что она действует посредством амплификации других защитных ответов, которые активизируются, когда какой-либо патоген или фосфатный ингибитор индуцирует защитную реакцию.[48; 64; 72]

У растений табака были идентифицированы и клонированы гены СК-связывающих белков с высокой и низкой степенью сродства к СК. Один из рецепторов растений табака с низкой степенью сродства оказался каталазой, действие которой ингибирует синтез СК. В этой связи было высказано

предположение, что так же, как каталазная активность уменьшает содержание перекиси водорода (H_2O_2), снижение самой каталазной активности будет выражаться в увеличении концентрации H_2O_2 . Кроме того, установлено, что H_2O_2 также индуцирует накопление PR-белков, ассоциированных с СПУ. Однако, поскольку ингибирование каталазы требует концентрации СК гораздо более высокой чем та, которая присутствует в индуцированных тканях, то кажется маловероятным, что эта каталаза играет центральную роль в СПУ передачи сигнала.

Событием, следующим практически сразу вслед за стимуляцией элиситором как в нехозяйском, так и в сортоспецифичном ГО, является, по мнению Чеснокова (2007), образование в растениях-хозяевах различных форм активного кислорода (РАК). РАК — это токсичные посредники, которые возникают в результате последовательных одноэлектронных химических реакций при восстановлении O_2 . При взаимодействии растение—патоген выявлены анионы супероксида (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), а также гидроксильный радикал (ОН).[109] Высвобождение разнообразных форм активного кислорода было названо «окислительным взрывом», который является ничем иным, как разновидностью оксидативного стресса. Такое явление в случае некоторых взаимодействий растение—патоген коррелирует с ГО.

Все разновидности активного кислорода приводят к изменению окислительно-восстановительного баланса клеток. Изменение окислительно-восстановительного равновесия (в дальнейшем окисление) приводит в действие систему защиты против оксидативного стресса, подавление которой может быть еще одним механизмом накопления РАК.[112] Количество антиоксидативных компонентов и ферментов в апопласте листьев ячменя, инокулированных мучнистой росой, меняется.[122]

В монографии Павловской Н.Е и др.(2012) указано, что одной из причин нарушения физиологических процессов у растений при действии повреждающих факторов среды является интенсивная генерация активных

форм кислорода (АФК) или (РФК) (англ. Reactive oxygen species, ROS), включающих ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси как неорганического, так и органического происхождения. Это, как правило, небольшие молекулы с исключительной реактивностью благодаря наличию неспаренного электрона на внешней электронном уровне. АФК считаются очень вредными, поскольку они повреждают белки, липиды и ДНК, приводя к старению клеток. АФК образуются как побочный продукт клеточного дыхания, которое происходит в митохондриях.[40; 113] Развитие окислительного стресса рассматривают как нарушение существующего в оптимальных условиях внутриклеточного баланса между АФК и системами антиоксидантной защиты клетки.

Защита клетки от АФК осуществляется несколькими антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза) и низкомолекулярными антиоксидантами (витамин С, глутатион, мочевая кислота). Кроме этого, антиоксидантными свойствами обладают полифенолы.

Около 95% от всего потребляемого кислорода клетки восстанавливается в митохондриях до воды в процессе окислительного фосфорилирования. Остальные 5% кислорода в результате различных реакций (как правило ферментативных) превращаются в АФК. Как было отмечено выше, защита клетки от АФК осуществляется несколькими антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза) и низкомолекулярными антиоксидантами (витамин С, глутатион, мочевая кислота). Кроме этого, антиоксидантными свойствами обладают полифенолы (например, аналоги некоторых компонентов красного вина).

Пероксидаза - гемсодержащий фермент, — общее название группы ферментов (КФ 1.11.1.1 1.11.1.10) класса оксидоредуктаз, катализирующих в живых клетках реакции окисления различных неорганических и органических соединений перекисью водорода с помощью перекиси водорода (различных полифенолов, алифатических и ароматических аминов, а также жирных кислот (пероксидаза жирных кислот), цитохрома (цитохромпероксидаза). Наиболее

изучена пероксидаза из корней хрена (мол. м. 40 тыс.), молекула которой состоит из одной полипептидной цепи (308 аминокислотных остатков), связанной ковалентно с 8 олиго-сахаридными цепями. Молекула содержит также нековалентно связанный гем с атомом Fe(III) у E и Fe(IV) у E₁ и E₂ (у некоторых пероксидазы гем отсутствует). При pH ниже 3 и выше 12 гем-белковый комплекс разрушается.

Пероксидазы существуют в виде нескольких форм (изоферментов), состав и соотношение между которыми зависит от состояния растения. Для наиболее распространенного изофермента из хрена (пероксидазы C) определена аминокислотная последовательность, на основании которой синтезирован ген пероксидазы. Для пероксидазы из этого источника установлена корреляция между окислительно-восстановительным потенциалом субстрата и величиной k_2 .

Пероксидазы широко распространены в животных и растительных клетках (могут находиться как в связанном с клеточной стенкой состоянии, так и в цитоплазме); они участвуют в фотосинтезе, энергетическом обмене, в трансформации пероксидов и веществ, чужеродных организму. Активность пероксидазы и изоферментный состав значительно изменяются при стрессовых состояниях, ранении, вирусном или микробном инфицировании организма.

Используют пероксидазы в аналитических целях (например, для определения микроколичеств H₂O₂, ароматических аминов, загрязнений в окружающей среде), а также в иммуноферментном анализе. Данные по пероксидазной активности учитывают при селекции растений (чем выше эта активность, тем устойчивее к инфекции растения). Перспективно применение пероксидазы для селективного окисления.[3; 67]

Субстраты пероксидазы различаются по структуре, химическим свойствам и размеру молекулы. Показано, что фермент способен катализировать окисление многих физиологически активных веществ. Широкая субстратная специфичность позволяет участвовать пероксидазе в различных физиолого-биохимических процессах. Достаточно указать некоторые из них:

антиоксидантная функция - утилизация перекиси водорода, участие в процессах лигнификации в клеточной стенке; в хлоропластах и митохондриях физиологическую роль пероксидазы связывают с процессами фотосинтеза и дыхания; в пероксисомах она входит в антимикробную систему защиты растений.[15]

Пероксидаза является одной из важнейших каталитических систем среди биохимических факторов защиты растений от патогенных организмов, активно участвующей в саморегуляции метаболизма при заражении. Устойчивость растений к инфицированию их тканей обусловлена способностью этого фермента к активации в процессе патогенеза.[116]

Пероксидазная система является молекулярной основой неспецифического природного иммунитета животных и растений. Функция пероксидазной системы, прежде всего защитная. Показано, что при вирусной, грибной, бактериальной инфекции растений происходит возрастание активности пероксидазы и активация системы генерации супероксида, которая переводится в пероксид водорода супероксиддисмутазой. Защитную функцию пероксидазные системы растений осуществляют различными путями. Например, участвуют в метаболизме фенолов, превращая их в токсичные для фитопатогенов хиноны, или способствуют выработке фитоалексинов, хорошо известных антимикробных и антигрибковых соединений. Кроме того, пероксидаза принимает участие в процессах лигнификации, катализируя окисление пероксидом водорода гидроксигированных спиртов, которые затем полимеризуются, создавая механический барьер на пути инфекции.[1; 3]

Механизм действия пероксидазных систем высших растений, в частности генерация перекиси водорода и кофакторы, еще недостаточно изучен. Однако несомненно, что в создании иммунитета у растений важное значение имеет катализируемая пероксидазой реакция окисления различных субстратов пероксидом водорода. Сама пероксидаза может выступать генератором, так как молекула пероксидазы имеет пероксидазный и оксидазный участки.[88; 116]

Пероксидаза принадлежит к числу полифункциональных ферментов. Она выступает в качестве одного из звеньев альтернативной дыхательной цепи, принимает участие в метаболизме ИУК, цитокининов, этилена, регулируя, таким образом, рост и дифференцировку растительных тканей, участвует в лигнификации клеточных стенок, выполняет нитратредуктазную функцию и может быть отнесена к регуляторным ферментам.[2; 64]

Каталаза помимо основной функции - разложение перекиси водорода, обладает пероксидазной активностью. Ее биологическая роль заключается не только в защите от образующейся в ходе метаболизма перекиси, но и снабжении растений кислородом.

Каталаза встречается в клетке вместе с пероксидазой. Между этими ферментами существует кажущийся антагонизм: пероксидаза активирует перекись водорода, в то время как каталаза быстро и полностью разрушает ее. Однако, действуя одновременно, оба фермента не нарушают свои специфические функции, так как каталаза разрушает ту перекись, которая не используется пероксидазой для окислительных процессов.[57]

Каталаза, как и пероксидаза, контролирует уровень перекисных соединений, образующихся в результате деятельности контактирующих организмов. Есть данные, что стимулирование активности каталазы в тканях пшеницы способствует развитию восприимчивости, так как ускорение разложения перекиси водорода, к которой возбудители ржавчины как экстремальные аэробы чрезвычайно чувствительности, увеличивает доступ к ним кислорода. Снижение активности каталазы коррелирует с проявлением, например, тканями пшеницы устойчивости к ржавчине. Падение скорости разложения перекиси приводит к накоплению токсичных для обоих организмов веществ и возникновению некроза.[58; 68] Вместе с другими активированными оксидоредуктазами каталаза направляет метаболизм клетки на создание неблагоприятных условий для патогена. В результате ткань насыщается кислородом, и создаются благоприятные условия для развития для развития ржавчинных грибов, являющихся кислородолюбивыми грибами. Напротив,

устойчивые сорта пшеницы обладают пониженной активностью каталазы, вследствие чего в тканях накапливается перекись, к которой ржавчина чрезвычайно чувствительна.[77]

Активность каталазы зависит от содержания хлорофилла. В листьях, в которых происходит частичное или полное разрушение хлорофилла, всегда наблюдается падение каталазной активности.

Тем не менее, роль каталазы в формировании иммунного ответа к облигатным и факультативным грибам еще недостаточно изучена.

Супероксиддисмутаза (СОД)-специфический фермент (КФ 1.15.1.1), открытый в 1969 г. И. Фридович и Дж.Мак-Корд, относится к ферментам, взаимодействующим с супероксид-радикалами в качестве акцепторов, катализирует реакцию дисмутации, в которой супероксид выступает одновременно как окислитель и как восстановитель. Образующийся пероксид водорода разлагает до воды другой фермент-каталаза. СОД делятся на три класса в зависимости от иона металла: Cu/Zn СОД, Mn СОД и Fe СОД. Хотя существует некоторая экстраклеточная активность СОД, тем не менее основная активность сосредоточена внутри клетки и поделена между митохондриями (Mn СОД, тетрамер) и компартментами цитозоля (Cu/Zn СОД, димер с Mr= 32 000). В гепатоцитах крысы около 70% СОД обнаружено в компартментах цитозоля. Активность СОД в разных тканях варьирует. Наиболее активен фермент в печени, надпочечниках, почках и селезенке. Регуляция СОД и других ферментов-антиоксидантов у бактерий и высших организмов представлена в обзоре Харриса.[102] Cu,Zn-СОД можно рассматривать как эукариотический цитозольный фермент, Fe-СОД и Mn-СОД - как прокариотические ферменты, однако Mn-СОД содержится в митохондриальном матриксе эукариот; в ряде бактерий обнаружена Cu,Zn-СОД, а в некоторых растениях - Fe-СОД. СОД являются в основном внутриклеточными ферментами и лишь небольшая часть активности обнаружена Маркклундом и соавт. в внеклеточных жидкостях млекопитающих в виде гликозилированного тетрамера Cu,Zn-СОД. Mn- и Fe-СОД впервые выделены из *E.coli*

И.Фридовичем с соавт. в 70-х годах. Оба фермента обычно содержатся в виде гомодимера с молек. массой субъединицы 22 кДа. Однако встречаются бактерии, у которых Mn- и Fe-СОД присутствуют в виде тетрамера. В митохондриях эукариот Mn-СОД находится в виде гомодимера, гомологичного бактериальным ферментам, что хорошо согласуется с представлением о прокариотическом происхождении митохондрий. Анаэробы или анаэробно растущие факультативные бактерии обычно содержат Fe-СОД; при переходе к аэробному росту происходит индукция Mn-СОД. Fe- и Mn-СОД из различных источников имеют значительную гомологию аминокислотной последовательности.

Рентгеноструктурный анализ Mn-СОД из *E. thermophilus* и из *B.stearothermophilus*, Fe-СОД из *T.acidophilus*, *P.ovalis* и *E.coli* показал, что ферменты имеют сходную структуру.[139]

СОД характеризуется необычайной структурной стабильностью и является одним из наиболее термостабильных глобулярных белков. Фермент активен в 8 М мочеvine; он не реагирует с дитионитробензоатом (ДТНБ) в 8 М гуанидингидрохлориде при рН 11,4 в течение 24 часов. При выдерживании в 86%-ном этаноле при 24 в течение трех часов фермент теряет активность только на 10%.

Физиологическую функцию СОД связывают с защитой клеток от свободно радикального повреждения. К настоящему времени выяснены далеко не все биологические источники супероксидных радикалов. Супероксидные радикалы могут продуцировать лейкоциты в процессе фагоцитоза. Источниками супероксидных радикалов являются цепи переноса электронов (митохондрии), некоторые флавинсодержащие оксидоредуктазы, локализованные в цитозоле, такие как ксантинооксидаза, альдегидоксидаза, дегидрооротатдегидрогеназа и др. В цитозоле О⁻ радикалы могут образовываться также в процессах автоокисления некоторых белков и низкомолекулярных метаболитов, таких как катехоламины, гидрохиноны и др.

В условиях нормального обмена супероксиддисмутаза поддерживают стационарную концентрацию супероксидных радикалов на определенном уровне, защищая тем самым клеточные структуры от повреждающего действия как самих радикалов O_2^- , так и от появления гидроксильных радикалов, которые могут образовываться из O_2^- и H_2O_2 . В литературе большое внимание уделяется изучению изменений в активности эритроцитарной СОД в процессе старения организмов и при некоторых заболеваниях, таких как гемолитическая анемия, ишемия, ряд неврологических заболеваний. Существенная роль отводится супероксидным радикалам в развитии воспалительных процессов. Результатом этих исследований явилось использование СОД в качестве противовоспалительного средства (орготейн, пероксинорм). Орготейн применяется в клинике для лечения воспалительных процессов, остеоартритов, бурситов, протритов, циститов. Успешное лечение СОД воспалительных процессов позволяет рассматривать этот фермент как альтернативу кортикостероидам. В 70-е годы прошлого века появились сообщения об успешном применении СОД как мощного противовоспалительного средства, эти исследования в настоящее время продолжаются.[70]

СОД и каталаза обнаружены во всех типах про- и эукариотических аэробных клеток. Они присутствуют не только в клетках животных тканей, но плазме крови, лимфе, синовиальной жидкости. В клетках больше всего этих ферментов содержится в пероксисомах и митохондриях.

Одним из наиболее мощных антиоксидантов является витамин Е (токоферол). Он чрезвычайно активен по сравнению с витамином С в отношении подавления окисления холестерина липопротеидов низкой плотности. Жирорастворимый витамин Е в основном воздействует на клеточные мембраны, находясь в их липидной среде. Сочетание витаминов Е и С позволяет осуществить защиту клетки по аддитивному механизму (аскорбиновая кислота в водной среде, примыкающей к биомембранам, и витамин Е в липидном бислое биомембраны) по сопряженному механизму.

Антиоксиданты могут эффективно контролировать рост и развитие растений, отодвигая ЗГК.[74] Природные фенольные соединения, входящие в состав растения, играют защитную роль при кислородном стрессе и уменьшают обусловленный им риск преждевременной гибели клеток. Аналогичную роль в растении выполняют и другие антиоксиданты, в том числе флавоны, каротиноиды и прочие.

В статье Колупаева и др. (2005), показано, что усиление образования активных форм кислорода (АФК) и, как следствие активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), является одной из ранних реакций растительных и животных клеток на воздействие стрессоров различной природы. Предынкубация отрезков coleoptилей пшеницы в 5 мМ растворе CaCl_2 вызывала повышения содержания в них продуктов ПОЛ активности гваяколпероксидазы, СОД и каталазы. Показано, что кратковременный окислительный стресс, развивающийся после нагрева и обогащенных CaCl_2 растительных тканей, не связан с их необратимым повреждением. Кения и др.(1993) демонстрируют роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе, а Лукаткин А.С.(2002) устанавливает связь между накоплением АФК, продуктов ПОЛ и степенью повреждения тканей растений при развитии окислительного стресса при повреждениях в листьях теплолюбивых растений в связи с охлаждением. В то же время другими авторами сделано заключение, что продукты ПОЛ могут быть « первичными медиаторами» стресса как особого состояния клетки, приводящего к повышению ее резистентности.[30] По мнению данных авторов, продукты перекисного окисления липидов, возможно, являются посредниками между воздействием повышенной температуры и развитием стресс-реакции у растений.

Деви С.Р., Прасад М.Н.В.(2005) считают, что антиокислительная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди (50-200мкМ) в течение 48 ч, отреагировала увеличением уровня перекисного окисления липидов и истощением пула глутатиона как в

корнях, так и в листьях, что можно связать с дополнительным окислительным стрессом, вызванным медью. Активность аскорбатоксидазы и супероксиддисмутазы при накоплении меди была выше как в корнях, так и побегах, а активность каталазы увеличивалась в листьях, но не менялась в корнях. Изменения интенсивного окисления, содержания глутатиона и активности ферментов антиоксидантной защиты свидетельствует о том, что токсичность меди может быть связана с окислительным повреждением. Хотя медь и является необходимым элементом питания, она вызывает окислительный стресс в результате образования свободных радикалов в реакциях Габера – Вайса и Фентона.

Неблагоприятные условия, такие как засуха, низкая температура, высокие концентрации тяжелых металлов и многие другие стрессовые факторы провоцируют в клетках растений сверхпродукцию АФК и окислительный стресс.[55; 93; 114; 111; 120]

В то же время роль этих опасных молекул при стрессах двойственна. Доказано, что во многих случаях перекись водорода участвует как вторичный мессенджер в схемах передачи сигналов, включающих системы защиты растений от стресса, в частности индукцию синтеза ферментов-антиоксидантов.

Антиоксиданты действуют как ловушки для свободных радикалов. Отдавая электрон свободному радикалу, антиоксиданты останавливают цепную реакцию, действуя как буфер для электронов. Правильная регуляция этого баланса помогает организму расти, вырабатывать энергию, бороться с инфекцией и детоксицировать химические и загрязняющие вещества. Исследования показали, что антиоксиданты помогают организму снижать уровень повреждения тканей, ускорять процесс выздоровления и противостоять инфекциям. В результате исследований доказано, что они могут увеличить и продолжительность жизни человека.

Г.Г. Васильева и др.(2007) изучали уровень активных форм кислорода (АФК): супероксиданион-радикала ($O_2^{\bullet-}$) и пероксида водорода (H_2O_2) в проростках гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Марат при инокуляции их

симбиотическими (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* штамм CIAM 1026) и патогенными (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii* Sackett) микроорганизмами. Установлен разный характер изменения уровня АФК в проростках гороха при взаимодействии с симбионтом и фитопатогеном. Предполагается участие и H_2O_2 в защитных и регуляторных механизмах растения-хозяина.

В обзоре, посвященном роли кислородных и пероксидных комплексов в монооксигеназных и моделирующих их системах, в пероксидазных и "псевдопероксидазных" процессах, рассмотрены пути превращения этих промежуточных комплексов по одноэлектронному (свободнорадикальному) и двухэлектронному (гетеролитическому) механизму.[40] Проведен анализ сопряженного пероксидазного окисления ароматических аминов и фенолов и рассмотрены количественные характеристики ингибирования и активации пероксидазных реакций: окисление пероксидазных хромогенных субстратов. Приведены примеры практического использования пероксидных ферментных и модельных систем в окислении органических соединений, химическом и иммуноферментном анализе многих объектов и в тест-системах общей антиоксидантной активности биологических жидкостей.

Уровень активных форм кислорода (АФК) в клетке регулирует процессы роста и дифференцировки грибного организма. В обзоре рассмотрены пути возникновения и способы защиты грибов и дрожжей от первично образующихся АФК, а также участие тиоловых соединений в антиоксидантной защите грибной клетки. [6] Показано, что процесс адаптации грибов к окислительному стрессу тесно связан с редокс-зависимым изменением активности компонентов антиоксидантной защиты.

Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk. З.Р. резко повышается. [76] У устойчивых растений при инфицировании фитопатогенами индуцируется каскад защитных реакций, локализующих патоген в зоне его проникновения в ткань. Одной из них является лигнификация клеточной стенки [105], приводящая к образованию механического барьера, который ограничивает

водный обмен и поступление питательных веществ в эту зону.[108] По мнению многих ученых, ключевым ферментом, участвующим в синтезе лигнина, является пероксидаза, активность которой многократно повышается в инфицированных патогенами тканях растений.[51; 86]

Участие активных форм кислорода в защите линий пшеницы с генами устойчивости видов рода *Agropyron* от бурой ржавчины изучено Плотниковой (2009).

Окислительный взрыв выявлен при взаимодействии биотрофных и некротрофных патогенов с растениями разных семейств.[85] Его индуктарами могут быть сами патогены, либо специфические продукты их клеток-элиситоры.[83] При узнавании элиситоров рецепторами клеток растений происходит накопление активных форм кислорода (H_2O_2 , O_2^- , OH^-), что приводит к всплеску окислительных реакций в месте инфекции. Для развития окислительного взрыва и осуществления первых этапов трансдукции сигнала, запускающего комплекс защитных реакций, необходимо поступление ионов Ca^{2+} из кальциевых хранилищ через мембранные кальциевые каналы. Окислительный взрыв является одним из более ранних ответов клеток на контакт с патогенами. В грибных и бактериальных патосистемах продемонстрирован двухфазный характер окислительного взрыва. При инфильтрации растений фитопатогенными бактериями показано, что первый пик является неспецифическим, а второй зависит от расы и проявляется только с авирулентными бактериями, т.е. связан со специфическим узнаванием партнеров.[19; 98; 78; 106]

АФК являются важной составной частью защитных механизмов и действуют в патогенезе в нескольких направлениях и выполняют роль антимикробных факторов, служат первым звеном в передаче сигнала в НАДФ-Н-оксидазной сигнальной системе; участвуют в реализации программы реакции сверхчувствительности; способствуют образованию поперечных связей между компонентами клеточной стенки, повышая механическую прочность клеток.[19] Поляризация цитоплазматической мембраны активирует связанную

с клеточной мембраной НАДФ. Н- оксидазу, которая генерирует супероксид-анионы. Затем с помощью фермента супероксиддисмутазы супероксиданионы превращаются в перекись водорода.[85] В результате на поверхности клетки наблюдается кратковременное преходящее накопление H_2O_2 . [73; 109]

Таким образом, первый пик окислительного взрыва происходит на базе имеющихся в клетке ферментов и молекул, что объясняет его быстрое проявление. Экстраклеточное выделение АФК отмечалось в разных системах в период 2-3 мин до 1 ч после контакта с элиситорами.[80; 82] Второй пик развивается позже, но продолжается дольше, он связан с усилением ферментативной активности, вызванной синтезом защитных белков *de novo*, в результате передачи сигнала в сеть сигнальной трансдукции.

Ферменты антиоксидантной системы растений играют существенную роль в защитных реакциях растений, подвергающихся действию патогенов. Так, повышение активности пероксидаз установлено при заражении устойчивых растений ржавчинами и головневыми грибами.[81; 91]

Анализ активности СОД и каталазы в корневой меристеме проростков подсолнечника выявил различия между изучаемыми линиями, которые позволили предположить, что наиболее устойчивыми к действию температурного стресса являются пластомные мутанты, у которых сохраняется скоординированное функционирование важнейших антиоксидантных ферментов, а наименее устойчивым - ядерный мутант.[39]

Чесноков Ю.В.(2007) в обзоре иностранной литературы заключает, что в последние десятилетия наши знания о механизмах защиты растений от атаки патогенов значительно расширились. Число генов, которые были идентифицированы как индуцируемые действием патогенов, существенно возросло, но более интересно то, что получены данные о регуляции их активности посредством различных защитных механизмов. Разработка методов изучения экспрессии индивидуальных генов у трансгенных растений привело к выявлению роли, которую играют специфичные, вовлеченные в защиту продукты генов в формировании устойчивости против различных патогенов,

принадлежащих к разным таксономическим группам, а также в ограничении возможности приспособления патогенов при инфицировании определенного хозяина. Эта идентификация и выделение новых генов защиты также свидетельствуют о том, что трансгенные растения имеют реальный потенциал выстоять при взаимодействии растение—патоген. Клонирование некоторых генов, продукты которых ответственны за регуляцию генов устойчивости, открывает возможности для реализации новых стратегий защиты. На сегодняшний день совершенно очевидно, что без исследования молекулярных механизмов генетического контроля устойчивости растений к различного рода патогенам прогресс в этой области знаний невозможен.

В Орловской области вся посевная площадь в 2012 году составила почти 1 млн 100 тыс. гектаров. Свыше 70% - занимают зерновые, зернобобовые и крупяные культуры. Общая площадь озимой пшеницы составляла 368 тыс. гектаров. Яровой ячмень занимает в нашем регионе почти 175 тыс. гектаров.[130] Однако потери зерновых от болезней без применения пестицидов могут составлять до 15%.[138]

Однако химические препараты действуют, как правило, нецеленаправленно. Они убивают не только вредных, но и полезных насекомых, в том числе тех, которые, являясь естественными врагами вредителей, надежно помогают человеку в его борьбе за спасение урожая. Пестициды являются токсичными веществами для животных и человека. Многие из них длительное время сохраняются в природной среде, приводя к существенному ее загрязнению. Наиболее опасными для человека являются пестициды хлорорганической природы, способные длительно, до десяти лет, сохраняться в почве и накапливаться в организме животных в жировой ткани. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, ежегодно в мире около полумиллиона людей заболевает, а свыше пяти тысяч умирает в результате отравления пестицидами.[4; 75]

Между тем, проблема обеспечения пищей семимиллиардного населения Земли остается актуальной. Без применения пестицидов потери растительной

сельскохозяйственной продукции могут существенно возрасти и составить до 30-50% урожая, что повлечет рост цен на продовольствие в несколько раз. Поэтому создание новых по механизму биодействия пестицидов и регуляторов роста для защиты животных и растений от вредителей и болезней, повышение урожайности с/х культур, увеличения сроков хранения готовой продукции и прочее является первоочередной задачей.[60]

Для решения проблем санитарии и экологии необходим поиск и синтез менее токсичных для человека, фауны и флоры, быстро разлагаемых пестицидных веществ.

Химическими средствами защиты и регуляции жизнедеятельности животных и растений называют биологически активные вещества, разрешенные законодательно. К ним относятся собственно пестициды, воздействующие на растения таким образом, что они угнетают развитие патогенной микрофлоры или вызывают гибель. К регуляторам роста и развития растений относят физиологически активные вещества, стимулирующие данные процессы и повышающие устойчивость к воздействию вредных организмов.[60]

Синтетические вещества для регулирования роста и развития растений начали применять с 1950-х годов. К ним относятся абсцизовая кислота, этилен, цитокинины, ауксины, гиббереллины. Фитогормоны синтезируются самими растениями и действуют в концентрациях 10^{-3} - 10^{-11} М. Относительно недавно было открыто еще одно природное соединение с гормональным действием - салициловая кислота, участвующая в иммуннозащитной системе растений.

В сельскохозяйственном производстве в настоящее время применяют более 50 регуляторов роста и развития растений, в основном синтетических.

В ряду гидроксизамещенных бензолкарбоновых кислот имеются вещества с полезными биологическими свойствами, к которым относится 2-гидроксibenзойная (салициловая) кислота. Являясь эндогенным соединением, она регулирует ряд генетических программ в растениях, в том числе и защитных, от паразитических грибов и растений. Кроме того, было показано,

что О-ацетилсалициловая кислота (аспирин) оказывает аналогичное физиологическое действие, заключающееся в резком убыстрении ею экспрессии тех генов, которые участвуют в синтезе эндогенных защитных веществ в растении.

Салициловая кислота применяется в пищевой промышленности как хороший консервант фруктов и овощей. В медицине применяется как противовоспалительное, жаропонижающее, анальгетическое средство.

К тетраядерным конденсированным производным относятся антибиотики группы тетрациклина – окситетрациклин и хлортетрациклин, которые нашли применение в растениеводстве и животноводстве. Тетрациклиновые антибиотики обладают широким спектром действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии, спирохеты, крупные вирусы. Окситетрациклины применяют для борьбы с бактериальными заболеваниями пчел, а также растений – бобовых, хлопка и плодовых культур. Хлортетрациклин используют в животноводстве в качестве стимулятора роста (препарат биомицин).

Таким образом, из обзора видно, что средствами борьбы с болезнями растений могут применяться те же соединения, какие используются для лечения животных и человека. Это, прежде всего, антибиотики и компоненты сигнальной системы растений (салициловая кислота и др.). В этом может помочь биотехнология, которая занимается разработкой технологических процессов, обеспечивающих производство вирусов, бактерий, грибов, простейших и насекомых, а также биологически активных веществ живых организмов (антибиотиков, гормонов, феромонов и др.), предназначенных для борьбы с возбудителями болезней, вредителями сельского хозяйства и сорной растительностью. Таким образом, если специалиста в области биологической защиты растений интересует проблема использования соответствующих средств, то биотехнолога прежде всего волнуют вопросы организации их производства, И здесь уместно отметить, что выращивание бактерий и грибов для целей защиты растений, принципиально не отличается от культивирования

их для получения различных веществ, например антибиотиков. Вместе с тем биотехнология и генетическая инженерия существенным образом расширяют возможности эффективного использования биологических средств защиты растений.

Наиболее распространенными болезнями озимой пшеницы в Орловской области являются головневые, виды ржавчины, мучнистая роса, септориоз, корневые гнили и некоторые другие.

Одним из наиболее распространенных заболеваний пшеницы и ячменя, и других злаковых культур, считается мучнистая роса. Возбудитель – сумчатый гриб *Blumeria graminis speer f. hordei Enn. Marchal*. Поражает листья и стебли, в периоды сильного развития болезни колосовые чешуйки. Проявляется в виде белого налёта.

В последнее время особенно важное значение приобрела мозаичная желтуха ячменя. Наиболее часто она встречается в областях традиционного выращивания ячменя. Недобор урожая на пораженных полях может составлять от 20 до 60%. Очаги болезни возникают на протяжении всей весны. Пожелтение и отмирание листьев происходит в зависимости от температуры. Пораженные растения отстают в росте и достигают лишь половины высоты здоровых растений.

Вирус мозаичной желтухи сохраняется в почве и наблюдался только у ячменя. Сохраняется он в почвенном грибе *Polymyxa graminis* и переносится им. Появлению симптомов болезни способствуют низкие температуры весной. При температуре свыше 15—18° С образование симптомов прекращается. Теплые погодные условия, способствующие быстрому росту растений, сокращают заражение и уменьшают недоборы урожая. В качестве единственной успешной меры борьбы с мозаичной желтухой зарекомендовало себя разведение устойчивых к вирусу сортов ячменя.

2.8. Цель и задачи работы.

Из обзора литературы следует, что синтез антимикробных веществ у растений связан с явлением антагонизма, выработанного в процессе эволюции и связанного с механизмами защиты растений от агрессивной микрофлоры. Растения могут служить тем сырьем, которое можно использовать для производства уже известных и новых антибиотических веществ, на основе которых создаются лекарственные, ветеринарные препараты и средства защиты сельскохозяйственных культур от вредителей и болезней. Ячмень издревле использовался для лечения ряда воспалительных болезней из-за наличия у него антимикробного соединения гордецина, а также тетрациклина. Но исследования, посвященные изучению химической структуры гордецина, испытание его биологической активности и др. были завершены в середине прошлого века и больше не возобновлялись.

Целью данной работы было изучить возможность получения этого ценного препарата из ячменя, провести скрининг по содержанию гордецина в образцах коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова на возможность использования эффективных генотипов как сырья для промышленного производства антибиотика и подбора родителей для скрещивания.

Вместе с тем, плесень, развивающаяся на корнях ячменя, также является продуцентом таких антибиотиков, как тетрациклин, стрептомицин, грамицидин и др. Задачей данного исследования является выявление связи устойчивости ячменя к болезням с содержанием антибиотических веществ в семенах и корневых плесеней и изучение их биологической активности.

3. Объект и методы исследования

Работа проводилась в лаборатории биотехнологии и молекулярной экспертизы ЦКП «Орловский региональный биотехнологический центр сельскохозяйственных растений» ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет» на инновационном оборудовании в 2010-2013 гг.

1. Ботаническое описание генотипов ячменя

2. Методы выделения гордецина и его спектрофотометрического определения, очистка и идентификация гордецина методами ВЭЖХ, масспектрофотометрии и ЯМР.
3. Методика получения плесени
4. Методы выявления антибиотиков в плесени ячменя
5. Инфицирование гороха возбудителем корневых гнилей *Fusarium oxysporum* L.
6. Биохимические методы исследования активности пероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы.
7. Статистическая обработка

3.1. Ботаническое описание генотипов ячменя

Для исследований использовались генотипы ячменя из коллекции ВИР им Н.И. Вавилова (таблица 3).

Таблица 3

Образцы ячменя из коллекции ВИР

Номер образца	Происхождение	Подвид	Описание свойств
22089	Ленинградская область	Белогорский <i>Pallidum rivotense</i>	Шестирядный, пленчатый, ости длинные, гладкие, колос рыхлый, среднеранний, стандарт для Северо-запада, продуктивный, средне устойчив к полеганию, среднерослый, устойчив к пыльной головне, восприимчив к мучнистой росе и

			пятнистостям.
30845	Новосибирская область	Золотник <i>Medicum</i>	Создан для использования в Сибири, двурядный, пленчатый, ости длинные, гладкие, колос рыхлый, скороспелый, среднерослый, средне устойчив к полеганию, устойчив к каменной головне, поражается мучнистой росой и пятнистостями.
27080	Беларусь	Белорусский <i>76 Nudum</i>	Двурядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные, зазубренные, среднеспелый, среднерослый, устойчивый к полеганию, устойчивый к мучнистой росе.
19417	Московская область	Московский <i>121 Nutans</i>	Был районирован в Центральном Нечерноземном регионе, пивоваренный, двурядный, пленчатый, ости зазубренные, среднеспелый, среднерослый, средне устойчив к полеганию, поражается всеми грибными болезнями.
30943	Чехия	<i>Amulet nutans</i>	Пивоваренный, двурядный, пленчатый, ости

			зазубренные, среднеспелый, укороченная соломина, устойчивый к полеганию, устойчивый к мучнистой росе, слабо поражается пятнистостями
29864	Германия	<i>Kleine gerste coeleste</i>	Шестирядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегает при неблагоприятных условиях, поражается грибными болезнями.
28292	Австрия	<i>Westendorf Tirol nudum</i>	Двурядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегает при неблагоприятных условиях, поражается грибными болезнями.
27471	Польша	<i>Korona Laschego coeleste</i>	Шестирядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегает при неблагоприятных условиях, поражается грибными болезнями.
17844	Ленинградская область	<i>Cocleste</i>	Шестирядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый,

			среднерослый, полегает, поражается грибными болезнями.
30919	Омская область	Омский голозерный <i>Nudum</i>	Двурядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегает при неблагоприятных условиях, поражается грибными болезнями.
30846	Новосибирская область	Сигнал <i>Nutans</i>	Создан для Сибири, двурядный, пленчатый, ости зазубренные, среднеспелый, среднерослый, средне устойчив к полеганию, поражается всеми грибными болезнями.
30440	Дания	23007 <i>Nudum</i>	Двурядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегает при неблагоприятных условиях, поражается грибными болезнями.
6557	Армения	Местный <i>Nudum</i>	Двурядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегает, поражается

			грибными болезнями.
14981	Дагестан	Местный <i>Nudum</i>	Двурядный, голозерный, колос рыхлый, ости длинные зазубренные, среднеспелый, среднерослый, полегающий, поражается грибными болезнями.

3.2. Методы выделения гордецина и его спектрофотометрическое определение, очистка и идентификация методами ВЭЖХ, масспектрофотометрии и ЯМР.

Выделение гордецина проводили по прописи Ежова (1969) и вносили различные модификации [26] (рис.2). Брали 20 г ячменной муки. Заливали 30 мл. диэтилового эфира и 10 мл. 3% соляной кислоты. Экстракт настаивали 2 суток. Затем вытяжку фильтровали. К фильтрату добавляли 1,5 мл. 5% карбоната натрия. Разделяя экстракт на водную и эфирную части. К водной части добавляли 3 мл. 3% соляной кислоты и оставляли на 2 часа. После этого приливали 5 мл. диэтилового эфира, настаивали 5 часов. Затем эфир испаряли, оставшееся вещество – карбонатная фракция - взвешивали. Из оставшейся, после разделения общей вытяжки, эфирной части испаряли растворитель. Оставшееся вещество – нейтральная фракция - взвешивали.

Для идентификации гордецина и установления некоторых физико-химических свойств применяли высокоэффективный метод очистки гордецина с использованием ВЭЖХ, его идентификация и разработка спектрометрического метода определения концентрации гордецина в растворах хроматографически очищенного препарата, а также в этанольном экстракте из карбонатной фракции.

Материалы. В работе использовали зерна ячменя сорта Атлант, а также растворители для ВЭЖХ: гексан(LAB- SCAN), изопропанол(LAB-SCAN,

метанол(LAB-SCAN), 96% этиловый спирт, диэтиловый эфир(LAB -SCAN), соли марки х.ч.

После размельчения зерен ячменя брали 20 г ячменной муки. Заливали 30 мл. диэтилового эфира и 10 мл. 3% соляной кислоты. Экстракт настаивали 2 суток. Затем вытяжку фильтровали. К фильтрату добавляли 1,5 мл. 5% карбоната натрия. Разделяли экстракт на водную и эфирную части. К водной части добавляли 3 мл. 3% соляной кислоты и оставляли на 2 часа. После этого приливали 5 мл. диэтилового эфира, настаивали 5 часов. Затем эфир испаряли, оставшееся вещество – карбонатную фракцию- взвешивали. Из оставшейся после разделения общей вытяжки эфирной части растворитель испаряли. Оставшееся вещество – нейтральную фракцию - взвешивали (рис.2).

Схема выделения гордецина, отработанная Костромичевой Е.В.(2013)[26]: 10 г зерна ячменя, отсеянного от мучки, залили 30 мл дистиллированной воды на 72 часа с 1 мл хлороформа и периодически помешивали. Зерна-проростки не размалывали. Для исследования брали воду для замачивания в соотношении 1:1,15. Проростки выращивали в темноте во избежание образования хлорофилла. Отцентрифугировали при 2000 об/мин, добавили 1 мл 25% ацетата свинца, профильтровали. К фильтрату добавили 1 г активированного угля, оставили на 1 сутки. Профильтровали. Фильтр промыли дистиллированной водой. Затем промыли фильтр 5 мл 96% спирта и измеряли оптическую плотность фильтрата на Spеcol-11 при длине волны 278 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Формула для вычисления:

$$C_1 = C_2 * (E_1 / E_2) \quad (1)$$

$C_2 = 0,0075\%$, $E_2 = 0,412$, где C_1 – искомая оптическая плотность; C_2 – стандартная концентрация гордецина $0,0075\%$; E_1 – оптическая плотность опытного образца гордецина; E_2 – оптическая плотность стандарта.

Параллельно исследовался объем плесени, выросший на корнях ячменя. С целью получения корневых плесеней и выявления антибиотиков семена ячменя выращивали на фильтровальной бумаге в фитокамере в контролируемых условиях в течение 10 дней.

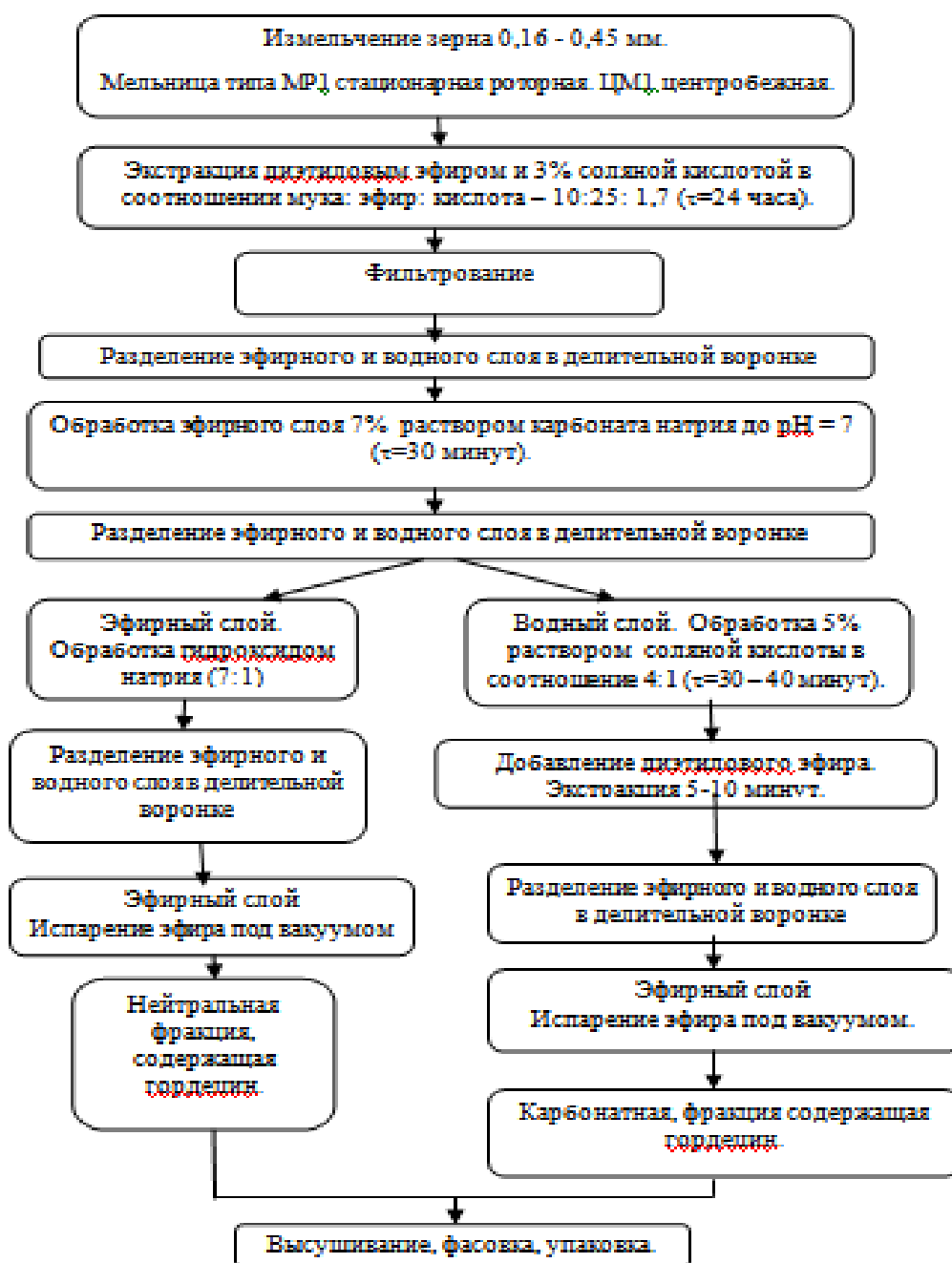


Рис.2. Схема выделения гордецина из ячменя

Полученное вещество гордецин- маслянистая жидкость желтого и светло коричневого цвета, имеющая специфический запах меда и ржаного хлеба (9). Далее разрабатывался высокоэффективный метод очистки гордецина с использованием ВЭЖХ, его идентификация и спектрометрическое определение концентрации в растворах хроматографически очищенного препарата, а также в этанольном экстракте из карбонатной фракции.

Окончательная очистка проведена методом ВЭЖХ с использованием подвижной фазы гексан (97,5%)/изопропанол (2,5%). Методами УФ-спектрофотометрии и масс-спектрометрии проведена идентификация гордецина в хроматографических фракциях и установлено, что он находится в растворе в виде окисленной формы. Показано, что концентрацию гордецина в частично очищенном препарате (спиртовый экстракт карбонатной фракции) можно определить разделением на компоненты или спектрофотометрически после хроматографической очистки гордецина.

Препаративную очистку гордецина из этанольного экстракта карбонатной фракции проводили методом ВЭЖХ на хроматографе GILSON при ниже следующих условиях: колонка –Ultrasil-Si(250 x 7.8; 10 мкм); подвижная фаза – 97,5% гексан + 2,5% изопропанол; скорость протока – 2мл/мин; проба, наносимая на колонку – 2 мл; детектирование – УФ при 260 нм.

Аналитическую хроматографию хроматографически очищенного препарата гордецина проводили методом ВЭЖХ на хроматографе GILSON при следующих условиях: колонка –Ultrasil-Si(250 x 4.6; 5 мкм); подвижная фаза – 97,5% гексан + 2,5% изопропанол; скорость протока – 0,5 мл/мин; пробы, наносимые на колонку – 100 мкл(с=6-100мкг/мл); детектирование – УФ при 260 нм.

УФ-спектры метанольных растворов гордецина снимали на спектрофотометре SPECORD UV VIS(Германия), используя кварцевые кюветы с длиной оптического пути – 1 см.

Масс-спектры в условиях электрораспыления при атмосферном давлении (ИЭР) регистрировали в режиме полного сканирования масс положительных и отрицательных ионов на тандемном динамическом масс-спектрометре Finnigan LCQAdvantage (США), оборудованным масс-анализатором с октапольной ионной ловушкой, насосом MS Surveyor, автосамплером Surveyor, генератором азота Schmidlin-Lab (Германия) и системой сбора и обработки данных с использованием программы X Calibur версии 1.3 фирмы Finnigan. Температура трансфертного

капилляра 150° С, напряжение поля между иглой и противоэлектродом 4,5 kV. Соотношение скоростей потоков несущего и вспомогательного газа-азота 10/0 условных приборных единиц. Образцы концентрацией 10⁻⁴ моль/л в растворе ацетонитрила вводили в ионный источник со шприцевого ввода со скоростью потока 25 мкл/мин через инжектор Reodyne с петлей на 5 мкл.

3.3. Методы выращивания растений гороха

Исследования проводились на водных культурах. Проращивание обработанных семян гороха проведено в рулонах фильтровальной бумаги по ГОСТ – 12038-84. Для создания необходимых условий выращивания использовалась программируемая климатокамера “Фитотрон” производства компании Вiоком. Выращивание производилось при температуре 25° С, 12-ти часовом световом дне.

3.4. Инфицирование гороха возбудителем корневых гнилей *Fusarium oxysporum* L.

Для изучения действия гордецина на активность антиоксидантных ферментов использовали сорт гороха Батрак. Проростки гороха исследовали на 3-ий, 4-ый, 7-ой, 8-ой и 10-ый день после проращивания семян.

Для изоляции патогенов – возбудителей фузариоза *Fusarium oxysporum* L. выкапывают растения гороха с явными признаками поражения корней или другие органы (стебли, бобы, семена). Пораженные органы промывают водопроводной водой и стерилизуют 1-2 минуты в 96% -ном спирте. После стерилизации растительный материал дополнительно промывают дистиллированной водой. Подготовленный материал раскладывают во влажной камере. Через 2-4 дня появляется ватообразный налет мицелия, который в стерильных условиях отсевают на жидкую питательную среду Чапека. Колбы с внесенной инфекцией помещают в термостат при температуре +24° С и культивируют две недели.

Семена изучаемых сортов по 30 штук в лабораторных условиях предварительно дезинфицируют, замачивая их в 0,5% -ном растворе КМnО₄ в

течение 5 минут и промывают стерильной водой. Набухшие семена проращивают в специальной камере-растильне, в которую помещают фильтровальную бумагу, пропитанную 0,03%-ным раствором бензимидазола. Для инфицирования грибами *Fusarium oxysporum* L. используют проростки гороха. Культуральную жидкость для инфицирования предварительно фильтруют через двойной слой марли для удаления кусочков мицелия. Заражение гороха возбудителем корневых гнилей и увядания *Fusarium oxysporum* L. проводили путем замачивания в водном смыве мицелия (1г на 100 мл воды). Корни проростков погружают в культуральную жидкость гриба на 15-20 минут. Зараженные проростки переносят во влажную камеру и используют для дальнейших анализов.[52]

3.5. Видовая принадлежность плесени, образующейся на корнях ячменя

С целью получения корневых плесеней и выявления антибиотиков семена ячменя сорта Скарлет выращивали на фильтровальной бумаге в фитокамере в контролируемых условиях в течение 10 дней. Зерно ячменя промывали проточной водой, замачивали на 2 часа в слабо розовом растворе калия перманганата. По 5 грамм ячменя раскладывали в 3 чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную водой, накрывали крышкой. Ставили чашки с ячменем в термостат суховоздушный ТС1/80 СПУ. При температуре 26° и влажности 60%. На 3-ий день появились корешки, на 7-ой день – плесень. С 7 по 10 день наращивали плесень (рис.3).



Рис.3. Плесень, выросшая на корнях ячменя

На 10 день плесень идентифицировали. Для наращивания плесени использовали среду Сабуро, предназначенную для культивирования грибов медицинского назначения. Наращивание плесени проводилось в течение 24 часов в термостате. На 2-ой день проводили идентификацию гриба и определяли его чувствительность к антибиотикам на бактериологическом анализаторе bio Merieux серии mini API (рис.4) по стрипам (рис.5).



Рис.4. Баканализатор марки bio Merieux серии mini API



Рис.5. Стрипы для определения бактерий

Плесневые грибы определяли также на сусло—агаре с антибиотиком цефтриаксон 500 ед/мл.

Вместе с тем, бактериальную обсемененность ячменя определяли методом посевов смывов с образцов ячменя на чашки Петри с МПА и учетом выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) после инкубирования в термостате при температуре 30° С в течение 3 суток.

Для получения смывов навеску ячменя массой 10г помещали в колбу с 90 см³ стерильной водопроводной воды. Колбу взбалтывали на качалке 10 минут. Из полученного смыва делали разведения: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ и высевали по 1 см³ на чашки Петри с МПА.

Для определения общей бактериальной обсемененности посевы производили сразу после смыва. Для определения термоустойчивых бактерий смывы перед посевом прогревали на водяной бане при 85-90° С в течение 15 минут.

3.6. Методы выделения антибиотиков из плесени ячменя

Открытие антибиотиков проводили по Добрыниной и Свешниковой (1967). Мицелий, выросший на проростках ячменя вместе с корешками растирали и экстрагировали антибиотики 0,1 М растворами KCl; NaHCO₃ и водой в соотношении 1:2 в течение 30 минут на встряхивателе (100 об/мин), затем отфильтровывали через 2 слоя марли.

Пенициллин выявляли с помощью гидроксилamina. К 5 каплям 0,5% раствора продажного пенициллина добавляют 2 капли 5%-ного раствора гидроксилamina и смесь нагревают до кипения. После охлаждения прибавляют 1 каплю 5%-го раствора хлорного железа. Жидкость приобретает розовую или красную окраску.

Грамицидин С выявляли путем выпадения желтого кристаллического осадка пикрата грамицидина. К 2 каплям раствора грамицидина прибавляли 2 капли 10% -го раствора пикриновой кислоты.

Стрептомицин открывали мальтозной реакцией. К 3 каплям 1%-го водного раствора стрептомицина добавляли 1 каплю 10%-го раствора NaOH и смесь кипятили на огне 5-10 секунд. После нейтрализации 2 каплями 10%-го

раствора HCl к жидкости добавляли 1-2 капли раствора FeCl₃. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Тетрациклины выявляются реакцией на тетраамицин хлорного железа. К 5 каплям 0,5% -го раствора тетраамицина добавляют 1 каплю 5%-го спиртового раствора хлорного железа – появляется коричневая окраска.

Изучение влияния вытяжек из плесени ячменя на инфицированные проростки гороха сорта Фараон проводили в климатической камере при температуре 25° С. Заражение семян проводили путем замачивания в течение 2-х часов в культуральной жидкости гриба *Fusarium oxysporum*. Контролем служили незараженные проростки. Опытные семена предварительно обрабатывали вытяжками из плесени в разведении: 1:10; 1:100 и 1: 100. Проростки гороха выращивали до 15 дней.

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1. Скрининг генотипов ячменя коллекции ВИР на содержание гордецина

Для промышленного производства растительных антибиотиков, прежде всего, требуется выявить его источник (сырьё). С этой целью необходимо провести скрининг на его содержание в районированных и перспективных сортах ячменя, оценить его экономическую эффективность и вырастить в производственных экологически чистых условиях.

В диссертации Е.В.Костромичевой (2013), посвященной исследованию содержания гордецина в различных сортах и линиях ячменя селекции ГНУ ВНИИЗБК и сортов саратовской селекции, установлено, что в среднем выход гордецина из озимых сортов ячменя составляет 0,62 %, из яровых 1,18 %. По суммарному количеству гордецина среди озимых образцов лидирует Жигули (1,43%). Высокое содержание отмечено в сортах ячменя Волгодон и Фрегат, количество вещества в которых составило 0,97% и 0,51% соответственно. От 0,48% до 0,49% гордецина обнаружено в сортообразцах Фараон, Ураган, Мастер, №1681, №1629. В семенах озимых ячменей Садко и №546 выявлено самое низкое количество гордецина – 0,43% и 0,45% соответственно.

Для селекции новых сортов сельскохозяйственных культур, в том числе и ячменя, используют генетическую коллекцию Всероссийского института растениеводства им. Н.И.Вавилова. В нашей работе исследованы 14 образцов ячменя коллекции ВИР различного географического происхождения (рис. 6 и приложение 2).



Рис.6. Развитие растений ячменя различных генотипов

Скрининг генетической коллекции ячменя показал, что генотипы ячменя существенно различаются по содержанию гордецина (рис. 7). Разброс данных составляет 1 мг/% - 12 мг/%.

Наименьшее содержание антибиотика было у сорта Белогорского, местного сорта из Армении и *Westendorf Tirol* (от 1 до 2 мг/%). Сорт Белогорский устойчив к полеганию и пыльной головне, но восприимчив к мучнистой росе и пятнистостям. Два других генотипа полегают при неблагоприятных условиях среды, поражаются всеми грибными заболеваниями.

Рекордсменами по наличию гордецина являются сорта Сигнал *nutans* и Амулет, у которых количество гордецина достигает 11-12 мг/%. Сигнал средне полегаемый и поражается всеми грибными заболеваниями, а Амулет устойчив к полеганию, к мучнистой росе, слабо поражается пятнистостями.

У большинства генотипов содержание гордецина колеблется от 4 до 9 мг/%. Из них среднеустойчивыми к полеганию являются сорта Белогорский, Золотник, Белорусский 76, Московский 121. Белорусский 76 устойчив к мучнистой росе. Таким образом, четкая зависимость между содержанием гордецина, полеганием и устойчивостью к грибным заболеваниям выявлена не у всех образцов.

По данным Е.В.Костромичевой (2013), установлена положительная взаимосвязь содержания гордецина с устойчивостью ячменя к мучнистой росе

и слабая взаимосвязь с устойчивостью к гельминтоспориозу и ржавчине. Это дает возможность отбора соответствующих по данным признакам образцов для включения их в селекционную программу создания устойчивых к заболеваниям новых сортов ячменя.

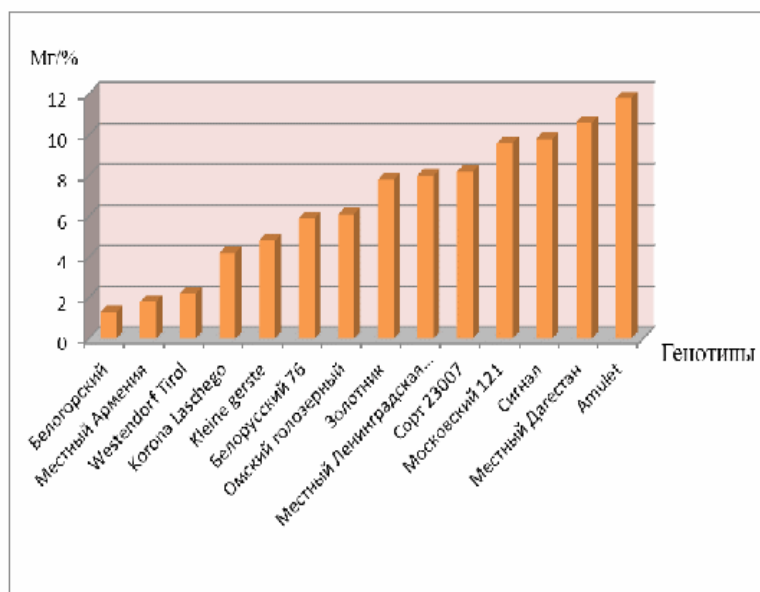


Рис.7. Результаты скрининга генотипов ячменя коллекции ВИР на содержание гордецина (n=3; P ≤ 0,05)

4.2. Динамика синтеза гордецина в проростках ячменя

Вместе с тем, наблюдения за синтезом гордецина в процессе развития проростков ячменя различных по устойчивости генотипов показало серьезные различия у отдельных представителей ячменя. Так, для анализа были выбраны два образца, резко различающиеся устойчивостью к мучнистой росе и пятнистостям. Наибольшее количество гордецина определено у генотипов Сигнал и Амулет (11-12 мг/%), наименьшее – у сорта Белогорского и местного сорта из Армения (от 1 до 2 мг/%) (приложение 2 и рис. 8). Факты показывают, что синтез гордецина при прорастании наиболее интенсивный в проростках генотипа Амулет на первых этапах развития. Через 16 часов прорастания он достигает более 9 мг/%. Дальнейшее развитие сопровождается плавным снижением синтеза гордецина, до 5, 26 мг/% на 5-ый день прорастания. У

образца Местный Армения динамика синтеза несоизмерима с таковой у первого образца. Количество гордецина не превышает величины, около 1,0 мг/%, с небольшим подъемом через 16 часов прорастания. Это связано, прежде всего, с закислением эндосперма зерновки и активизацией ферментных систем, ответственных за гидролиз запасных веществ и синтез *de novo*.

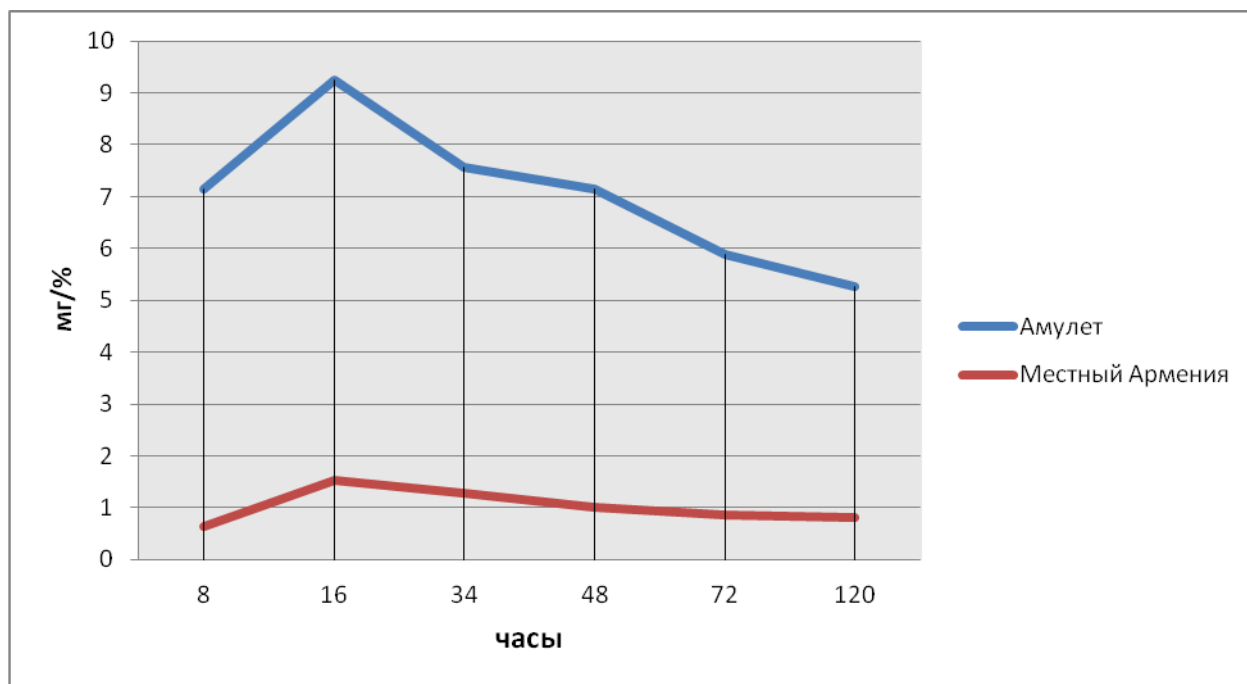


Рис.8. Динамика содержания гордецина при прорастании семян ячменя (мг/%) (n=3; P ≤ 0,05).

Таким образом, исследования синтеза гордецина по образцам ячменя, различающихся устойчивостью к возбудителям болезней, на ранних этапах прорастания дает возможность отбора устойчивых образцов и с помощью соответствующих скрещиваний включать их в селекционную программу. Вместе с тем, что не менее важно, выявляя экспрессию генов, ответственных за данный признак, можно использовать данные образцы в период наибольшего синтеза гордецина для создания устойчивых трансгенных сортов с помощью переноса соответствующих генов в момент их наибольшей активности. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы: У большинства генотипов содержание гордецина колеблется от 4 до 9 мг/%. Наибольшее количество гордецина определено у генотипов Сигнал и Амулет

(11-12 мг/%), наименьшее – у сорта Белогорского, местного сорта из Армении и *Westendorf/Tirol* из Австрии (1 - 2 мг/%),

Синтез гордецина при прорастании наиболее интенсивный в проростках ячменя на первых этапах развития (через 16 часов прорастания), дальнейшее развитие сопровождается плавным снижением синтеза гордецина на 5-ый день прорастания.

4.3. Химическая природа гордецина из ячменного зерна

На основании методики выделения гордецина, описанной в главе 3, было получено вещество гордецин- маслянистая жидкость желтого и светло коричневого цвета, имеющая специфический запах меда и ржаного хлеба (рис.9).



Рис.9. Фракции гордецина (нейтральная и карбонатная), выделенные из семян ячменя

Костромичевой Е.В. (2013) была разработана технология выделения гордецина из малых проб зерна ячменя. Выделение гордецина проводили методом, предложенным Новотельновым Н.В. и Ежовым И.С. (1968). Однако в ходе проведения эксперимента были внесены некоторые корректирующие методические операции. Они, прежде всего, связаны с невозможностью точного

воспроизведения схемы определения гордецина по Новотельнову Н.В. и Ежову И.С., в связи с ограниченностью селекционного материала и дополнительными затратами на расходные материалы, экономически не обоснованные. Проведя некоторые изменения в ходе выделения, Костромичева Е.В. предложила схему получения гордецина, описанную в главе 3.

Ниже представлены собственные данные проведенных исследования по очистке препаратов гордецина методами ВЭЖХ. Препаративная хроматограмма данного препарат приведена на рис.10, из которого видно, что спиртовой экстракт карбонатной фракции содержит несколько пиков. Указанные на хроматограмме фракции собирали в круглодонные колбы, упаривали на роторном испарителе досуха при температуре 25° С и растворяли в метаноле. Для идентификации пика соответствующего гордецину нами был использован тот факт, что очищенный препарат гордецина в УФ области спектра содержит плато в области 260-275 нм. При снятии УФ-спектров полученных фракций установлено, что плато в указанной области характерно только для фракции-4(рис.11). На этом основании можно предположить, что фракция-4 соответствует гордецину.

На рис. 12 приведена аналитическая хроматография препаративно полученной фракции-6. Она содержит только один пик, что свидетельствует о чистоте полученного препарата гордецина. Для полученного препарата гордецина был получен масс-спектр (рис.13), на котором присутствует несколько пиков. Наиболее высокомолекулярный из них с M/z равным 485,8 соответствует по молекулярной массе окисленной форме гордецина (469,6) (Новотельнов, 1967), а более низкомолекулярные соответствуют по-видимому продуктам распада гордецина. Данные масс-спектра препарата подтверждают, что он является гордецином, но в окисленной форме. Процесс окисления препарата гордецина, содержащего несколько сопряженных непредельных химических связей, по-видимому, происходит в процессе снятия масс-спектра.

На рис.14. приведена зависимость площади под хроматографическим пиком препарата гордецина от его концентрации в растворе. Видно, что эта

зависимость линейна в области концентраций от 6 до 100 мкг/мл с высоким коэффициентом корреляции ($R^2=1$) и описывается уравнением -1: $y=43,975x - 3,0417$. Используя эту зависимость или уравнение, можно методом ВЭЖХ определить концентрацию очищенного препарата гордецина в неизвестном растворе.

Эту же задачу можно решить, используя спектрофотометрические данные (рис.15.). На этом рисунке приведена зависимость оптической плотности (260 нм) метанольного раствора очищенного гордецина от его концентрации. Видно, что эта зависимость линейна до концентрации 100 мкг/мл с высоким коэффициентом корреляции ($R^2=0,9988$) и описывается уравнением-2: $y=0,0131x$. Используя эту зависимость или уравнение, можно методом спектрофотометрии определить концентрацию очищенного гордецина в растворе с неизвестной концентрацией.

Определить концентрацию гордецина в спиртовом экстракте карбонатной фракции можно, используя данные, приведенные на рис.16.. На этом рисунке приведена зависимость оптической плотности (260 нм) спиртового экстракта карбонатной фракции от концентрации гордецина (предварительно определена методом ВЭЖХ). Видно, что она линейна до концентрации 30 мкг/мл с высоким коэффициентом корреляции ($R^2=0,09996$) и описывается уравнением-3: $y=0,0433x$. Используя эту зависимость или уравнение, можно методом спектрофотометрии определить концентрацию гордецина в спиртовом экстракте карбонатной фракции. Однако, сравнивая уравнение -2 с уравнением-3, можно видеть, что существенный вклад в уравнение-3 вносят примесные вещества. Этот факт говорит о ненадежности определения концентрации гордецина в спиртовом экстракте карбонатной фракции.

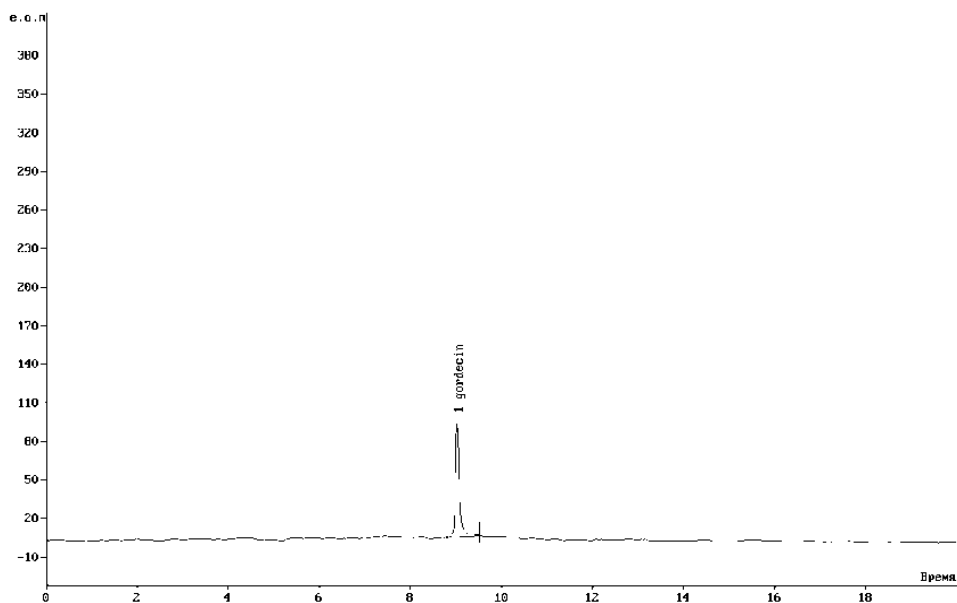


Рис.10. Preparative chromatogram of a spirit extract of the carbonate fraction, containing gordenin. Conditions: column –Ultrasil-Si(250 x 7.8; 10 μ m); mobile phase – 97,5% hexane + 2,5% isopropanol; flow rate – 2 ml/min; sample injected on the column – 2 ml; detection – UV at 260 nm

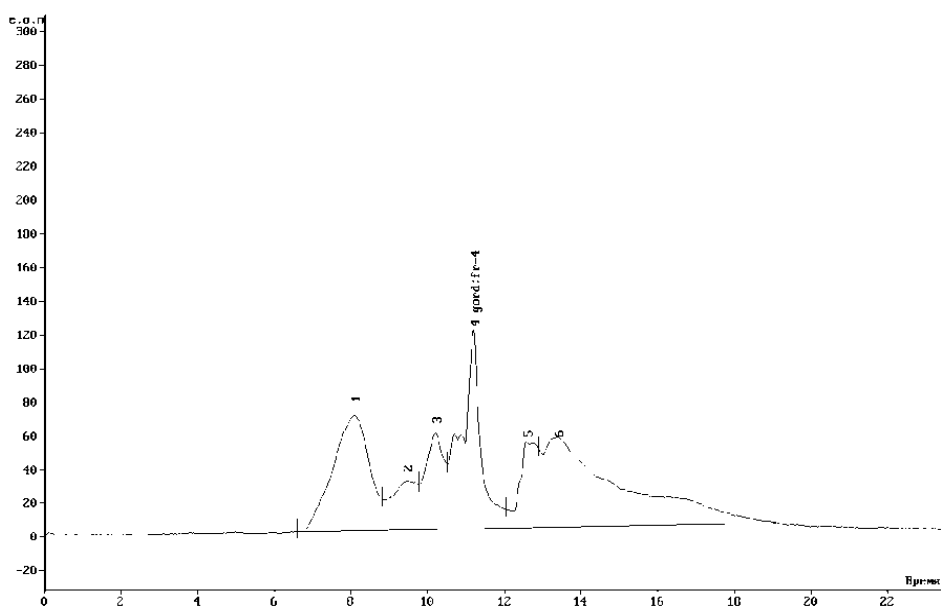


Рис.11. UV spectrum of a methanolic solution of chromatographically purified gordenin. The spectrum was obtained in a 1 cm quartz cuvette on a SPECORD UV VIS spectrophotometer

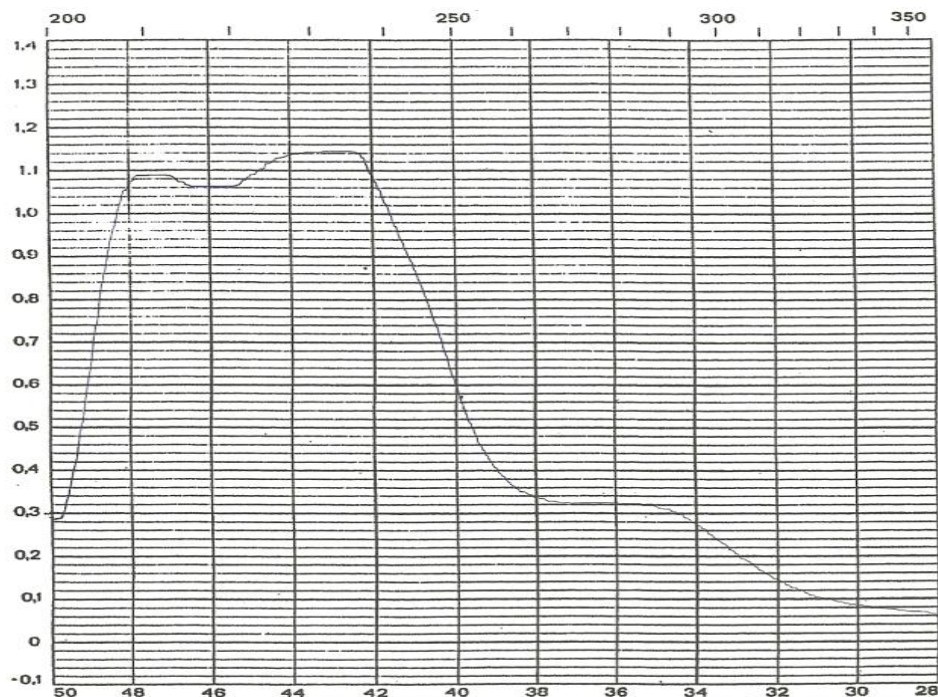


Рис.12. Аналитическая хроматограмма хроматографически очищенного препарата гордецина

Условия: колонка –Ultrasil-Si(250 x 4,6; 5 мкм); подвижная фаза – 97,5% гексан + 2,5% изопропанол; скорость протока – 0,5 мл/мин; проба, наносимая на колонку – 10 мкл(с= 1мг/мл); детектирование – УФ при 260 нм.

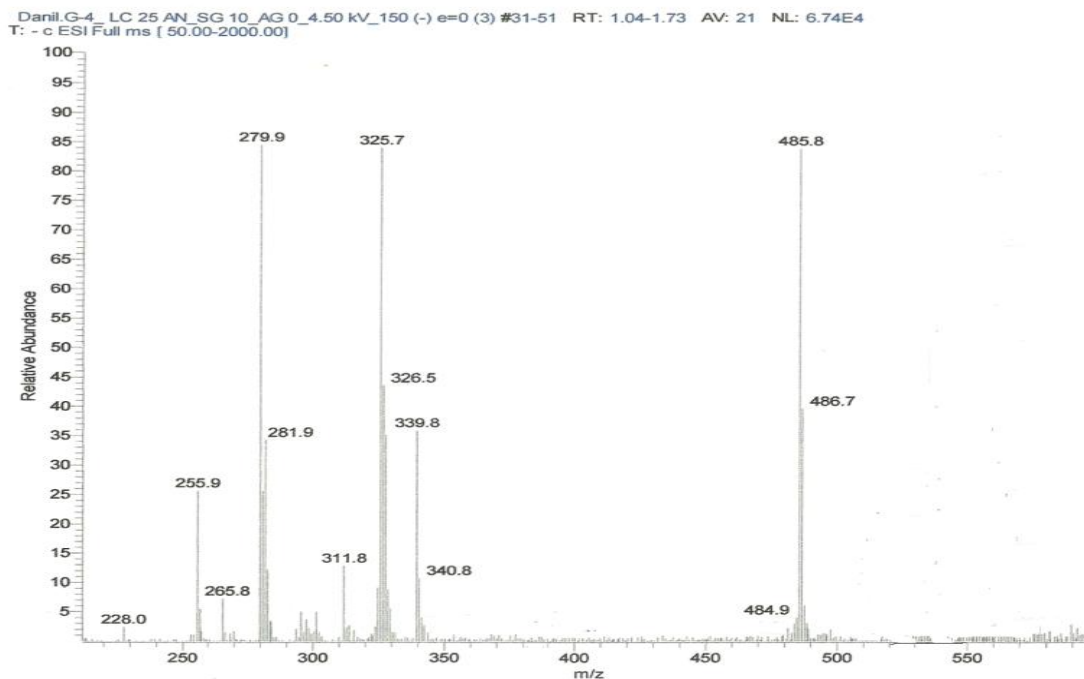


Рис.13. Масс-спектр препарата гордецина. Регистрация в режиме сканирования масс отрицательных ионов на масс-спектрометре Finnigan LCQ Advantage (США).

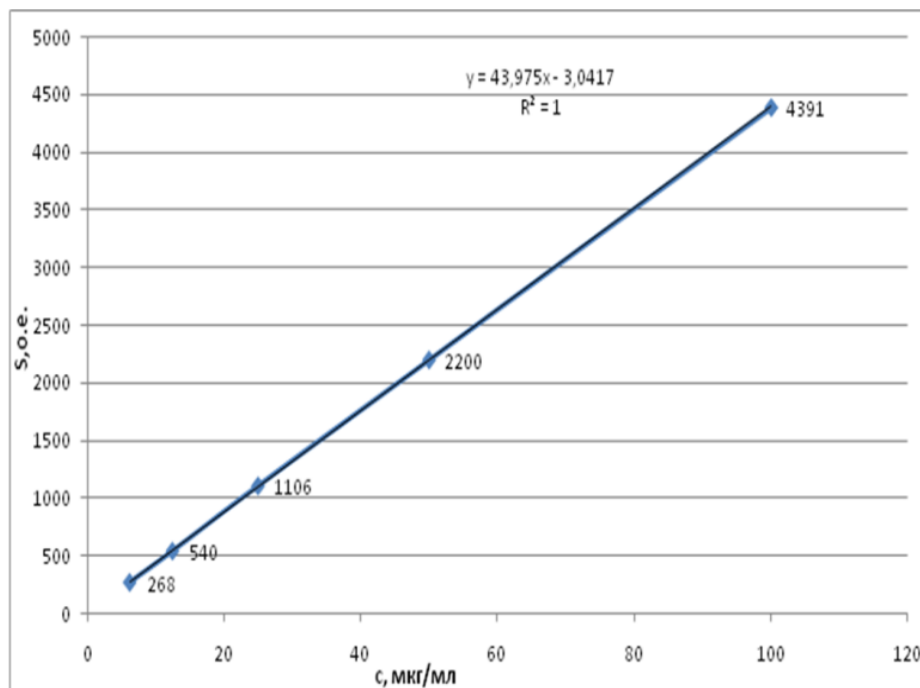


Рис.14. Зависимость площади под хроматографическим пиком метанольного раствора гордецина от концентрации.

Условия хроматографии: колонка – Ultrasil(250 x 4.6 мм; 5 мкм); подвижная фаза- 97,5% гексан + 2,5% изопропанол; скорость протока- 0,5 мл/мин; детектирование – УФ при 260 нм.;пробы наносимые на колонку- 100 мкл(с= 6,25 мкг/мл - 100 мкг/мл).

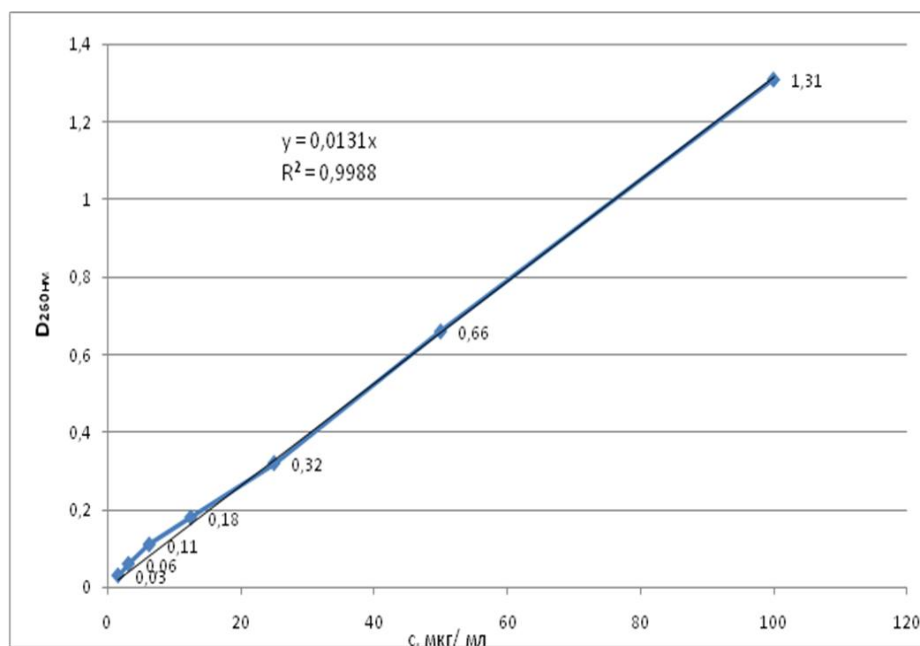


Рис.15. Зависимость оптической плотности метанольного раствора гордецина от концентрации. Измерения проводили в 1 см кварцевой кювете при 260 нм

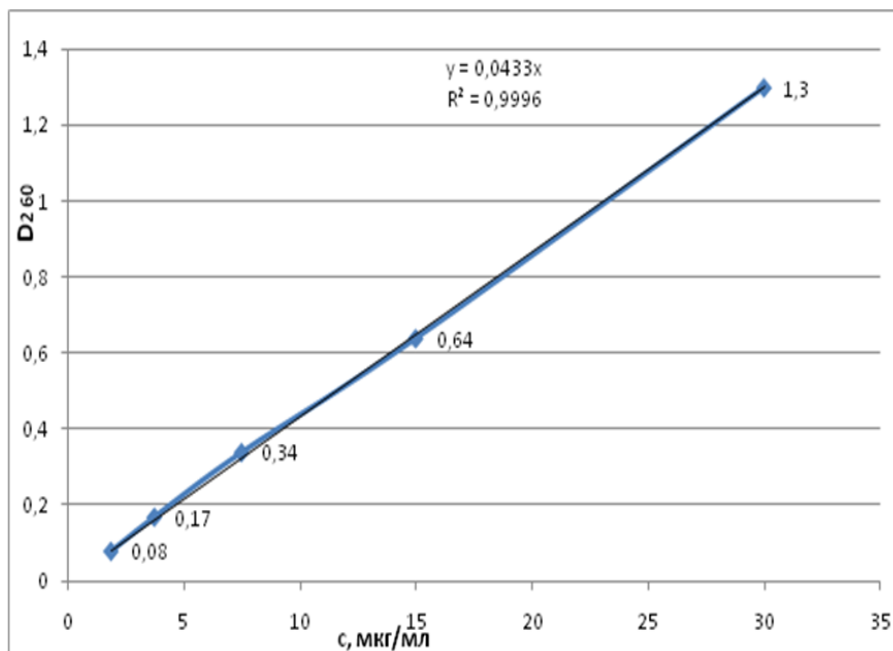


Рис.16. Зависимость оптической плотности этанольного экстракта карбонатной фракции от концентрации в ней гордецина. Содержание гордецина было предварительно определено методом ВЭЖХ с использованием в качестве стандарта хроматографически очищенного гордецина. Измерения проводили в 1 см кварцевой кювете при 260 нм.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

Разработана методика выделения гордецина из малых проб зерна ячменя

Разработана методика ВЭЖХ для очистки гордецина.

Установлено, что гордецин в условиях снятия масс-спектра, видимо, переходит в окисленную форму.

Показано, что количественно гордецин можно определить хроматографическим методом или спектрофотометрически после его хроматографической очистки.

4.4. Видовая принадлежность плесени, образующейся на корнях ячменя

Причиной низкого качества зерна ячменя является высокая восприимчивость культуры к комплексу фитопатогенных микроорганизмов, которые приводят к значительному снижению его жизнеспособности, изменению химического состава и ухудшению органолептических показателей. Основной причиной низкого качества зерна ячменя пивоваренного является развитие фитопатогенной микрофлоры, представленной в основном мицелиальными грибами родов: *Altemaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Известно, что в полевых условиях повреждение всходов и корневая гниль вызываются жизнедеятельностью *Fusarium spp.* и *Cochliobolus sativus*.

Продукты метаболизма грибов способны вырабатывать токсичные вещества, опасные для здоровья человека и животных. Несмотря на то, что на настоящий момент определено уже довольно большое количество микотоксинов, лишь пять из них важны с точки зрения сельского хозяйства. К ним относятся афлатоксины, ОЛ, фузариотоксины DON (в некоторых регионах — NIV), ZEA и фумонизин [110](6).

Несмотря на то, что некоторые виды рода *Fusarium* оказывают вредное влияние на рост зародышевых корешков во время солодоращения, существуют виды *F. Culmorum* и *F. moniliforme*, которые усиливают рост корешков. *F. Moniliform* продуцирует гиббереллиновую кислоту, способствующую ускорению солодоращения.

В монографии, изданной в 2005 году [56], перечислены встречающиеся в Новом и Старом свете микроорганизмы ячменя. К сожалению, данные по России не приводятся. Вместе с тем, к болезням, поражающим ячмень, относятся ржавчина, гельминтоспориоз, мучнистая роса, фузариоз, твердая и пыльная головня, аскохитоз и др.

Исследования, связанные с выявлением микрофлоры ячменя, являются важными не только с позиции пивоварения, но и устойчивостью к микрофлоре соответствующего ареала выращивания, а также возможностью поражения возделываемых сортов.

Ячмень поражается различными микроорганизмами в зависимости от места произрастания и генотипа. Однако подобные исследования в России не проводятся и наша работа совместно со специалистами ВИР, владеющими мировой коллекцией растительных ресурсов, позволят пролить свет на данную проблему.

В образцах, полученных из ВИР, первые наблюдения показали наличие на корнях ячменя плесени (рис.17, 18).

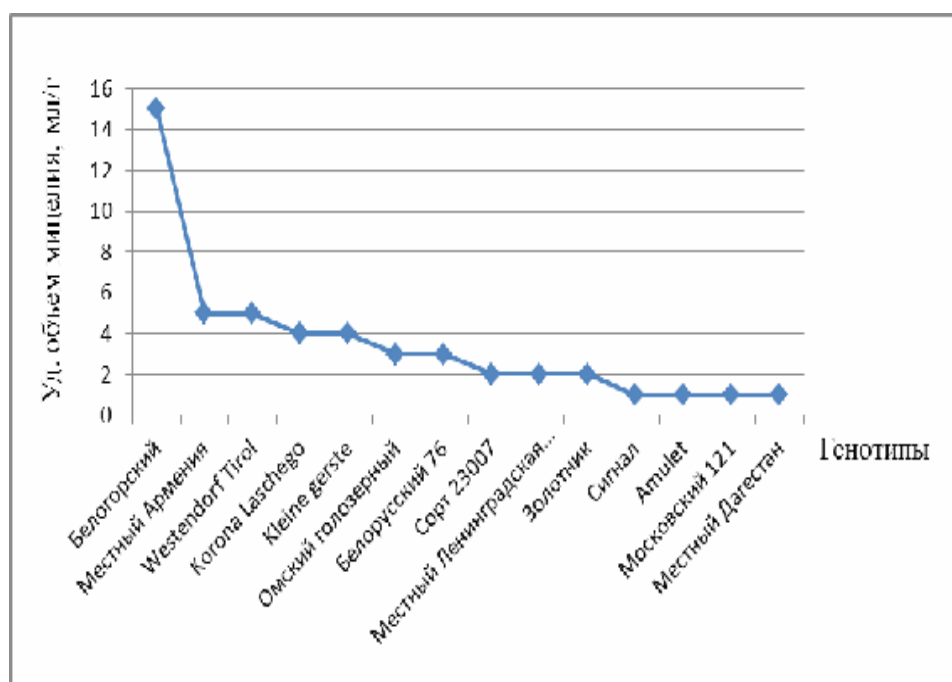


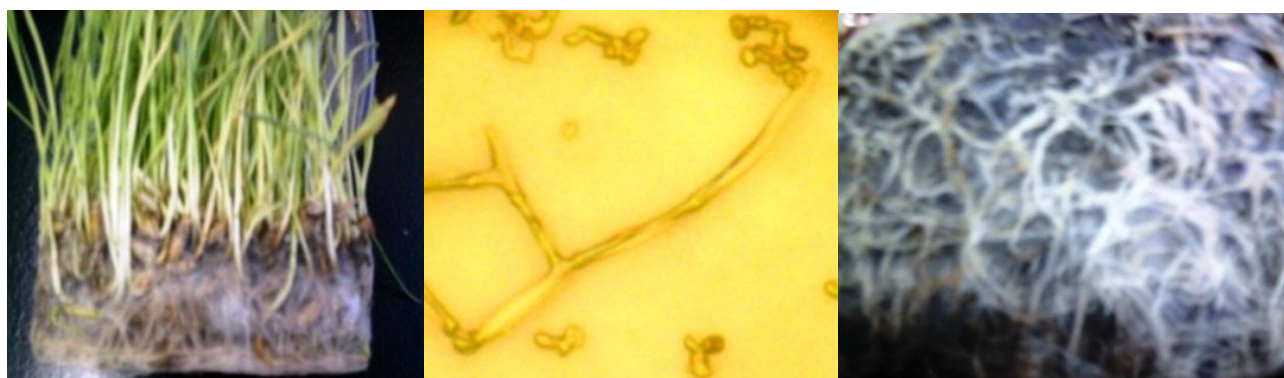
Рис.17. Объем плесени на корнях ячменя в течение 10 дней. (n=3; P ≤0,05)

Наличие и влияние метаболитов плесени на рост, развитие и устойчивость растений ячменя и других культур изучены очень слабо. Целью данных исследований было восполнить этот пробел и выявить классы микроорганизмов ячменя, произрастающих в условиях Орловской области Российской Федерации, а в дальнейшем изучить биологическую активность метаболитов важнейших микроорганизмов на восприимчивость культуры к важнейшим возбудителям болезней.

Между тем, установлено, что развитие плесени на корнях различных генотипов ячменя обратно пропорционально содержанию гордецина в

зерновках и строго повторяется по образцам (рис. 17). При сравнении рис 17 и ранее представленном рис.7. по скринингу генотипов на содержание гордецина, ясно прослеживается обратная зависимость роста плесени на корнях ячменя и содержания гордецина в ячмене. Это дает основание полагать, что гордецин сдерживает заражение ячменя микроорганизмами. Вместе с тем, кроме плесени, представляющей собой мицелий грибов, на корнях ячменя поселяются бактерии. Микроорганизмы являются источниками антибиотических веществ, для чего поставлена задача выявить наличие источников антибиотиков, идентифицировать их и установить связь с устойчивостью ячменя к возбудителям болезней.

Плесень, выросшая на корнях ячменя (рис.18), видимо, относится к грибам рода *Streptomyces*. [131]



а

б

в

Рис. 18. Плесень *Streptomyces*, (или *Septomyces spp*): а) внешний вид на корнях; б) увеличение под микроскопом 10×100; в) общий вид плесени

Современная флюоресцентная технология на бактериологическом анализаторе дает возможность получить идентификацию микроорганизмов за 2 часа и определить чувствительность к отдельным антибактериальным препаратам за 4 часа, а полная антибиотикограмма выдается максимум через 24 часа. Идентификация микроорганизмов проводится на более чем 30 субстратах, что обеспечивает высокую специфичность и точность результата.

На рис.19. Представлены проросшие зерна ячменя, подготовленные для микробиологического анализа.



Рис.19. Проросшие зерна ячменя на микробиологический анализ

При идентификации грибов баканализатор выдал на экран «Хорошая идентификация» *Streptomyces*. Таким образом, плесень, выросшая на корнях ячменя (рис.18), оказалась *Streptomyces* (рис.20). Представители рода *Streptomyces* относятся к актиномицетам и продуцируют 3000 антибиотиков, среди которых *S.griseus* синтезирует более 50 антибиотиков, активных против микроскопических грибков, бактерий и опухолевых клеток. Определить вид, к которому относится данный актиномицет, предстоит в дальнейшем.



Рис.20. Актиномицет *Streptomyces* на корнях ячменя

Бактериальную обсемененность ячменя определяли методом посевов смывов с образцов ячменя на чашки Петри с МПА и учетом выросших колониеобразующих единиц (КОЕ) после инкубирования в термостате при температуре 30° С в течение 3 суток (рис.21).

На основании проведенных исследований (таблица 4 и рис.21) установлено наличие в корнях ячменя *Bacillus. Brevis*, являющегося источником антибиотика грамицидина. В работе анализировались четыре образца ячменя

Таблица 4

Бактериальная обсемененность ячменя различных сортов

Сорт	Общее количество микроорганизмов, КОЕ/г	Содержание <i>Bacillus</i> , КОЕ/г	Примечание
14891 Дагестан	$5,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$ (0,8%)	Выделены <i>Bac. Subtilis</i> и 3 штамма <i>Bac. brevis</i>
К-30943 <i>Amulet</i>	$6,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$ (0,33%)	Выделены <i>Bac. Subtilis</i> и 1 штамм <i>Bac. brevis</i>
К-270080 Белорусский 76	$1,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$ (0,12%)	
6557 Армения	$3,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^2$ (0,25%)	

Bac. brevis - мелкая Гр+ спорообразующая палочка (1-2 мкм), образует споры, термоустойчивая, обладает каталазной активностью.



Рис.21. *Bac. Brevis*, выросшая на зернах ячменя

Общее количество микроорганизмов (КОЕ/г) установлено по образцам ячменя в порядке убывания: 6557 Армения ($3,6 \times 10^5$) > К-270080 Белорусский 76 ($1,7 \times 10^5$) > К-30943 *Amulet* ($6,0 \times 10^4$) > 14891 Дагестан ($5,0 \times 10^4$). Из этих данных нельзя сделать вывод, что общее количество микроорганизмов связано с устойчивостью либо к полеганию, либо с устойчивостью к болезням.

Из общего количества выявленных микроорганизмов на *Bacillus*, КОЕ/г приходится по образцам ячменя в порядке убывания: 14891 Дагестан ($4,0 \times 10^2$) (0,8%) > К-30943 *Amulet* ($2,0 \times 10^2$) (0,33%) > 6557 Армения ($9,0 \times 10^2$) (0,25%) > К-270080 Белорусский 76 ($2,0 \times 10^2$) (0,12%). Кроме того, из образца 14891 Дагестан выделены *Bac. Subtilis* и 3 штамма *Bac. brevis*, а из образца К-30943 *Amulet* выделены *Bac. Subtilis* и 1 штамм *Bac. Brevis*. Если соотнести эти данные с устойчивостью, то можно наблюдать, что при наличии максимально выявленных штаммов (3 штамма *Bac. Brevis*) у образца Дагестан, устойчивостью к полеганию и болезням он не отличается. Амулет, у которого всего по одному штамму *Bac. Subtilis* и 1 штамм *Bac. Brevis*, напротив, устойчив ко всем видам болезней: к мучнистой росе, слабо поражается пятнистостями и устойчив к полеганию. Возможно, это связано с активностью штамма, продуцирующего грамицидин или другой антибиотик. Следует провести дополнительные исследования по выявлению активных штаммов

Bac. Subtilis и *Bac. Brevis* и влияния данных микроорганизмов на устойчивость к определенным возбудителям.

Параллельно проводили идентификацию бактерий, содержащихся в плесени ячменя, прибором Баканализатор марки bio Merieux серии mini API. Использовался набор реагентов для научно исследовательских целей Atb g - 5(00) - стрипы для определения чувствительности энтеробактерий к антибиотикам (25 стрипов). Прибор выдал на экран «Удовлетворительная идентификация» бактерии Клебсиела пневмонии (рис.22). *Klebsiela pneumoniae* - вид грамотрицательных факультативно- анаэробных условно- патогенных бактерий. Входит в состав нормальной микрофлоры кишечника, кожи, ротовой полости человека. Имеет вид небольшой округлой палочки размером 0,5-0,8 на 1-2 мкм. *Klebsiela pneumoniae* не образует спор, неподвижна, способна к образованию капсул. Располагаются одиночно, попарно и скоплениями.

Вместе с тем, *K. pneumoniae* является одним из возбудителей пневмонии, а также урогенитальных инфекций, гнойных абсцессов печени, селезёнки. Вызывает гнойные и также патогенен и для некоторых животных. Некоторые штаммы обладают полирезистентностью к антибиотикам, обусловленную наличием R-плазмиды. Капсула является фактором патогенности (10).

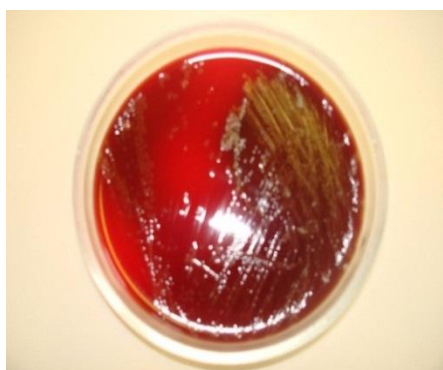


Рис.22. *Klebsiela pneumoniae* на Гемегаре JPG

Клебсиелла (лат. *Klebsiella*) — род условно-патогенных бактерий, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*.

Клебсиеллы — прямые грамотрицательные палочки (0,3-1,0 × 0,6-6,0 мкм), располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками. Образуют капсулы. Неподвижны. Факультативные анаэробы. Факторы вирулентности: капсула, эндотоксин, маннозорезистентные пили. Растут на простых питательных средах. Обладают выраженной биохимической активностью.[131]

Представители рода встречаются в фекалиях человека, на коже и слизистых дыхательных путей, в почве, воде, фруктах и овощах. Благодаря капсуле устойчивы в окружающей среде.

Наиболее частыми возбудителями клебсиеллезов являются *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*. Бактерии этого рода вызывают пневмонию, урогенитальные инфекции, в том числе у новорожденных, у ослабленных и пожилых лиц, конъюнктивиты, менингиты, сепсис, острые кишечные инфекции. *Klebsiellapneumoniae subsp. ozaenae* и *Klebsiellapneumoniae subsp. rhinoscleromatis* вызывают соответственно озену и риносклером (гранулематозное поражение слизистой оболочки верхних дыхательных путей).

Среди данного рода встречаются супермикробы, которых в других местах нет. Так, в госпитале Колумбийского университета обитает бактерия Клебсиелла с множественной устойчивостью. Заражение такой бактерией при ослабленном иммунитете, скорее всего, приведет к смерти. В основном болезни, вызываемые этой супербактерией, являются туберкулез, пневмония, заболевания кишечной системы.

Нами проведены исследования чувствительности *Klebsiella pneumoniae*, выделенной из корней ячменя, на группу основных антибиотиков (таблица 5)

Таблица 5

Чувствительность *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам

Антибиотик	Чувствительность <i>Klebsiella pneumoniae</i> к антибиотикам	Дозы при которых <i>Klebsiella pneumoniae</i> устойчива к антибиотикам (MED) международные единицы
ПЕНИЦИЛЛИН	R	40
АМОКСИЦИЛЛИН	S	-
ПИПЕРАЦИЛЛИН + ТАЗОБАКТАМ	S	-
ТИКАРЦИЛЛИН	R	40
ТИКАРЦИЛЛИН / КЛАВУНАТ	S	-
ЦЕФОКСИТИН	R	129
ЦЕФТАЗИДИМ	R	133
ЦЕФЕПИМ	R	40
ЦЕФУРОКСИМ	R	40
МЕРОПЕНЕМ	R	131
ИМИПЕНЕМ	S	-
КОТРИМАКСОЗОН	S	-
ТОБРАМИЦИН	S	-
АМИКАЦИН	S	-
ГЕНТАМИЦИН	S	-
НЕТИЛМИЦИН	S	-
ЦИПРОФЛОКСАЦИН	S	-
ГОРДЕЦИН	I	-

S-чувствительна

I-умеренно-чувствительна

R-устойчива

Таким образом, проведенные исследования показали наличие на зерне ячменя актиномицета *Streptomyces* и бактерий *Bac.Subtilis*, *Bac.Brevis*, *Klebsiela pneumonia*.

4.5. Наличие антибиотиков в корневой плесени ячменя

Вместе с тем, в настоящее время вновь возрос интерес к еще одной группе веществ, называемых веществами вторичного обмена, к которым относятся антимикробные соединения, прежде всего, фунгициды и антибиотики. Интерес к антимикробным веществам растений связан с открытием советского ученого Токина Б.П.(1967), согласно которому, растения продуцируют бактерицидные вещества – фитонциды, играющие роль в иммунитете растений.

Выращивание растений ячменя в климатической камере показало различие роста как самих растений ячменя, так и развитие плесени на их корнях в зависимости от генотипа (рис.6, 18).

В приложении 1 вынесены отдельные генотипы ячменя.

В таблице 6 представлены данные по взаимосвязи объема плесени, развивающейся на корнях ячменя с наличием антибиотиков в ней.

Таблица 6

Вес плесени и содержание антибиотиков (мг/мл)

№ №	Название образца	Уд.объем мицелия, мл/г	Пени- цилин	Стрепт о- мицин	Тетрац иклин	Грамици- дин
1	22089. Ленинградская обл. Белогорский/	15	0,02	0,0064	0,0046	0,0

	<i>vihotense</i>					
2	30845. Новосибирская обл. Золотник/ <i>medicum</i>	2	0,015	0,0071	0,0036	0,0
3	6557. Армения. <i>Nudum</i>	5	0,12	0,0095	0,0079	0,013
4	14891. Дагестан. Местный	1	0,03	0,0062	0,0022	0,011
5	27080. Беларусь. Белорусский 76	3	0,06	0,0060	0,004	0,0475
6	19417. Московская обл. Московский 121	1	0,06	0,0056	0,0027	0,0105
7	30943. Чехия. <i>Amulet/ Nutans</i>	1	0,008	0,0064	0,0	0,048
8	29860. Германия. Kleine gevste Cocleste	4	0,04	0,0074	0,0018	0,0
9	28292. Австрия Nudum	5	0,03	0,0079	0,0018	0,0163
10	30919. Омская обл. Омский голозерный	3	0,06	0,0068	0,0027	0,0163
11	27471. Польша.	4	0,02	0,0062	0,0017	0,0

	Kovona Laschrgo					
12	17844. Ленингр. обл. Cocleste местный	2	0,05	0,008	0,0025	0,0
13	30846. Новосибирская обл. Сигнал	1	0,01	0,005	0,0	0,0
14	30440. Дания. 23007/ <i>Nudum</i>	2	0,04	0,0064	0,0024	0,013

Было установлено, что в плесени, развивающейся на корнях различных генотипов ячменя из коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова, обнаружены антибиотики: стрептомицин, тетрациклин и пенициллин, а также грамицидин. Генотипы ячменя различаются по их количественному содержанию. Вместе с тем, установлено, что вытяжка из плесени ячменя стимулирует рост растений гороха.

Анализ наличия антибиотиков в плесени показал (таблица 6) присутствие в незначительных количествах антибиотиков: пенициллина, стрептомицина, тетрациклина и грамицидина. Содержание пенициллина в образцах от 0,02 до 0,06 мг, стрептомицина от 0,0062 до 0,0071, тетрациклина от 0,0 до 0,0079 и грамицидина от 0,0 до 0,048 мг. Рекордсменом по накоплению антибиотиков пенициллина, стрептомицина и тетрациклина является образец 6557 Армения и по грамицидину 27080 Беларусский 76 и 30943 Амулет Чехия. Анализ связи между содержанием антибиотиков и устойчивостью к заболеваниям выявил следующее: образец 6557 Армения, несмотря на самое высокое содержание антибиотиков плесени, не устойчив ни к грибным болезням, ни к полеганию.

Можно предполагать, что подобная устойчивость может определяться наличием антибиотика грамицидина. Однако, по данным Гаузе Т.Ф. и

Бражниковой М.Г. (7), грамицидин продуцирует не плесень, а бактерии рода *Bacillus brevis*.

Из таблицы следует, что масса плесени у данных образцов невелика (1-3 мг/мл). Из всех изученных образцов только эти два генотипа не поражаются мучнистой росой и устойчивы к полеганию. Все остальные образцы поражаются мучнистой росой и полегают при неблагоприятных условиях. Однако, на эти признаки не влияет принадлежность ячменя к голозерным или пленчатым.

4.6. Исследования биологической активности антибиотиков на растительных тканях

Как видно из рисунка 19, вытяжка из плесени на корнях ячменя положительно влияет на энергию прорастания семян и развитие проростков гороха. Это связано, видимо, с содержанием в ней антибиотических веществ, которые стимулируют развитие растений.



А



Б

Рис.19. Влияние вытяжки из плесени на прорастание семян и развитие проростков гороха сорта Батрак на 5-ый день проращивания: А-контроль; Б-обработанные вытяжкой из плесени

Как видно из рисунка, вытяжка из плесени на корнях ячменя положительно влияет на энергию прорастания семян и развитие проростков

гороха. Это связано, видимо, с содержанием в ней антибиотических веществ, которые стимулируют развитие растений.[69]

Впервые антибиотики в борьбе с болезнями растений были применены в США для борьбы с бактериальным ожогом плодовых культур, где был использован медицинский стрептомицин. Основным отличием антибиотиков от других биопрепаратов является высокая избирательность действия. Они подавляют бактериальных и грибных возбудителей заболеваний, не оказывая отрицательного влияния в рекомендованных для применения нормах на рост и развитие растений. Их действие мало зависит от погодных условий, так как высока скорость проникновения в растения. Чаще всего они применяются в низких концентрациях из-за их высокой активности, что дает возможность избежать фитотоксичного действия таких препаратов на защищаемое растение.

В растениеводстве США для ликвидации болезней, вызванных бактериями, фруктовых, овощных и декоративных культур применяется стрептомицин, и для некоторых фруктовых культур – окситетрациклин. Сравнительно новые антибиотики – касугамицин и валидомицин используются исключительно в сельском хозяйстве для борьбы с болезнью риса, вызываемой грибом, и другими болезнями растений грибковой этиологии (Использование антибиотиков в сельскохозяйственном производстве США и стран Европейского Сообщества Жиганова Л.П.).[136]

На рис.20. Представлены результаты измерений опытных и контрольных проростков на 10-ый день прорастания.



Рис. 20. Развитие проростков гороха сорта Батрак по вариантам: 1- контроль (вода); 2- обработка гордецином 10^{-12} М; 3-обработка вытяжкой из плесени; 4-инфицированные *F. oxysporum*; 5-Инфицированные +гордецин; 6-инфицированные +вытяжка из плесени

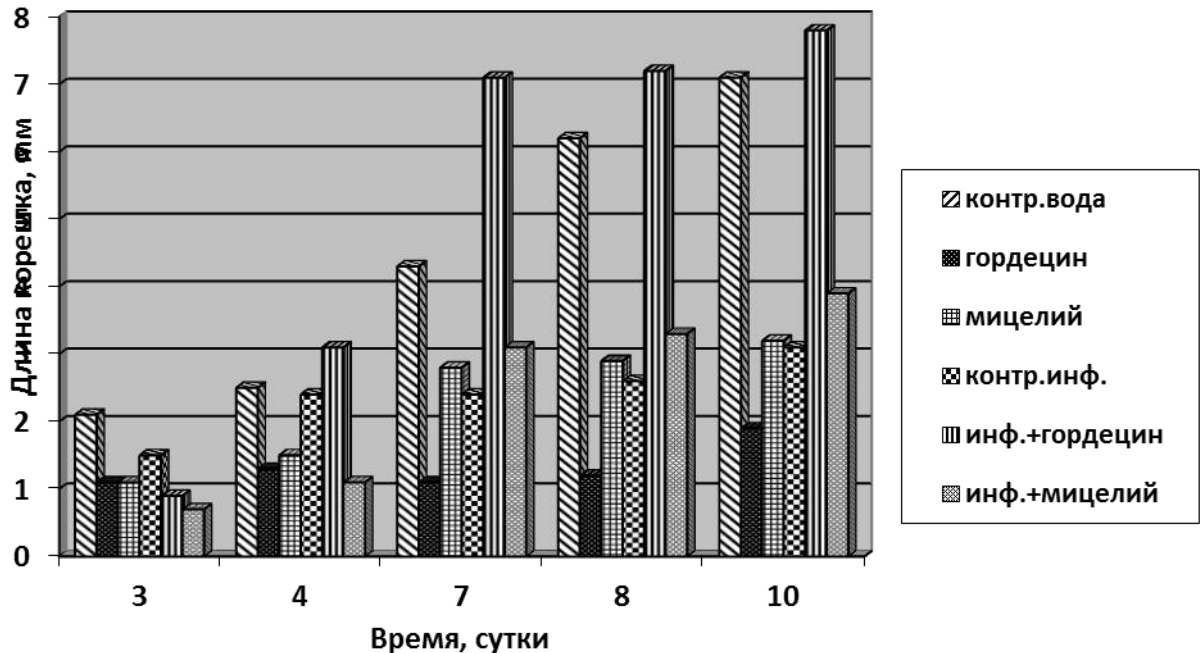


Рис.21. Влияние гордецина и плесени ячменя на развитие корневой системы здоровых и больных проростков гороха. (n=3; $P \leq 0,05$)

4.7. Влияние гордецина и плесени на активность антиоксидантных ферментов проростков гороха сорта Батрак, зараженного *Fusarium oxysporum*

Одной из существенных причин низких урожаев гороха в различных регионах страны является поражение растений корневыми гнилями – наиболее вредоносным заболеванием в условиях Орловской области. Потери урожая от данного заболевания могут составлять 30-50 % и более. Показатель вредоносности корневых гнилей – до 25%. [23]

Корневые гнили вызываются почвенными грибами. В зависимости от возбудителя различают фузариозную, аскохитозную, ризоктониозную, питиозную и афаномицетную корневые гнили. Наиболее распространенной и вредоносной является фузариозная корневая гниль. Фузариозная корневая гниль вызывается грибами рода *Fusarium Link.* В условиях средней полосы России доминируют виды *F. oxysporum Schlecht*, *F. culmorum Sacc*, *F. solani App. et Wr.* Растения поражаются на протяжении всего периода вегетации. Особенно опасно заболевание всходов. У больных растений сначала окрашивается в бурый цвет подсемядольное колено, а затем — прикорневая часть стебля или главный корень.

Пораженные участки принимают темно-коричневую окраску, на них образуются разной глубины язвы. Корни в этих местах часто растрескиваются. Больные растения отстают в росте и развитии, а при сильном поражении в ранние фазы развития погибают. Очень часто болезнь проявляется в виде трахеомикозного увядания. На вегетирующих растениях ее симптомы заметны в виде пожелтения нижних листьев с последующим распространением на средние и верхние, в дальнейшем они отмирают. Пораженные растения легко выдергиваются из почвы. На поперечном срезе стебля в местах поражения наблюдается побурение, являющееся следствием поражения сосудистой системы. Недобор урожая гороха, пораженного фузариозной корневой гнилью, может составлять 30% и больше, а содержание белка в зерне уменьшается на 3-5%. Основными источниками инфекции фузариозной корневой гнили являются

пораженные семена, в которых находится мицелий возбудителей, и растительные остатки в почве, служащие субстратом для их сапротрофного развития.

К настоящему времени нет утвержденных и внесенных в реестр разрешенных препаратов средств, эффективных против фузариозного заболевания гороха. Однако Павловской Н.Е. и др. (2009-2013 гг.) запатентованы 5 средств защиты гороха и других культур от болезней и вредителей. Поиски эффективных средств продолжаются и одним из перспективных препаратов является гордецин, который исследуется в качестве иммуномодулирующего средства против фузариоза.

После открытия Тарусовым Б.Н. в 1954 г. неферментативного свободнорадикального окисления ненасыщенных жирных кислот в тканях человека и животных прошло более полувека. Это открытие имеет важное значение для медицины, для которой он сформулировал представление о свободнорадикальной патологии, развивающейся под влиянием избытка продуктов свободнорадикального окисления ненасыщенных липидов: свободных радикалов, альдегидов и кетонов, перекисей ненасыщенных жирных кислот на примере лучевого поражения. Журавлев А.И. и Бурлакова Е.Б. показали, что неферментативное свободнорадикальное окисление, хотя и на очень низком уровне, но непрерывно протекает в тканях животных и человека в норме. Все эти работы послужили основой для развития свободнорадикальной биологии.

Свободнорадикальные процессы на растительных тканях изучаются также на протяжении последних 40-50 лет, особенно в связи с патологией и апоптозом, абиотических стрессоров различной природы, в том числе экстремальных температур (9-12). Действие биотических и абиотических стрессоров на растения сопровождается усилением образования активных форм кислорода.

Работами Павловской Н.Е. с сотрудниками (2012) показано, что под влиянием возбудителей болезней гороха, пшеницы и др. культур, а также при

явлении апоптоза происходит резкое возрастание образования свободных радикалов, сопровождаемое увеличением активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы, а также низкомолекулярных компонентов: витамина С, витамина Е, каротиноиды и т.д.

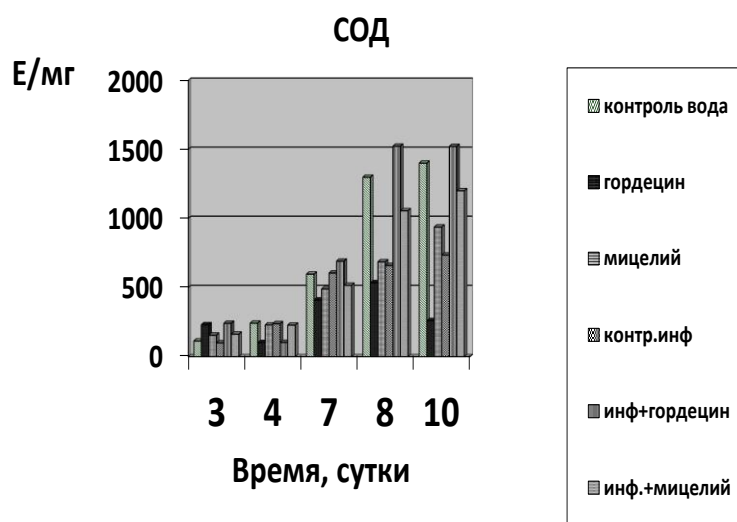


Рис.22. Изменение активности супероксиддисмутазы здоровых и больных проростков гороха под влиянием гордецина и вытяжки из плесени ячменя. (n=3; $P \leq 0,05$)

На рис.22. показано, что активность супероксиддисмутазы в процессе развития здоровых проростков гороха с 3-х до 10-ти суток возрастает от 113 Е/мг до 1400 Е/мг. При обработке семян гороха гордецином в концентрации $10^{-10}\%$ активность СОД остается низкой на протяжении всего времени наблюдения (230-260 Е/мг), что указывает на возрастание свободнорадикальных процессов, с которыми борется СОД. Обработка семян гороха смывами плесени ячменя в меньшей степени угнетает проростки гороха, чем гордецин, активность СОД в процессе развития равна 155-938 Е/мг. Заражение семян гороха путем замачивания в культуральной жидкости гриба *Fusarium oxysporum* приводит к снижению активности СОД от 99 до 734 Е/мг в процессе развития больных

растений. Инфицированные проростки гороха, обработанные гордецином, восстанавливают свою антиоксидантную систему, что выражается в резком увеличении активности СОД от 241 Е/мг у 3-дневных проростков до 1521 Е/мг – у 10-дневных. Вытяжка из плесени оказала меньший эффект, хотя и в этом случае активность СОД выше, чем у инфицированных проростков (162-1200 Е/мг).

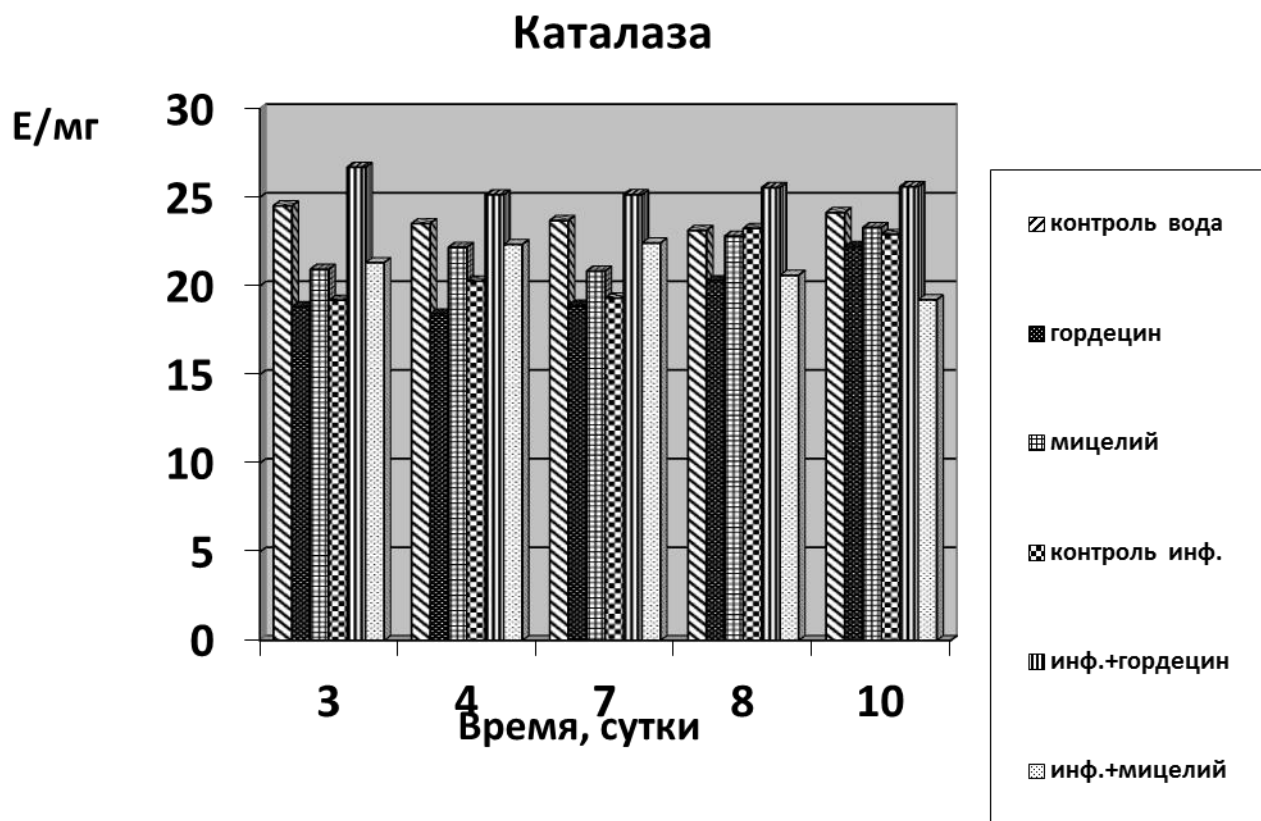


Рис.23. Изменение активности каталазы здоровых и больных проростков гороха под влиянием гордецина и вытяжки из плесени ячменя. (n=3; P ≤0,05).

В систему тканевых биоантиокислителей, обеспечивающих разложение перекисей, образующихся как в результате патологических процессов, так и при деятельности СОД, входит каталаза, строго специфичная по отношению к перекисям. На рис.23. показано ее довольно стабильное значение во всех вариантах опыта. Активность выражается в близких значениях около 20-25

Е/мг. Однако закономерность остается такой же, как в случае с СОД. Гордецин на инфицированные проростки гороха оказывает восстанавливающее действие. Активность каталазы в опыте, по сравнению с контролем, выросла на 2 единицы и превосходит даже здоровые проростки. Вытяжки из плесени ячменя были слабее, но присутствие антибиотиков в среде также оказало положительное влияние на больные проростки до 7 дней прорастания. В более поздние сроки их действие ослабевает.

На рис.24. показаны результаты активности третьего фермента высокомолекулярных компонентов антиокислительной системы клеток гороха – пероксидазы, которая использует перекись как окислитель множества соединений фенольной природы. Кривые активности пероксидазы гороха в процессе его развития повторяют таковые по супероксиддисмутазе (рис.22). Наблюдается та же закономерность. От 3-х до 10-ти дней прорастания семян гороха активность пероксидазы здоровых проростков возрастает от 206 до 1280 Е/мг.

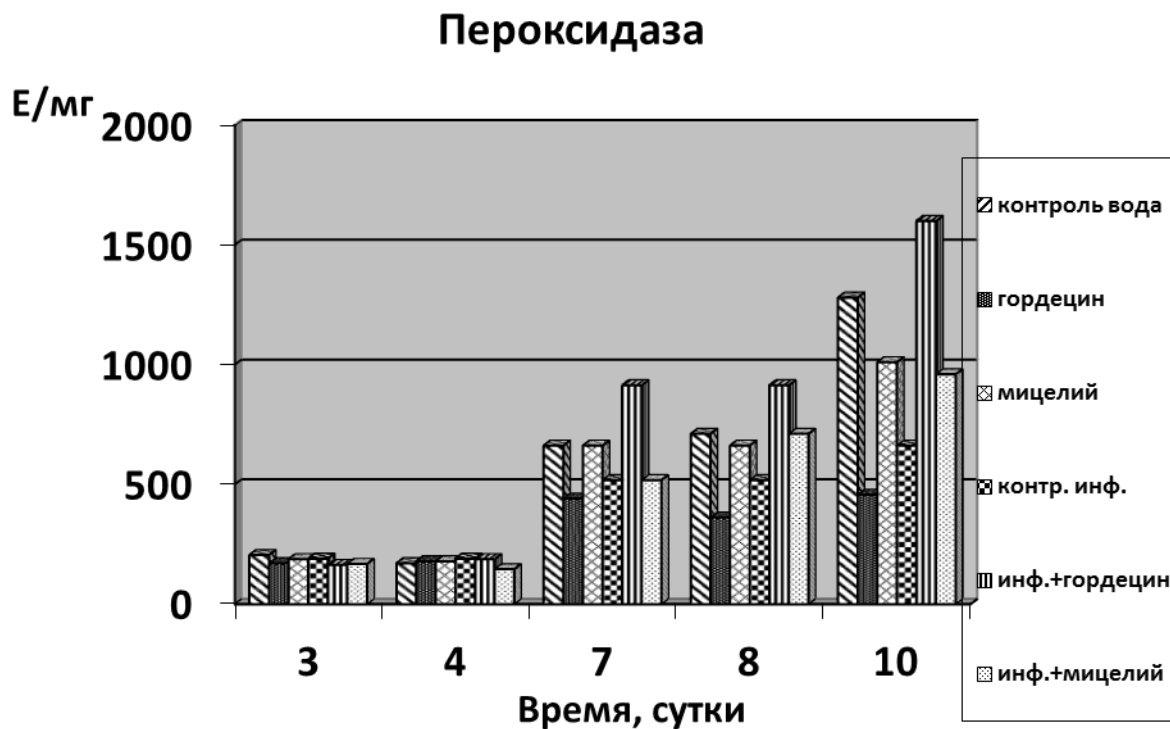


Рис.24. Изменение активности пероксидазы здоровых и больных проростков гороха под влиянием гордецина и вытяжки из плесени ячменя (n=3; P ≤0,05).

Гордецин оказывает сильное угнетающее действие на здоровые проростки. Действие вытяжки из плесени такого угнетения не оказывает. Однако гордецин у инфицированных проростков гороха вызывает резкое повышение активности пероксидазы, превышающее даже контрольный вариант. Это указывает на выраженную избирательность действия гордецина на возбудителя заболевания гороха. Вытяжка из плесени такого эффекта не вызывает.

Гриб *Fusarium oxysporum* проникает в растение гороха через корневую систему и по этой причине угнетает рост корней, что отражено на рис.4. Уже с первых суток после инфицирования длина корня меньше, чем у здоровых проростков. Но еще сильнее угнетает рост корней гордецин на протяжении всего времени наблюдения. Вытяжка из плесени ячменя оказала не меньшее угнетение, чем инфицирование возбудителем корневых гнилей, что указывает на ее патологическое влияние на проростки гороха. Обработка гордецином инфицированных *Fusarium oxysporum* проростков приводит не только к восстановлению ростовой активности корней, но и к их стимулированию.

5. Заключение.

Резюмируя полученные данные, можно констатировать, что скрининг генетической коллекции ячменя показал: генотипы ячменя существенно различаются по содержанию гордецина (рис. 1). Разброс данных составляет 1 мг/% -12 мг/%.

Наименьшее содержание антибиотика было у сорта Белогорского, местного сорта из Армении и *Westendorf Tirol* (1 - 2 мг/%). Сорт Белогорский устойчив к полеганию и пыльной головне, но восприимчив к мучнистой росе и пятнистостям. Два других генотипа полегают при неблагоприятных условиях среды, поражаются всеми грибными заболеваниями.

Рекордсменами по наличию гордецина являются сорта ячменя Сигнал *nutans* и Амулет, у которых количество гордецина достигает 11-12 мг/%. Сигнал средне полегаемый и поражается всеми грибными заболеваниями, а Амулет устойчив к полеганию, к мучнистой росе, слабо поражается пятнистостями.

У большинства генотипов содержание гордецина колеблется от 4 до 9 мг/%. Из них среднеустойчивыми к полеганию являются сорта Белогорский, Золотник, Белорусский 76, Московский 121. Белорусский 76 устойчив к мучнистой росе. Таким образом, четкой зависимости между содержанием гордецина, полеганием и устойчивостью к грибным заболеваниям у всех образцов не выявлено.

По данным Е.В.Костромичевой (2013), установлена положительная взаимосвязь содержания гордецина с устойчивостью ячменя к мучнистой росе и слабая взаимосвязь с устойчивостью к гельминтоспориозу и ржавчине. Это дает возможность отбора соответствующих по данным признакам образцов для включения их в селекционную программу создания устойчивых к заболеваниям новых сортов ячменя.

Анализ наличия антибиотиков в плесени показал (таблица 6) присутствие в незначительных количествах антибиотиков: пенициллина, стрептомицина, тетрациклина и грамицидина. Содержание пенициллина в образцах от 0,02 до

0,06 мг, стрептомицина от 0,0062 до 0,0071, тетрациклина от 0,0 до 0,0079 и грамицидина от 0,0 до 0,048 мг. Рекордсменом по накоплению антибиотиков пенициллина, стрептомицина и тетрациклина является образец 6557 Армения и по грамицидину 27080 Белорусский 76 и 30943 Амулет Чехия. Анализ связи между содержанием антибиотиков и устойчивостью к заболеваниям выявил следующее: образец 6557 Армения, несмотря на самое высокое содержание антибиотиков плесени, не устойчив ни к грибным болезням, ни к полеганию.

Можно предполагать, что подобная устойчивость может определяться наличием антибиотика грамицидина. Однако, по данным Гаузе Т.Ф. и Бражниковой М.Г. (7), грамицидин продуцирует не плесень, а бактерии рода *Bacillus brevis*. Из таблицы следует, что масса плесени у данных образцов невелика (1-3 мг/мл). Из всех изученных образцов только эти два генотипа не поражаются мучнистой росой и устойчивы к полеганию. Все остальные образцы поражаются мучнистой росой и полегают при неблагоприятных условиях. Однако на эти признаки не влияет принадлежность ячменя к голозерным или пленчатым.

Общее количество микроорганизмов (КОЕ/г) установлено по образцам ячменя в порядке убывания: 6557 Армения ($3,6 \times 10^5$) > К-270080 Белорусский 76 ($1,7 \times 10^5$) > К-30943 *Amulet* ($6,0 \times 10^4$) > 14891 Дагестан ($5,0 \times 10^4$). Из этих данных нельзя сделать вывод, что общее количество микроорганизмов связано с устойчивостью либо к полеганию, либо с устойчивостью к болезням.

Из общего количества выявленных микроорганизмов на *Bacillus*, КОЕ/г приходится по образцам ячменя в порядке убывания: 14891 Дагестан ($4,0 \times 10^2$) (0,8%) > К-30943 *Amulet* ($2,0 \times 10^2$) (0,33%) > 6557 Армения ($9,0 \times 10^2$) (0,25%) > К-270080 Белорусский 76 ($2,0 \times 10^2$) (0,12%). Кроме того, из образца 14891 Дагестан выделены *Bac. Subtilis* и 3 штамма *Bac. brevis*, а из образца К-30943 *Amulet* выделены *Bac. Subtilis* и 1 штамм *Bac. Brevis*. Если соотнести эти данные с устойчивостью, то можно наблюдать, что при наличии максимально выявленных штаммов (3 штамма *Bac. Brevis*) у образца Дагестан, устойчивостью к полеганию и болезням он не отличается. Амулет, у которого

всего по одному штамму *Bac. Subtilis* и 1 штамм *Bac. Brevis*, напротив, устойчив ко всем видам болезней: к мучнистой росе, слабо поражается пятнистостями и устойчив к полеганию. Возможно, это связано с активностью штамма, продуцирующего грамицидин или другой антибиотик. Следует провести дополнительные исследования по выявлению активных штаммов *Bac. Subtilis* и *Bac. Brevis* и влиянию данных микроорганизмов на устойчивость к определенным возбудителям.

6. Выводы

1. Проведен скрининг генотипов ячменя на содержание антибиотических веществ. Разброс данных составляет 1 мг/% - 12 мг/%. Наибольшее количество гордецина определено у генотипов Сигнал и Амулет (11-12 мг/%). Выделены генотипы к-27080 Белорусский 76 *nudum* и к-30943 *Amulet nutans* Чехия устойчивые к полеганию и мучнистой росе, слабо поражаются пятнистостями с высоким содержанием гордецина и грамицидина.
2. Четкая зависимость между содержанием гордецина, полеганием и устойчивостью к грибным заболеваниям выявлена не у всех образцов. Это дает возможность отбора соответствующих по данным признакам образцов для включения их в селекционную программу создания устойчивых сортов.
3. Разработана оригинальная методика выделения гордецина из малых проб зерна ячменя и ВЭЖХ для очистки гордецина.
4. Установлено, что развитие плесени на корнях различных генотипов ячменя обратно пропорционально содержанию гордецина в зерновках и строго повторяется по образцам, ясно прослеживается обратная зависимость роста плесени на корнях ячменя и содержания гордецина в ячмене. Это дает основание полагать, что гордецин сдерживает заражение ячменя микроорганизмами.
5. Установлено наличие на зерне ячменя группы микроорганизмов: актиномицета *Streptomyces* и бактерий *Bac. Subtilis*, *Bac. Brevis*, *Klebsiela pneumoniae*.
6. В плесени на корнях ячменя выявлены антибиотики: пенициллин от 0,02 до 0,06 мг, стрептомицин от 0,0062 до 0,0071, тетрациклин от 0,0 до 0,0079 и грамицидин от 0,0 до 0,048 мг в зависимости от образца. Рекордсменом по накоплению антибиотиков пенициллина, стрептомицина и тетрациклина является образец 6557 Армения и по грамицидину 27080 Белорусский 76 и 30943 Амулет Чехия.

7. Изучено влияние гордецина на рост, развитие и активность антиоксидантных ферментов гороха. Гордецин в нанодозах (10^{-12} М) угнетает развитие здоровых побегов гороха, увеличивает образование свободных радикалов в клетках, что выражается в снижении активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы.
8. У инфицированных проростков гороха гордецин оказывает избирательное действие на гриб *Fusarium oxysporum*, угнетая его развитие и оказывая выздоравливающее влияние на инфицированные проростки гороха, усиливая ростовую активность корней и повышая активность антиоксидантных ферментов.
9. Гордецин следует отнести к антимикробным препаратам направленного действия и к средствам защиты растений биологической природы от возбудителя корневых гнилей и увядания.

7. Список литературных источников.

- 1 Аверьянов, А.А. Активные формы кислорода и иммунитет растений / А.А. Аверьянов // Успехи современной биологии. - 1991. - Т. 3. - С. 722-737.
- 2 Акимова, Г.П. Изменение активности и каталитических свойств пероксидазы корней гороха на начальных этапах инфицирования *Rhizobium leguminosarum* / Г.П. Акимова, М.Г. Соколова // Агрохимия. - 2004. - № 1. - С. 86-90.
- 3 Андреева, В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева. - М.: Наука, 1988. – С. 128.
- 4 Артамонов, В.И. Биотехнология - агропромышленному комплексу / В.И. Артамонов. - М.: Наука, 1989 – С. 160.
- 5 Бартон, Д.Г. Новые пути синтеза тетрациклина / Д.Г. Бартон // «Журнал Всес. химического общества им. Д.И. Менделеева». - 1971. - Т. 16. - № 2.
- 6 Белозерская, Т.А. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах / Т.А. Белозерская, Н.Н. Гесслер // Прикладная биохимия и микробиология. - 2007. - Т. 43. - № 5. - С. 565-575.
- 7 Бобков, А.А. Влияние агрофона на углеводно-амилазный комплекс пивоваренного ячменя: дис. ... кандидата технических наук / А.А. Бобков. - Москва, 2008. - С. 134.
- 8 Булгаков, Н.И. Биохимия солода и пива / Н.И. Булгаков. - М.: Пищевая промышленность, 1976, С. 42 - 48.
- 9 Булгаков, Н.И. Биохимия солода и пива / Н.И. Булгаков. - М.: Пищевая промышленность, 1976, С. 48 - 49.
- 10 Ваксман, З.А. Антибиотики / З.А.Ваксман // К 80-летию С.А.Ваксмана. - 1968. - Т. 13. - №7.
- 11 Гаузе, Г.Ф. Изыскание новых антибиотиков из группы циклоспоринов / Г.Ф. Гаузе, Л.Н. Терехова, Т.С. Максимова // Антибиотики. - 1983. - Т. 28. - №4. - С. 243-245.

- 12 Готов, В.К. Опыт применения биопрепаратов в животноводстве / В.К. Готов, Л.С. Кравцова // Международный сельскохозяйственный журнал. - 2007. - №2. - С. 54-55.
- 13 Глуховцев, В.В. Особенности формирования белка и его аминокислотного состава в зерне ярового ячменя в зависимости от погодных условий в среднем Поволжье / В.В. Глуховцев, Н.В. Дровальева // Вестник Казанского ГАУ. - 2011. - №2. – С. 20.
- 14 ГОСТ 12038-84. Группа С09. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственный культур. Методы определения всхожести. Agricultural seeds. Methods for determination of germination.
- 15 Граскова, И.А. Peroксидаза как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили / И.А. Граскова, Г.Б. Боровский // Физиология растений. - 2004. – Т. 51. - № 5. - С. 692-697.
- 16 Гринблат, А.И. Разработка биоинформационной модели апоптоза и некроза у растений: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. с.-х. наук / А.И. Зданович. - Орел, 2007 - С. 21.
- 17 Гринблат, А.И. / А.И. Гринблат, А.Ю. Гагарина, И.Н. Гагарина, И.В.Горькова, К.Н. Козьявина. - Орел: ОрелГАУ, 2012. - С. 100.
- 18 Деви, С.Р. Антиокислительная активность растений Brassica juncea, подвергнутых действию высоких концентраций меди / С.Р. Деви, М.Н. Прасад // Физиология растений. – 2005. - Т. 52. - №2. – С. 233-237.
- 19 Дмитриев, А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс / А.П. Дмитриев // Физиология растений. – 2003. - Т. 50. - С. 465-474.
- 20 Добрынина, В.И. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / В.И. Добрынина, Е.Я.Свешникова. - М.: Медицина, 1967. – С. 307-316.
- 21 Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. - М.: Высшая Школа. - 1969. – С. 479.

- 22 Зданович, Ю. И. Влияние термического обеззараживания на комплекс микроорганизмов и качественные показатели зерна ячменя пивоваренного: автореф. дис. канд. с.-х. наук / Ю.И. Зданович. - Красноярск, 2006.
- 23 Зотиков, В.И. Агрономия: учебники и учебные пособия для агрономических вузов / В.И. Зотиков, Г.А. Борзенкова. - Орел, 2009.
- 24 Калунянц, К.А. Химия солода и пива / К.А. Калунянц. - М.: Агропромиздат, 1990. – С. 9-18.
- 25 Каширская, Н.Я. Биологизация защиты яблони от парши и яблонной плодовой гнили / Н.Я. Каширская, А.М. Каширская // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2010. - №2. – С. 68-70.
- 26 Костромичева, Е.В. Выделение гордецина из зерна ячменя и исследование его биологического действия и взаимосвязи с морфофизиологическими признаками: автореф. дис. канд. биол. наук / Е.В. Костромичева. - Воронеж, 2013. – С. 27.
- 27 Красильников, Н. А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А. Красильников - М., 1958, - С. 464.
- 28 Кузнецова, Т. Е. Селекция ячменя на устойчивость к болезням в условиях Северного Кавказа: дис. ... д-ра с.-х. наук / Т. Е. Кузнецова. - Краснодар, 2006. - С. 401.
- 29 Кунце, В. Технология солода и пива / В. Кунце. – СПб: Изд-во «Профессия», 2008. - С. 1032.
- 30 Курганова, Л.Н. Продукты перекисного окисления липидов как возможные посредники между воздействием повышенной температуры и развитием стресс-реакции у растений / Л.Н. Курганова, В.П. Веселов // Физиология растений. – 1999. - Т. 46. – С. 218-222.
- 31 Логинов, О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии / О.Н. Логинов. - М.: Наука, 2005. - С. 373-385.

- 32 Логинов, О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии / О.Н. Логинов. - М.: Наука, 2005. – С. 166.
- 33 Лоскутов, И.Г. История мировой коллекции генетических ресурсов растений в России / И.Г. Лоскутов. – СПб.: ГНЦ РФ ВИР, 2009. – С. 293.
- 34 Лоскутов, И.Г. Источники хозяйственно ценных признаков для селекции ячменя / И.Г. Лоскутов, О.Н. Ковалева // Материалы конференции «Современные принципы и методы селекции ячменя»: [сборник]. Краснодар, 2007. - С. 129-133.
- 35 Лукьянова, М.В. Ячмень / М.В. Лукьянова, А.Я. Трофимовская, Г.Н. Гудкова и др. // Культурная флора СССР. - Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1990. - Т. 2. - Ч. 2. - С. 267-294.
- 36 Макарова, Н.А. Пшеница (Иммунологическая характеристика редких видов). Каталог мировой коллекции ВИР / Н.А. Макарова, Т.В.Лебедева, Е.Е. Радченко. - СПб., 1993. - Вып. 640. – С. 59.
- 37 Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) / И.В. Максимов, Р.Р. Абизгильдина, Л.И. Пусенкова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. - №4. – С. 373-385.
- 38 Максимов, И.В. Изучение факторов устойчивости пшеницы и эгилопса к септориозу: автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук / И.В. Максимов. - СПб., 1994. – С. 18.
- 39 Машкина, Е.В. Реакция хлорофильных мутантов подсолнечника на действие повышенной температуры и окислительного стресса / Е.В. Машкина, А.В. Усатов, В.А. Даниленко, Н.С. Колоколова, Е.П. Гуськов // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. - № 2. – С. 227-234.
- 40 Метелица, Д.И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах (обзор) / Д.И.Метелица, Е.И.Карасёва // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43. - № 5. – С. 537-564.

- 41 Навашин, С.М. Справочник по антибиотикам / С.М. Навашин, И.П. Фомина. - 3 изд., М., 1974.
- 42 Нетрусов, А.И. Значение симбиозов с участием микроорганизмов в питании растительоядных животных / А.И. Нетрусов // Экология микроорганизмов. - М.: Издательский центр «Академия», 2004. – С. 117-125.
- 43 Николаева, О.Н. Эффективность применения фитопробиотиков и полисоли микроэлементов для профилактики желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных / О.Н. Николаева, М.Л. Мюристая, А.В. Андреева // Успехи современного естествознания. – 2007. - №12. – С. 227-228.
- 44 Новотельнов, Н.В. Фитонциды, их роль в природе / Н.В. Новотельнов. - Л., 1967. - С.119.
- 45 Новотельнов, Н.В. К вопросу о химической природе антибиотика гордецина / Н.В. Тельнов, И.С. Ежов // Фитонциды. – Киев, 1967. – С. 146-149.
- 46 Одинцова, И.Г. Мягкая пшеница. Характеристика устойчивости к бурой, стеблевой ржавчинам и мучнистой росе / И.Г. Одинцова, Н.А. Макарова Т.В. Лебедева // Каталог мировой коллекции ВИР. Вып.544. Л: ВИР, - 1990. Л. – С. 21.
- 47 Озерецковская, О.Л. Индуцирование устойчивости растений / О.Л. Озерецковская // Аграрная Россия. - 1999. - № 1. - С.4-9.
- 48 Озерецковская, О.Л. Индуцирование устойчивости растений к вирусам биогенными элиситорами фитопатогенов (обзор) / О.Л. Озерецковская // Прикл.биохим.микробиол. - 1994. - Т. 30. - С. 325-339.
- 49 Олива, Т.В. Биотехнологические альтернативы в сельском хозяйстве / Т.В. Олива, Г.В. Шевченко, О.М. Исаева // Успехи современного естествознания. – 2007. – Т. 12. – С. 42-43.
- 50 Осипова, Н.И. Ветеринарно-санитарная оценка продуктов животного происхождения, содержащих антибиотики / Н.И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2010. - №3. – С. 503.

- 51 Павловская, Н.Е. Антиоксидантная система у пшеницы и гороха в норме и патологии (при апоптозе, некрозе, диагностике) / Н.Е. Павловская, А.И. Гринблат, А.Ю. Гагарина, И.Н. Гагарина, И.В. Горькова, К.Н. Казявина // (Под общей редакцией Павловской Н.Е.). - Орел: ОрелГАУ, 2012. – С. 107.
- 52 Павловская, Н.Е. Методические рекомендации по оценке устойчивости генотипов гороха к возбудителям фузариоза и аскохитоза с помощью биохимических тестов / Н.Е. Павловская, О.А. Шалимова, Е.Ф. Азарова, Р.М. Андрюхина. - Орел, 2002. – С. 21.
- 53 Патент на изобретение №2293969Б - 20.02.2007. Способ определения активности фермента / А.И. Гринблат. – Оpubл. 20.02.2007, Бюл. №5.
- 54 Плешков, Б.П. Биохимия: учебники и учебные пособия сельскохозяйственных растений / Б.П. Плешков // Биохимия с/х растений. – 1985.
- 55 Полесская, О.Г. Влияние солевого стресса на антиоксидантную систему растений в зависимости от условий азотного питания / О.Г. Полесская, Е.И. Каширина, Н.Д. Алехина // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. - № 2. - С. 207-214.
- 56 Прист, Ф.Дж. Микробиология пива / Ф.Дж. Прист, Й.Кэмпбелл: пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2005. – С. 368.
- 57 Рубин, Б.А. Биохимия и физиология иммунитета растений / Б.А.Рубин, Е.В.Арциховская. - 3-е изд., М., 1981.
- 58 Самади, Л. В. Обнаружение апоптозных телец в обработанных никелем клетках кончика корня *Allium* сера / Л. Самади, Б.С. Бейбуди // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. - № 1. – С. 151-153.
- 59 Смирнов, В.В. Спорообразующие аэробные бактерии-продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская. - Киев: Наукова Думка, 1982. – С, 282.
- 60 Солдатенков, А.Т. Пестициды и регуляторы роста / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина // Прикладная органическая химия. - М.: БИНОМ, 2010. – С. 223.

- 61 Стейниер, Р. В 3 томах / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. - М.: Мир, 1979. - Т.1. – С. 320.
- 62 Стейниер, Р. В 3 томах / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. - М.: Мир, 1979. - Т.2. - С. 334.
- 63 Стейниер, Р. В 3 томах / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. - М.: Мир, 1979. - Т.3. – С. 486.
- 64 Тарчевский, И.А. Элиситор - ндуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие / И.А. Тарчевский // Физиология растений. - 2000. – Т. 47. - №2. - С.321-328.
- 65 Трофимовская, А.Я. Характеристика устойчивости ячменя к пыльной головне, мучнистой росе и карликовой ржавчине / А.Я. Трофимовская, В.И. Кривченко, С.И. Трайнина // Каталог. ВАСХНИЛ. Ленинград. - 1972. – Вып. 97. – С. 43.
- 66 Тырышкин, Л. Г. Генетическое разнообразие пшеницы и ячменя по эффективной устойчивости к болезням и возможности его расширения: автореф. дис. на соиск. уч. степ. доктора биол. наук / Л.Г. Тырышкин. – СПб., 2007. – С. 258.
- 67 Угарова, Н.Н. Применение пероксидаз для селективного окисления органических соединений / Н.Н. Угарова, О.В.Лебедева // Биохимия. – 1978. – С. 68.
- 68 Уманский, С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы / С.Р. Уманский // Молекулярная биология. – 1996. – Т. 30. – Вып. 3. - С.487-502.
- 69 Федоров, А.А. Бактерии и актиномицеты / А.А. Федоров // Жизнь растений. - М.: Просвещение. - 1974. – Т. 1. - С. 433-437.
- 70 Хочачка, П. Стратегия биохимической адаптации / П.Хочачка, Дж. Семеро. - М.: Мир, 1977.
- 71 Чернух, А. М. Антибиотики группы тетрациклинов / А.М. Чернух, Г.Я. Кивман. - М., 1962.

- 72 Чесноков, Ю.В. Устойчивость растений к патогенам (обзор иностранной литературы) / Ю.В. Чесноков // Сельскохозяйственная биология. – 2007. - №1. – С. 16-35.
- 73 Чжан, Х. Влияние обработки листьев пшеницы донором окиси азота на антиокислительный метаболизм при стрессе, вызванном алюминием / Х. Чжан, Я.Х. Ли, Л.Ю. Ху, С.Х. Ван, Ф.К. Чжан, К.Д. Ху // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. - №4. – С. 523-528.
- 74 Шорнинг, Б. Ю. Действие антиоксидантов на рост и развитие растений / Б. Ю. Шорнинг // Известия РАН, Серия биол. – 1999. – № 1. – С. 30.
- 75 Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / под ред. В.С. Шевелухи. – 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. – С. 4.
- 76 Юсупова, З.Р. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk / З.Р. Юсупова, Р.М.Хайрулин, И.В.Максимов// Физиология Растений. – 2006. – Т. 53. - № 6. - С. 910-917.
- 77 Ярилин, А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // Иммунология. – 1996. – Т. 6. – С. 10-23.
- 78 Able, A.J. Role of Reactive Oxygen Species in the Response of barley to Pathogens / A. J. Able // Protoplasm. – 2003. – V. 221. – P. 137-143.
- 79 American Journal of Physical Anthropology [electronic resource] www.gazeta.ru/science. Date of reference 11 august 2013 г.
- 80 Apostol I. Heinsle P.F. Low, 1994. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells / I. Apostol, P.F. Heinsle // Plant Physiol. – 1989. – V.90. – P.109-111.
- 81 Arora Y.K., Wagle D.S. Interrelation between Peroxidase, Polyfenoloxidase Activities and Phenolic Content of Wheat Resistance to Loose Smut / Y.K. Arora, D.S. Wagle // Biochem, Physiol, Pflanz. – 1985. – P.75-80.
- 82 Baker B. Zipnbryski P., Staskawiez B., Dinesh- Kymar S.P. Signaling in Plant-Microbe Interactions / B. Baker, P. Zipnbryski , B. Staskawiez, S.P. Dinesh- Kymar // Science. – 1997. – V.276. – P.726-733.

- 83 Baker C. I., Orlandi E.W. Active Oxygen in Plant genesis /C.E. Baker, E.W. Orlandi // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1995. – V.33. – P. 290-321.
- 84 Bocker A. Antibiotika- Einsatz in der Tierhaltung: Verbraucherschutz, öffentliche Gesundheit und das vorsorgeprinzip. / A. Bocker // *Perspektiven in der Landnutzung- Regionen, Landschaften, Betriebe - Entscheidungsträger und Instrumente.* - Munster- Hiltrup, – 2004. – Bd. 39. – S. 545-553.
- 85 Boller T. Perception and Transduction Elicitor Signals in Host- Pathogen Interactions / T. Boller // Eds Slusaren A. J., Frazer R.S.S., van Loon L. S. Dordrecht: – 2000. – P. 189-230.
- 86 Boudel A.M., Lapierre C., Grima – Pettenati J. Biochemistry and Molecular Biology of Lignification / A.M. Boudel, C. Lapierre, J. Grima – Pettenati // *NenPhyt.* – 1995. – V. 129. – P. 203-236.
- 87 Bowyer P., Clarke B.R., Lunness P. E. Host-range of a plant- pathogenic fungus by a saponin detoxifying enzyme / P. Bowyer, B.R. Clarke, P.E. Lunness // *Science*, – 1995, – V. 267. – P. 371-374.
- 88 Candella et all. – 1994
- 89 Chester K. The problem of acquired physiological immunity in plants / K. Chester // *Quarterly review of Biology.* – 1933, – V. 8. – P. 275-324.
- 90 Clarke J.H. Hill S.T. *Transactions of the British Mycological Society* // *Mycological Society*, – 1981, – V. 77, – P. 557.
- 91 Coffey M.D., Cassidy D.S. Peroxidase Activity and Induced Lignification in Rusted Flax Interactions Varying in Their Degree of Incompatibility / M.D. Coffey, D.S. Cassidy // *Can. J. Bot.* – 1984. – V. 62. – P. 134-141.
- 92 Cornelissen B.J., Scharm A. Transgenic Approaches to control epidemic spread of diseases. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* /Eds. A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, L.C. Van Loon. Dordrecht, 2000: 575-599.

- 93 Dat J., Vandenabeele S., Vranjva E., van Montagu M., Inze D., van Breusegem F. Dual Action of the Active Oxygen Species during Plant Stress Responses / J. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranjva, M. van Montagu, D. Inze, F. van Breusegem // *Cell Mol. Life Sci.* – 2000. – V. 57. – P. 779-795.
- 94 Enari T-M, Makinen V. *Panimotteknikka* / T-M Enari, V. Makinen // *Oy Panimolaboratorio, Espoo.* – 1993. – S. 222.
- 95 Finland M. Twenty-fifth Anniversary of the Discovery of Aureomycin: The Place of the Tetracyclines in Antimicrobial Therapy/ M. Finland // «*Clinical Pharmacology and Therapeutics*», – 1974, v.15, №1
- 96 Flannigan B., Okagbue R.N., Khalid R., Teoh C.K. (1982) *Brevigand Distilling International*, 12,3134, and 37.
- 97 Flannigan B., *Transactions of British Mycological Society* / B. Flannigan // *Mycological Society.* -1969. - V. 53, - P. 371
- 98 Geetha H. M., Shetty H.S. Expression of Oxidative Burst in Cultured Cells of Pearl Millet Cultivars against *Sclerotinia graminicola* Inoculation and Elicitor Treatment / H.M. Geetha, H.S. Shetty // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163. – P. 653-660.
- 99 Giannopolities, C.N., 1977
- 100 Goodman R.N. // *Antibiotics Their chemistry and non-medical uses*, Princeton, New Jersey. - 1959. - P. 492
- 101 Harman G.E., 2007
- 102 Harris 1992
- 103 Hill R A., Lacey J. // *Annals of Applied Biology.* 1983. – V .102. -P. 455.
- 104 Hill R.A., Lacey J. // *Annals of Applied Biology.* 1983. – V.103. - P. 467.
- 105 Kolattukudy R. E., Rogers L. M., LiD. M., Hwang C. S., Fleishman M. A. Surface Signaling in Pathogenesis / R.E. Kolattukudy, L.M. Rogers, M. LiD, C.S. Hwang, M.A. Fleishman// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V.92. – P. 4080-4087

- 106 Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. H₂O₂ from the Oxidative resistance Response/A. Levine, R. Tenhaken, R. Dixon, C. Lamb // Cell. – 1994. – V. 79. – P. 583- 593.
- 107 Mansfield J.W. Antimicrobial compounds and resistance, the role of phytoalexins and phytoanticipins. In: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases /Eds. A.J. Slusarenko, R.S.S./ Fraser, L.C. Van Loon. Dordrecht, - 2000. - P. 325-370.
- 108 Medeghin B.P., Lorenzini G., baroni F. R., Nali C., Sgarbi E. Cytochemical Detection of Cell Wall Bound Peroxidase in Rust Infected Broad Bean Leaves / B.P. Medeghin, G. Lorenzini, F.R. Baroni, C. Nali, E. Sgarbi // J. Phytopathol. 1994, - V.140, - P. 319-325.
- 109 Mehdy M.C. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens / M.C. Mehdy // Plant Physiol. 1994. - V.105. - P. 467-472.
- 110 Miller J.D. / J.D Miller // Journal of Products Research, - 1995, - 31, - P. 1.
- 111 Miller R. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance / R. Miller // Trends Plant Sci. - 2002. - V. 7. - P. 405-409.
- 112 Miller R., Lam E., Shulaev V. E. Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco / R. Miller, E. Lam, V.E. Shulaev // Plant Mol. Biol., 1999, - V. 39. - P. 1025-1035.
- 113 Moreno-Loshuertos et al R. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants // Nature genetics - 38, 11, - P. 1261-1268. ; Joshua M. Baughman, Vamsi K. Mootha. 2006. Buffering mitochondrial DNA variation // Nature genetics 38, 11, - P. 1232-1233).

- 114 Noctor G., Foyer C.H. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control / G. Noctor, C.H. Foyer // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* - 1998. - V. 49. - P. 249-279.
- 115 Popay A.J. / A.J Popay // *Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis*. Boca Raton, FL.: CRC Press, - 2009. - P. 347-358.
- 116 Reimers P. J., Guo A., Leach J. E. Increase activity of cationic peroxidase connected with incompatible interaction bacteria *Xanthomonas oryzae* pv and *Oryza sativa* / P.J. Reimers, A. Guo, J.E. Leach // *Plant Physiol.* – 1992. - v. 99, №3. – P. 1044 -1050.
- 117 Ross A.F. Systemic acquired resistance induced by localized acquired resistance in plants / A.F. Ross // *Virology*, - 1961, - 14. – P. 340-358
- 118 Ross A.F. Localized acquired resistance to plant virus infections in hypersensitive plants / A.F. Ross // *Virology*, - 1961, - 14. – P. 329- 339
- 119 Rushton P.J., Somssich I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens *Curr. Opin* / P.J. Rushton, I. E. Somssich // *Plant Biol.*, - 1998, - 1. – P. 311-315.
- 120 Smirnoff N. Ascorbic Acid: Metabolism and Functions of a Multi-Faceted Molecule *Curr. Opin* / N. Smirnoff // *Plant Biol.* - 2000. - V. 3. - P. 229-235.
- 121 Thordal-Christensen H., Gregersen P.L., Collinge D.B. The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) graminis interaction: a case study. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* / Eds. A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, L.C. VanLoon. Dordrecht, 2000: 77-100;
- 122 Vanacker H., Harrison J., Rillisch J. / H. Vanacker, J. Harrison, J. Rillisch // *Antioxidant defences of the apoplast*. *Protoplasma*, - 1998, - 205. – P. 129-140.
- 123 Van E11en H.D., Sandrock R.W., Wasmann C.C. e.a. Detoxification of phytoalexins and phytoalexins by phytopathogenic fungi / H.D Van E 11 e n, R.W. Sandrock, C.C. Wasmann // *Can. J. Bot.*, - 1995, - 73. – P. 518-525.

- 124 Von Ropenack E., Parr A., Schulze- Lefert P. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad resistance the powdery mildew fungus in barley / E. Von Ropenack, A.Parr, P. Schulze-Lefert // J. Biol. Chem., - 1998, - 273. – P. 9013-9022.
- 125 Химический состав ячменя [электронный ресурс] <http://best-pivo.ru/him.html>. Дата обращения: 11 июля 2013 г.
- 126 Словари и энциклопедии на Академике [электронный ресурс] <http://dic.academic.ru/>. Дата обращения: 20 июля 2013 г.
- 127 Применение антибиотиков в растениеводстве [электронный ресурс] http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/1792/. Дата обращения: 30 июля 2013 г.
- 128 Биологическая энциклопедия /Взаимоотношения в мире микроорганизмов и образование бактериями и актиномицетами антибиотиков [электронный ресурс] <http://dic.academic.ru/>. Дата обращения: 8 августа 2013 г.
- 129 Яровой ячмень. Значение и история ярового ячменя [электронный ресурс] <http://miragro.com/yarovoi-yachmen-znachenie-i-istoriya-yarovogo-yachmenya.html>. Дата обращения: 10 августа 2013 г.
- 130 День Поля в Орловской области [электронный ресурс] <http://orel-region.ru/index.php?head=1&unit=2754>. Дата обращения: 12 августа 2013 г.
- 131 Википедия [электронный ресурс] <http://ru.wikipedia.org/wiki/>. Дата обращения: 13 августа 2013 г.
- 132 Солодоращение [электронный ресурс] <http://studies.com.ua/lectsii/lectsiya-solodorascheine.html>. Дата обращения: 15 августа 2013 г.
- 133 Ячмень [электронный ресурс] <http://www.kniish.ru/departaments/barley/>. Дата обращения: 18 августа 2013 г.

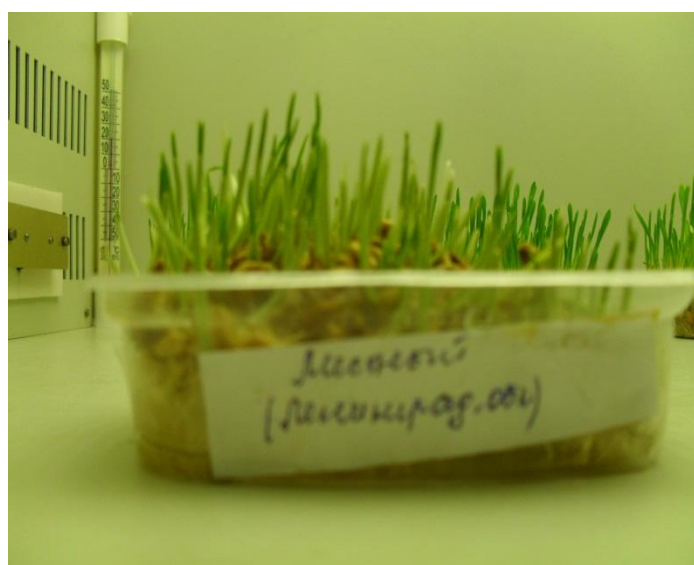
- 134 Фитоалексины - «инстинкт» самосохранения растений [электронный ресурс] <http://www.lepestok.kharkov.ua/bio/s20100901.htm>. Дата обращения: 20 августа 2013 г.
- 135 Антибиотики в животноводстве [электронный ресурс] http://www.nauka.kz/biol_med/razd4/antibiotiki_v_ginotnovodstve.php. Дата обращения: 21 августа 2013 г.
- 136 [электронный ресурс] <http://www.portal-slovo.ru>. Дата обращения: 22 августа 2013 г.
- 137 [электронный ресурс] http://www.recipe.ru/news/2/2828_1.shtml. Дата обращения: 24 августа 2013 г.
- 138 [электронный ресурс] <http://www.zikr.ru/interest/interest1.html>. Дата обращения: 25 августа 2013 г.
- 139 [электронный ресурс] www.medbiol.ru/medbiol/antioks/00003a03.html. Дата обращения: 27 августа 2013 г.
- 140 Антибиотики в животноводстве [электронный ресурс] www.vetstory.ru/antibiotiki-v-zhivotnovodstve. Дата обращения: 30 августа 2013 г.

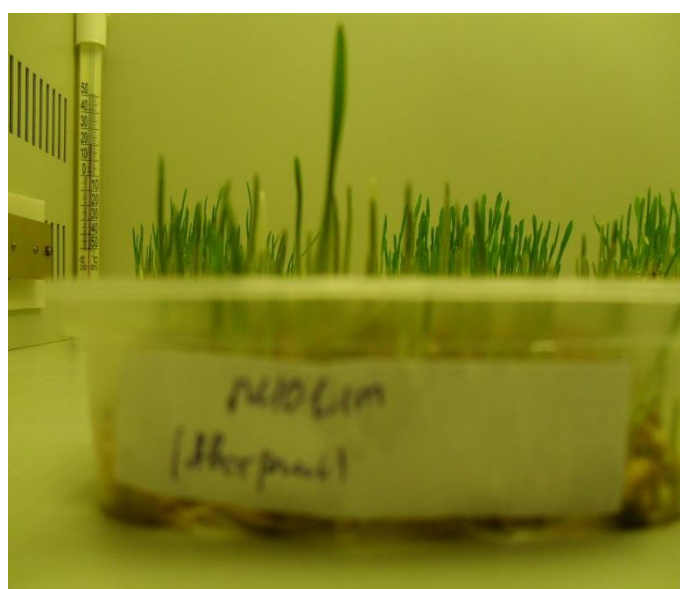
8. Приложение.

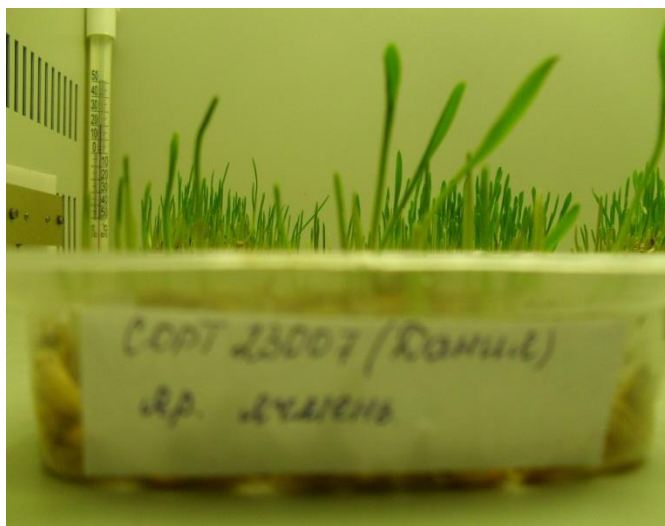
Приложение 1

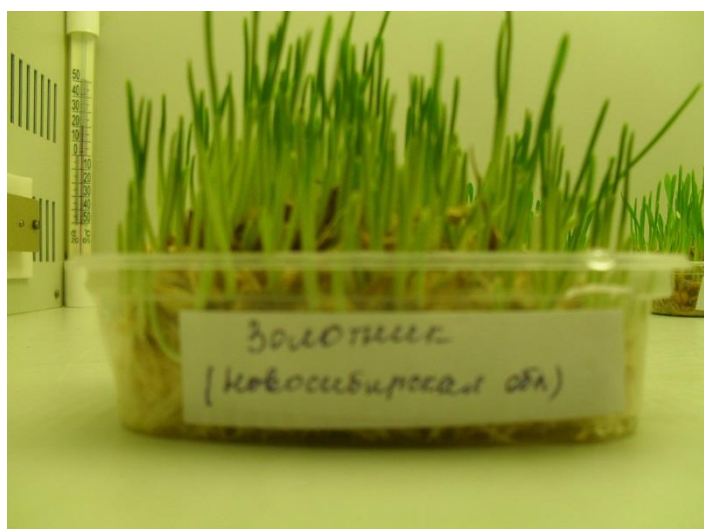
Фото генотипов ячменя.

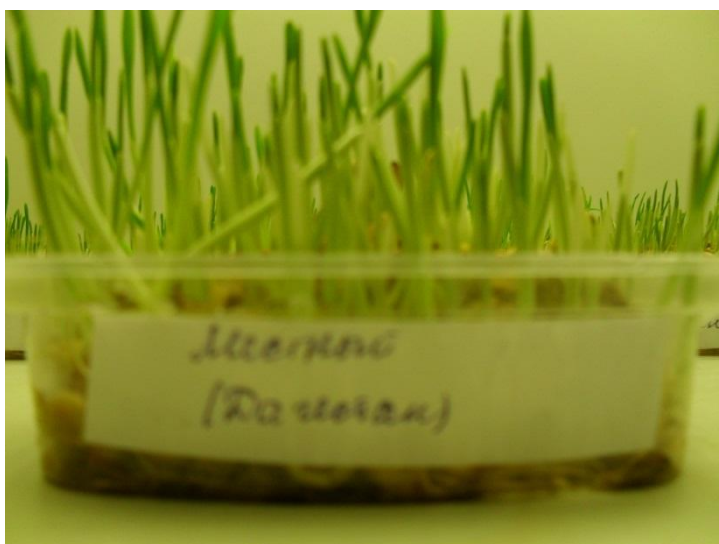
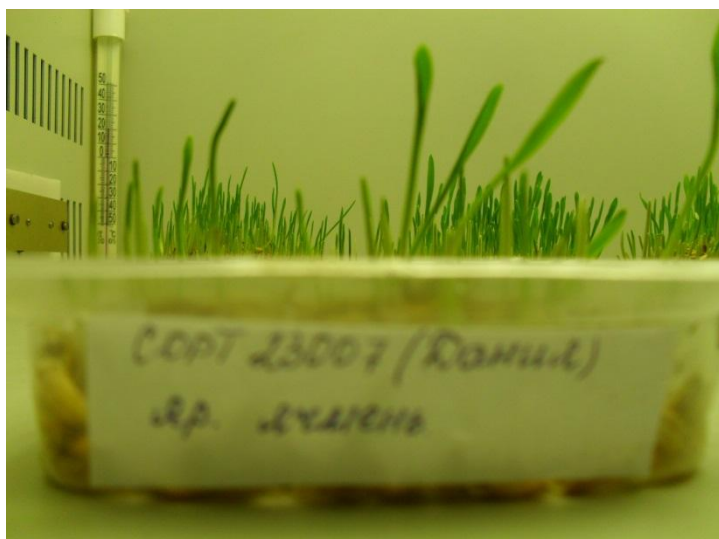












\

Синтез гордецина в проростках ячменя

Час	Местный Армения			Амулет		
	Е	С,%	мг/%	Е	С,%	мг/%
8	0,036	0,00065	0,65	0,393	0,00715	7,15
16	0,084	0,00153	1,53	0,508	0,00924	9,24
34	0,071	0,00129	1,29	0,416	0,007571	7,57
48	0,053	0,00095	1,00	0,393	0,007153	7,15
72	0,047	0,00085	0,85	0,323	0,005879	5,88
120	0,044	0,00080	0,80	0,289	0,00526	5,26

Влияние вытяжек из плесени на рост и развитие проростков гороха



Рис. Проростки гороха сорта Батрак, обработанные вытяжкой из плесени на 3-ий день прорастания



Рис. Проростки гороха сорта Батрак, обработанные вытяжкой из плесени на 5-ий день прорастания

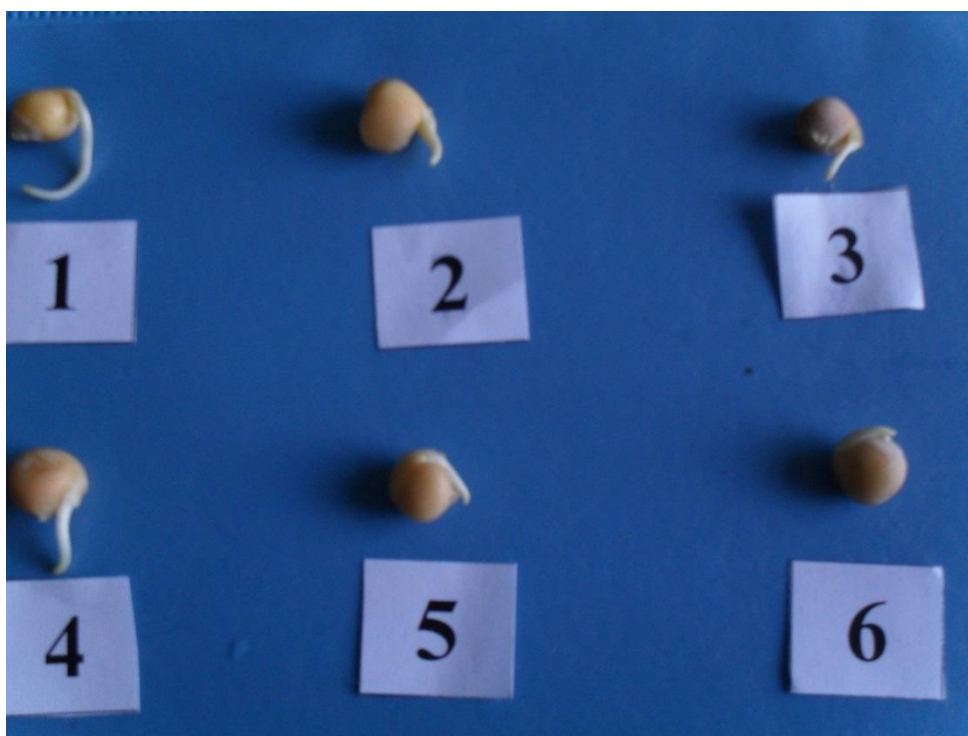


Рис. 3-и сутки



Рис. 4-ые сутки

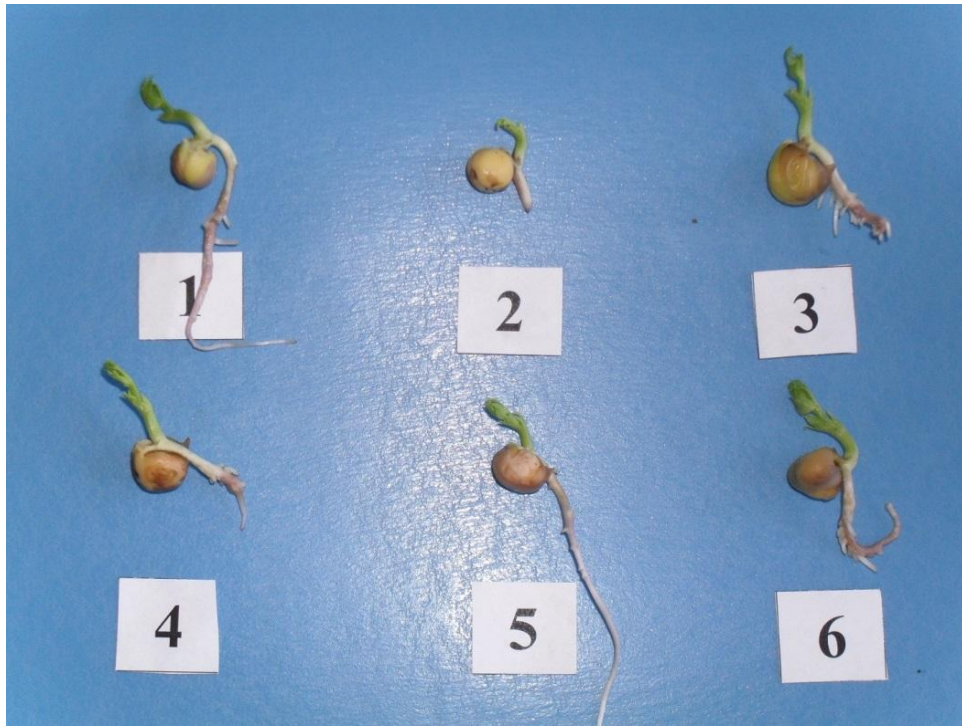


Рис. 7-ые сутки

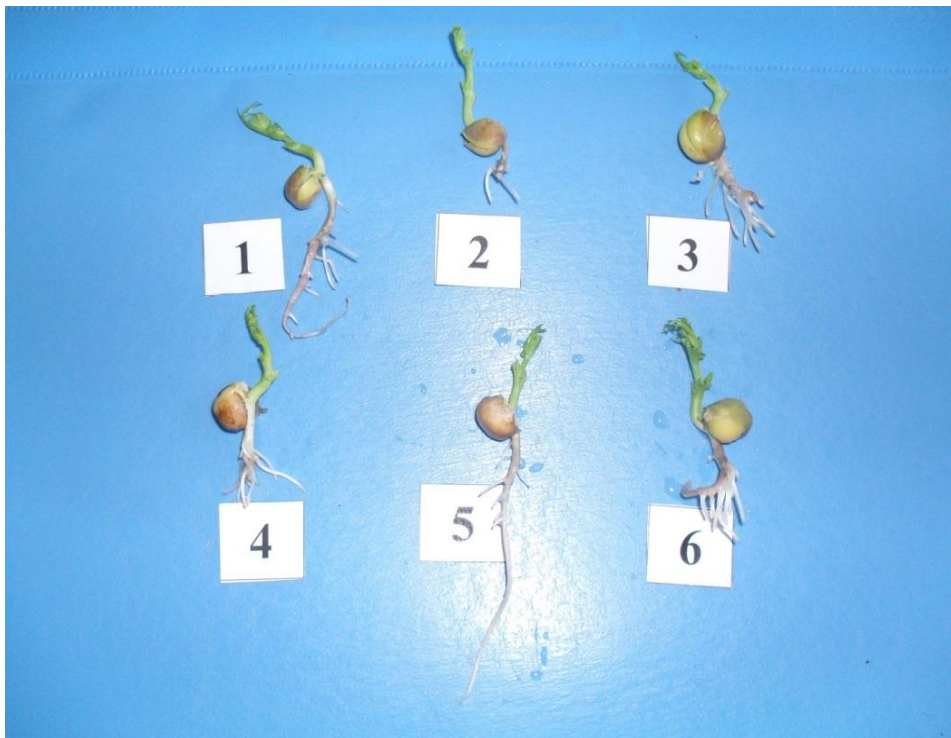


Рис. 8-ые сутки



Рис. 10-ые сутки

Приложение 4.

Влияние гордецина на СОД, пероксидазу, каталазу.

Активность СОД.

3-и сутки

№	Вариант	D _к	D ₁	D ₂	D ₃	Активнос ть СОД ₁	АктивностьС ОД ₂	Активнос ть СОД ₃
1	Контроль вода	0,42 4	0,23 2	0,23 2	0,23 2	113,20754 7	113,207547	113,20754 7
2	Обработк а гордецин ом 10 ⁻¹⁰	0,42 5	0,03 2	0,03 2	0,03 3	231,1764 71	231,176471	230,5882 35
3	Обработк а вытяжкой из мицелия 10 ⁻¹⁰	0,36 0	0,14 4	0,14 5	0,13 6	150	149,305556	155,55555 6
4	Контроль Вода с заражени ем	0,42 4	0,24 7	0,24 7	0,25 5	104,36320 8	104,363208	99,646226 4
5	Обработк а гордецин ом 10 ⁻¹⁰ с заражени	0,42 5	0,01 6	0,01 4	0,01 5	240,5882 35	241,764706	241,1764 71

	ем							
6	Обработка а вытяжкой из мицелии 10^{-10} с заражением	0,36 0	0,12 5	0,12 3	0,12 6	163,19444 4	164,583333	162,5

4-е сутки

№	Вариант	D _к	D ₁	D ₂	D ₃	Активность СОД ₁	Активность СОД ₂	Активность СОД ₃
1	Контроль вода	0,62 4	0,02 0	0,01 9	0,02 0	241,9871 79	242,387821	241,9871 79
2	Обработка а гордец ом 10^{-10}	0,39 6	0,23 6	0,23 5	0,23 5	101,01010 1	101,641414	101,64141 4
3	Обработка а вытяжкой из мицелии 10^{-10}	0,62 4	0,05 1	0,05 3	0,05 3	229,5673 08	228,766026	228,7660 26
4	Контроль Вода с заражением	0,62 4	0,02 9	0,03 2	0,02 9	238,3814 1	237,179487	238,3814 1

	ем							
5	Обработк а гордецин ом 10^{-10} с заражени ем	0,39 6	0,23 5	0,23 5	0,23 3	101,64141 4	101,641414	102,90404
6	Обработк а вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражени ем	0,62 4	0,05 1	0,05 4	0,05 4	229,5673 08	228,365385	228,3653 85

7-е сутки

№	Вариан т	D _к	D ₁	D ₂	D ₃	Активн ость СОД ₁	Активность СОД ₂	Активн ость СОД ₃
1	Контрол ь вода	0,9 28	1,2969 728	1,2951 168	1,2891 776	599,4	598,9	597,3
2	Обработ ка гордеци ном 10^{-10}	0,8 22	0,5375 88	0,5375 88	0,5267 376	413,5	413,5	410,2
3	Обработ	0,8	0,7864	0,7874	0,7874	489,2	489,5	489,5

	ка вытяжк ой из мицели ия 10^{-10}	22	896	76	76			
4	Контрол ь Вода с заражен ием	0,9 28	1,3196 16	1,3188 736	1,3188 736	605,5	605,3	605,3
5	Обработ ка гордеци ном 10^{-10} с заражен ием	0,9 28	1,6310 528	1,6310 528	1,6369 92	689,4	689,4,	691,0
6	Обработ ка вытяжк ой из мицели ия 10^{-10} с заражен ием	0,9 28	0,9888 768	0,9881 344	0,9888 768	516,4	516,2	516,4

10-е сутки

№	Вариан	D _к	D ₁	D ₂	D ₃	Активн	Активность	Активн
---	--------	----------------	----------------	----------------	----------------	--------	------------	--------

	Т					ость СОД ₁	СОД ₂	ость СОД ₃
1	Контроль вода	0,9 12	4,1970 24	4,1973 888	4,1973 888	1400,5	1400,6	1400,6
2	Обработка гордеци ном 10 ⁻¹⁰	0,8 92	0,0342 528	0,0371 072	0,0371 072	259,6	260,4	260,4
3	Обработка вытяжкой из мицелия 10 ⁻¹⁰	0,9 12	2,4897 6	2,4872 064	2,5101 888	932,5	931,8	938,1
4	Контроль Вода с заражением	0,9 04	1,7552 064	1,7533 984	1,7533 984	735.4	734,9	734,9
5	Обработка гордеци ном 10 ⁻¹⁰ с заражением	0,9 12	4,6391 616	4,6508 352	4,6373 376	1521,7	1524,9	1521,2
6	Обработка	0,9	3,4677	3,4958	3,4674	1200,6	1208,3	1200,5

ка вытяжк ой из мицели ия 10^{-10} с заражен ием	12	888	784	24			
---	----	-----	-----	----	--	--	--

Активность каталазы

3-и сутки

Вариант	Объем выделившегося кислорода (3,6,9, 12 и 15 мин)	Активность каталазы
1. Контроль вода	5,0 10,9 13,9 15,8 16,6	24.5328
2. Обработка гордецином 10^{-10}	5,2 9,4 11,1 13,0 14,5	18.8384
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	3,4 8,2 10,8	20.9548

	12,1 13,6	
4. Контроль Вода с заражением	4,4 9,0 11,9 12,8 13,4	19.2133
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	4,2 6,3 12,2 14,8 16,2	26.7046
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	4,9 9,0 12,4 14,0 14,8	21.3161

4-е сутки

Вариант	Объем выделившегося кислорода (3,6,9, 12 и 15 мин)	Активность каталазы
1. Контроль вода	5,1 10,5 13,9 15,4 16,1	23.5269
2. Обработка гордецином 10^{-10}	6,2	18.4315

	9,6 12,9 14,0 14,7	
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	4,8 9,5 12,9 14,0 15,4	22.1936
4. Контроль Вода с заражением	5,1 9,8 12,6 13,4 15,0	20.2810
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	4,2 6,4 11,8 14,0 15,7	25.1532
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	2,2 7,4 10,4 11,7 12,9	22.3499

7-е сутки

Вариант	Объем выделившегося кислорода	Активность каталазы

	(3,6,9, 12 и 15 мин)	
1. Контроль вода	5,5 10,3 13,9 15,6 16,6	23.6953
2. Обработка гордецином 10^{-10}	6,1 9,7 12,9 14,1 14,9	18.9320
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	5,2 9,9 12,5 13,9 15,3	20.8457
4. Контроль Вода с заражением	5,2 10,5 12,2 13,1 15,0	19.3197
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	4,2 6,9 11,7 14,2 15,8	25.1628
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	5,1 9,4 12,8	22.4298

	14,3 15,8	
--	--------------	--

8-е сутки

Вариант	Объем выделившегося кислорода (3,6,9, 12 и 15 мин)	Активность каталазы
1. Контроль вода	5,5 10,2 13,8 15,4 16,3	23.1402
2. Обработка гордецином 10^{-10}	5,4 10,9 12,5 13,9 15,6	20.3087
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	2,8 7,7 10,8 12,1 13,9	22.8165
4. Контроль Вода с заражением	5,2 9,6 13,3 15,1 16,0	23.2456

5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	4,8	25.5592
	10,0	
	13,3	
	15,7	
	16,9	
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	5,0	20.6069
	9,7	
	12,1	
	13,8	
	14,9	

10-е сутки

Вариант	Объем выделившегося кислорода (3,6,9, 12 и 15 мин)	Активность каталазы
1. Контроль вода	5,2	24.1485
	10,0	
	13,6	
	14,9	
	16,9	
2. Обработка гордецином 10^{-10}	2,7	22.2287
	7,8	
	10,6	
	12,1	
	13,4	
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	5,4	23.3123
	10,0	

	13,8 15,4 16,2	
4. Контроль Вода с заражением	5,2 9,7 13,1 15,0 15,9	22.9098
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	5,0 9,7 12,1 13,8 14,9	20.6069
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	5,7 11,2 12,3 13,9 15,4	19.2251

Активность пероксидазы

3-и сутки

№	t ₁	t ₂	A ₁	A ₂
1. Контроль вода	94	93	204	206
2. Обработка гордецином 10^{-10}	113	112	170	171
3. Обработка вытяжкой из	102	102	188	188

мицелия 10^{-10}				
4. Контроль Вода с заражением	101	101	190	190
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	117	117	164	164
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	113	114	170	168

4-е сутки

№	t_1	t_2	A_1	A_2
1. Контроль вода	113	112	170	171
2. Обработка гордецином 10^{-10}	107	107	179	179
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	107	107	179	179
4. Контроль Вода с заражением	102	101	188	190
5. Обработка гордецином 10^{-10}	102	102	188	188

с заражением				
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	132	131	146	146

7-е сутки

№	t_1	t_2	A_1	A_2
1. Контроль вода	29	29	662	662
2. Обработка гордецином 10^{-10}	47	46	409	41
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10}	30	29	640	662
4. Контроль Вода с заражением	38	37	505	518
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	22	21	873	914
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	38	37	505	518

8-е сутки

№	t ₁	t ₂	A ₁	A ₂
1. Контроль вода	27	27	711	711
2. Обработка гордецином 10 ⁻¹⁰	53	53	362	362
3. Обработка вытяжкой из мицелия 10 ⁻¹⁰	30	29	640	662
4. Контроль Вода с заражением	38	37	505	518
5. Обработка гордецином 10 ⁻¹⁰ с заражением	21	21	914	914
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10 ⁻¹⁰ с заражением	28	27	686	711

10-е сутки

№	t ₁	t ₂	A ₁	A ₂
1. Контроль вода	16	15	1200	1280
2. Обработка гордецином 10 ⁻¹⁰	43	42	447	457
3. Обработка	20	19	960	1010

вытяжкой из мицелия 10^{-10}				
4. Контроль Вода с заражением	29	29	662	662
5. Обработка гордецином 10^{-10} с заражением	13	12	1477	1600
6. Обработка вытяжкой из мицелия 10^{-10} с заражением	21	20	914	960

Приложение 5

Влияние гордецина на рост и развитие проростков гороха.

3 сутки

№	Вариант	Длина корня, см	Вес корня, г
1	Контроль вода	2,0	0,048
2	Обработка гордецином 10^{-12} М	1,1	0,029
3	Обработка вытяжкой из плесени 10^{-12} М	1,0	0,028
4	Контроль Вода с заражением	1,5	0,036
5	Обработка гордецином 10^{-12} М с заражением	0,9	0,026
6	Обработка вытяжкой	0,7	0,019

из плесени с заражением		
----------------------------	--	--

4-е сутки

№	Вариант	Длина корня, см	Вес корня, г	Длина проростка, см	Вес проростка, г
1	Контроль вода	2,5	0,0792	0,8	0,0274
2	Обработка гордецином 10^{-12} М 10^{-10}	1,3	0,0426	0,8	0,0261
3	Обработка вытяжкой из плесени	1,5	0,0367	1,0	0,0310
4	Контроль Вода с заражением	2,4	0,067	0,5	0,0112
5	Обработка гордецином 10^{-12} М 10^{-10} с заражением	3,0	1,1025	1,3	0,0482
6	Обработка вытяжкой из плесени с заражением	1,0	0,0312	0,4	0,0101

7-е сутки

№	Вариант	Длина корня, см	Вес корня, г	Число боковых корешков, шт	Длина проростка, см	Вес проростка, г
1	Контроль вода	4,3	1,2326	4	2,9	0,3214
2	Обработка гордецином 10^{-12} М 10^{-10}	1,0	0,0983	-	1,1	0,0384
3	Обработка вытяжкой из плесени	2,8	0,543	12	1,9	0,0926
4	Контроль Вода с заражением	2,4	0,1015	7	2,2	0,1024
5	Обработка гордецином 10^{-12} М с заражением	7,1	1,3297	5	1,8	0,242
6	Обработка вытяжкой из плесени с заражением	3,1	1,1127	11	2,4	0,1116

8-е сутки

№	Вариант	Длина корня, см	Вес корня, г	Число боковых корешков,	Длина проростка, см	Вес проростка, г
---	---------	-----------------------	--------------------	-------------------------------	---------------------------	---------------------

				шт		
1	Контроль вода	6,2	1,3212	14	3,0	0,3562
2	Обработка гордецином 10^{-12} М	1,2	0,2016	7	1,2	0,0421
3	Обработка вытяжкой из плесени	3,9	0,3627	15	2,1	0,1121
4	Контроль Вода с заражением	2,6	0,2014	11	2,4	0,1312
5	Обработка гордецином 10^{-12} М с заражением	7,2	1,3923	9	2,2	0,2523
6	Обработка вытяжкой из плесени с заражением	3,3	0,1294	15	2,6	0,1275

№	Вариант	Длина корня, см	Вес корня, г	Число боковых корешков, шт	Длина проростка, см	Вес проростка, г
1	Контроль вода	7,1	1,5312	16	4,4	0,4267
2	Обработка гордецином 10^{-12} М	1,9	0,3015	9	2,2	0,1022
3	Обработка вытяжкой из плесени	6,2	0,4527	16	3,9	0,2956
4	Контроль Вода с заражением	3,0	0,2945	14	3,0	0,2048
5	Обработка гордецином 10^{-12} М с заражением	7,8	1,4832	13	2,1	0,302
6	Обработка вытяжкой из плесени с заражением	3,9	0,2056	16	3,4	0,1983

