

На правах рукописи



Кулешова Екатерина Сергеевна

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

Специальность 03.01.05 - физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж-2014 г.

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Павловская Нинэль Ефимовна

Официальные оппоненты: **Корнеева Ольга Сергеевна**
доктор биологических наук, профессор,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий, кафедра
микробиологии и биохимии, зав. кафедрой.
Корниенко Надежда Николаевна
кандидат биологических наук, доцент. ФГБОУ
ВПО «Госуниверситет — УНПК»,
кафедра технологии и товароведения продуктов
питания, доцент

Ведущая организация: **ФГБОУ ВПО «Брянский государственный
университет им. академика
И.Г. Петровского»**

Защита состоится «01» июля 2014 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.02 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская пл., 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан « » апреля 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Брекova Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Сложившаяся к настоящему времени в России критическая ситуация с производством антибиотиков диктует необходимость изыскания новых источников для их выделения и производства. По прогнозам 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. Требуется усилить исследования по поиску веществ, обладающих антимикробной и антивирусной активностью. Источниками получения подобных веществ, кроме микроорганизмов, являются растения и в том числе злаковые, к которым относится ячмень.

Ячмень отличается повышенным содержанием антивирусных 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.

Цели и задачи исследований. Целью данной работы было выявление источника гордецина и получение антимикробных веществ из плесени, образующейся на корнях ячменя.

Для достижения цели решались следующие 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.

- Выявить связь между содержанием антибиотиков и устойчивостью ячменя к болезням.

Научная новизна работы. Впервые проведен скрининг генотипов ячменя из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова на содержание антибиотических веществ. Разброс данных по генотипам составляет от 1 - 12 мг/%. 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*.

Практическая значимость работы. Выявленная четкая зависимость между содержанием гордецина, полеганием и устойчивостью к грибным заболеваниям у отдельных генотипов 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.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре биотехнологии Орловского государственного аграрного университета при чтении лекций по физиологии, биохимии, микробиологии, а также при проведении практикумов и выполнении курсовых и дипломных работ.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на региональных конференциях. Они были представлены на международной научно-практической конференции «Иновации аграрной науки и производства» (Орел, 2011); региональной научно-практической конференции молодых ученых «АПК в современном мире: взгляд научной молодежи» (Орел, 2011); международной конференции «Биология-наука 21 века» (Москва, 2012); региональной научно-практической конференции молодых ученых «Современный агропромышленный комплекс глазами молодых исследователей» (Орел, 2012); международной конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2012); 5 международной заочной научно-практической конференции «Иновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству» (Орел, 2012); на 6 международной заочной научно-практической конференции «Иновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии

сельскохозяйственному производству» (Орел, 2013); международной научно-практической конференции молодых ученых « Животноводство России в условиях ВТО: от фундаментальных и прикладных исследований до высокопродуктивного производства» (Орел, 2013); международной научно-технической конференции « Фундаментальные и прикладные аспекты создания биосферосовместимых систем» (Орел, 2013)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, изложения результатов исследований и их обсуждения, выводов, заключения, приложения, списка литературы, включающего 140 источников. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 24 рисунками.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Экспериментальная работа проводилась в лаборатории биотехнологии и молекулярной экспертизы Орловского регионального биотехнологического центра сельскохозяйственных растений ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», исследования по изучению корневых плесеней ячменя проводились в микробиологической лаборатории орловской городской больницы им. С.П.Боткина. В работе исследованы 14 образцов ячменя коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова различного географического происхождения, различающиеся продуктивностью, устойчивостью к полеганию, к пыльной головне, восприимчивостью к мучнистой росе и пятнистостям. Сортообразцы: к-22089 Белогорский, к-30845 Золотник, к-27080 Белорусский 76, к-19417 Московский 121, к-30943 Amulet, к-29864 Kleine gerste, к-28292 Westendorf/Tirol, к-27471 Korona Laschego, к-17844 Coeleste, к- 30919 Омский голозерный, к-30846 Сигнал, к-30440 23007, к-6557 Местный Армения, к-14981 Местный Дагестан.

Методы исследования. Проращивание обработанных семян гороха проведено в рулонах фильтровальной бумаги по ГОСТ – 12038-84. Для создания необходимых условий выращивания использовалась программируемая климатокамера «Фитотрон» производства компании Biokom. Выращивание производилось при температуре 25°C, 12-ти часовом световом дне. 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. и инфицирования грибами *Fusarium oxysporum* L.

использовали культуральную жидкость, предварительно профильтрованную 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 погружали в культуральную жидкость гриба на 15-20 минут. Зараженные проростки переносили во влажную камеру (Павловская и др., 2002).

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.

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 по стрипам.

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 посеvy производили сразу после смыва. Для определения термоустойчивых бацилл смывы перед посевом прогревали на водяной бане при 85-90 С° в течение 15 минут.

Обнаружение антибиотиков проводили по Добрыниной и Свешниковой (1967).

Для определения каталазы (КФ 1.11.1.6) в растениях была использована методика А.И. Ермакова (1987) с модификациями Л.Е. Иваченко (1997).

Пероксидазную активность (КФ 1.11.1.2) растений определяли колориметрическим методом Бояркина с модификациями (Плешков, 1985). Для определения активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) была

использована модифицированная методика (Giannopolities, C.N., 1977) с использованием прибора (фотореактора) (Гринблат А.И., 2005-2006).

Статистическая обработка данных. Лабораторные опыты проводили в 3 кратной биологической повторности, аналитическое определение для каждой пробы также в трех повторностях. Достоверность экспериментальных данных оценивали методами математической статистики с привлечением современных программных средств. Расчеты, построение графиков и их описание осуществляли с помощью приложений Microsoft Office Word 7 и Excel 7 для Windows XP и пакета прикладных программ «Statistica. 7,0», «Biotest –D».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Морфологические особенности сортообразцов ячменя

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

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

Наименьшее содержание гордецина было установлено 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.

Рекордсменом по наличию гордецина является сорт Амулет, у которого количество гордецина достигает 11-12 мг/%. 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.

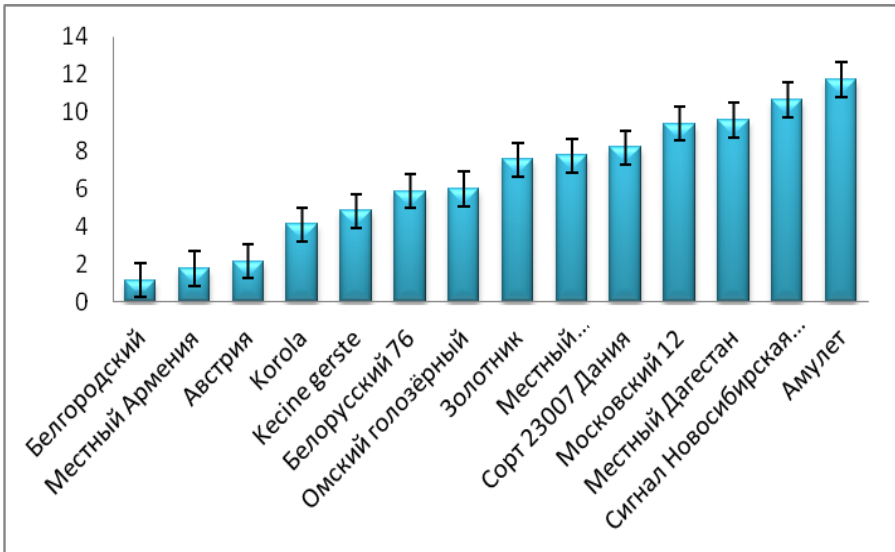


Рис.1 - Результаты скрининга генотипов ячменя коллекции ВИР на содержание гордецина

Факты показывают, что синтез гордецина при прорастании наиболее интенсивный в проростках генотипа сорт 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 сорта Местный Армения динамика синтеза несоизмерима с таковой у первого образца. Количество гордецина не превышает величины 1,0 мг/%, с небольшим подъемом через 16 часов прорастания.

2. Химическая природа гордецина

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). Ниже представлены собственные данные проведенных исследования по очистке препаратов гордецина методами ВЭЖХ. Препаративная хроматограмма данного вещества (вещества) приведена на рис.2, из которого видно, что спиртовой экстракт карбонатной фракции содержит несколько пиков. Указанные на хроматограмме фракции собирали в круглодонные колбы, упаривали на ротормном испарителе досуха при температуре 25°C 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.3). На этом основании можно предположить, что фракция-4 соответствует гордецину.

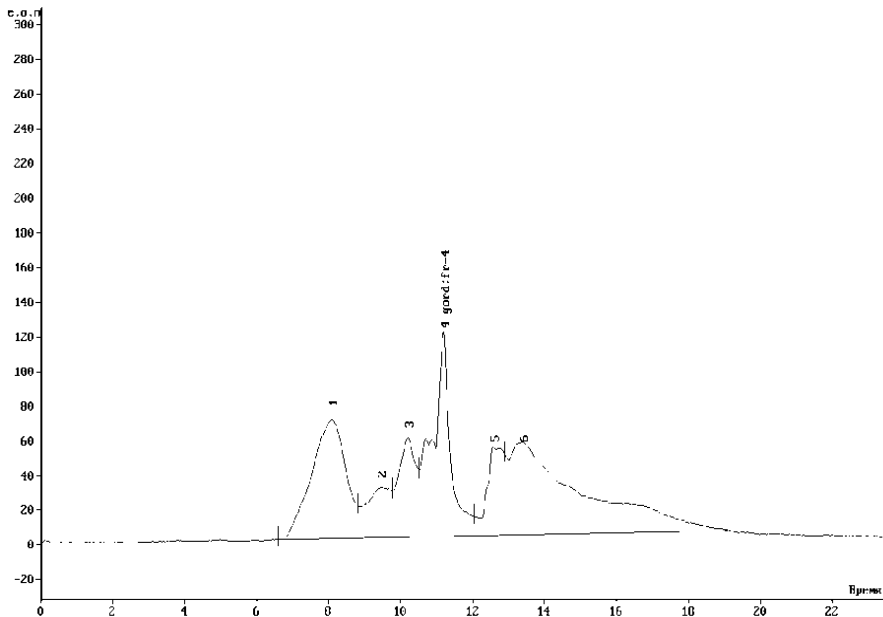


Рис.2 - Preparative chromatogram of a spirit extract of the carbonated fraction, containing gordenin. Conditions: column – Ultrasil-Si(250 x 7.8; 10 μ m); mobile phase – 97,5% hexane + 2,5% isopropanol; flow rate – 2 ml/min; sample, applied to the column – 2 ml; detection – UV at 260 nm

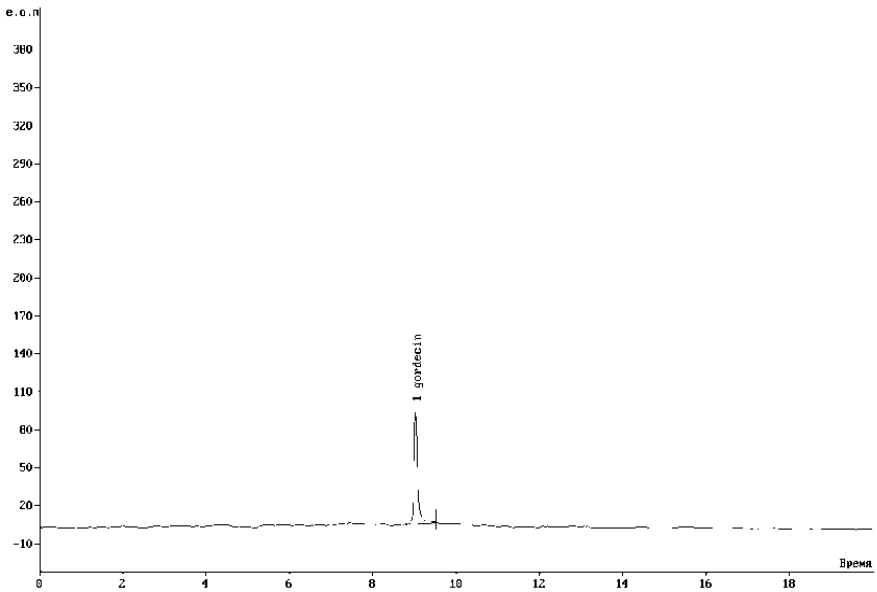


Рис.3 - Аналитическая хроматограмма очищенного препарата гордецина. Условия: колонка –Ultrasil-Si(250 x 4,6; 5 мкм); подвижная фаза – 97,5% гексан + 2,5% изопропанол; скорость потока – 0,5 мл/мин; проба, наносимая на колонку – 10 мкл (с= 1мг/мл); детектирование – УФ при 260 нм

На основании проведенных исследований можно предполагать, что разработана методика выделения и очистки гордецина из малых проб зерна ячменя методом ВЭЖХ. 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.

3. Видовая принадлежность плесени и бактериальной обсемененности 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. 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.

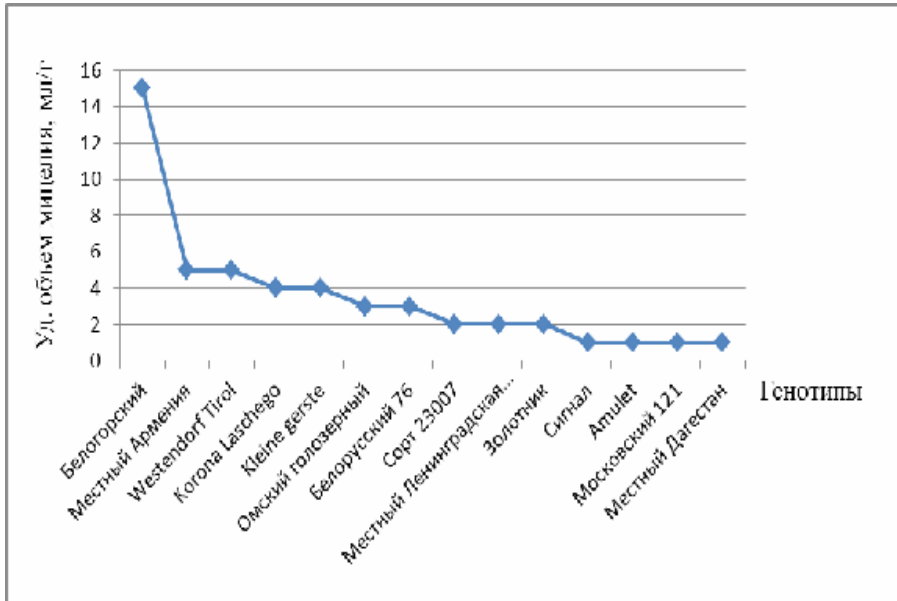


Рис.4 – Количественная характеристика объем плесени на корнях 10-дневного ячменя

Установлено, что развитие плесени на корнях различных генотипов ячменя обратно пропорционально содержанию гордецина в зерновках и строго повторяется по образцам (рис. 4). При сравнении рис. 1 и рис. 4 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. Нами была поставлена задача - выявить наличие источников антибиотиков, идентифицировать и установить связь с их содержанием и устойчивостью ячменя к возбудителям болезней.

Плесень, выросшая на корнях ячменя (рис.5), видимо, относится к грибам рода *Streptomyces*.

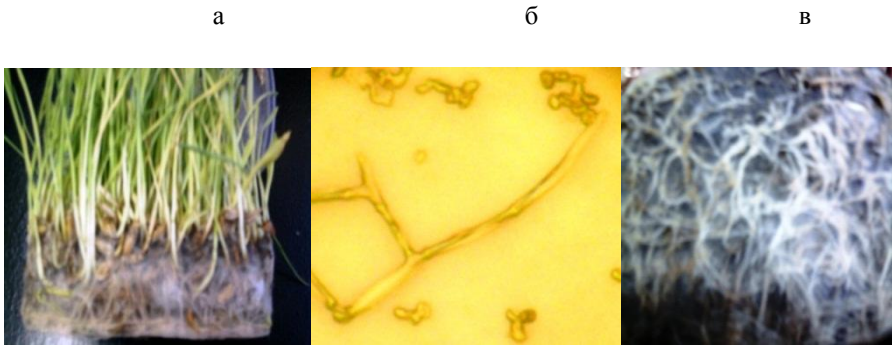


Рис. 5 – Плесень *Streptomyces*. а) внешний вид на корнях; б) увеличение под микроскопом 10×100; в) общий вид плесени.

Общее количество микроорганизмов (КОЕ/г) в разных сортах ячменя представлено 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.

Вместе с тем, на корнях ячменя выявлена *Klebsiela pneumonia* - вид грамотрицательных факультативно - анаэробных условно-патогенных бактерий (рис.6). 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 pneumonia* не образует спор, неподвижна, способна к образованию капсул. Располагаются одиночно, парно и скоплениями.

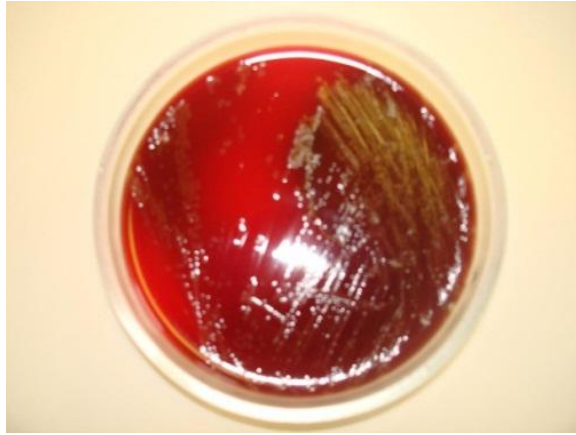


Рис.6 – Морфология *Klebsiella pneumoniae*.

Таким образом, проведенные исследования показали наличие на зерне ячменя актиномицета *Streptomyces* и бактерий *Bac. subtilis*, *Bac. brevis*, *Klebsiella pneumoniae*.

4. Наличие антибиотиков в корневой плесени ячменя

(Табл. 1)

Вес плесени и содержание антибиотиков (мг/мл)

№	Название образца	Уд.объем мицелия, мл/г	Пеницилин	Стрептомицин	Тетрациклин	Грамицидин
1	22089 Ленинградская обл. Белогорский	15	0,02	0,0064	0,0046	0,0

2	30845. Новосибирская обл. Золотник	2	0,015	0,0071	0,0036	0,0
3	6557. Армения.	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</i>	1	0,008	0,0064	0,0	0,048
8	29860. Германия. <i>Kleine gerste</i>	4	0,04	0,0074	0,0018	0,0
9	28292. Австрия <i>Nudum</i>	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. <i>Kovona Laschrigo</i>	4	0,02	0,0062	0,0017	0,0

12	17844.Ленингр. обл. <i>Cocleste</i>	2	0,05	0,008	0,0025	0,0
13	30846.Новосибирск ая 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

Анализ наличия антибиотиков в плесени показал (табл. 1) 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 сорта 6557 Армения и по грамицидину сортов 27080 Белорусский 76 и 30943 Амулет Чехия. Анализ связи между содержанием антибиотиков и устойчивостью к заболеваниям выявил следующее: образец сорта 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. (1983г.), грамицидин продуцирует не плесень, а бактерии рода *Bacillus brevis*. Из таблицы (№1) 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.

5. Исследования биологической активности антибиотиков на растительных тканях

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% (Зотиков, Борзенкова, 2009). В наших исследованиях изучено влияние вытяжки из

плесени и гордецина на зараженные *F. oxysporum* проростков гороха сорта Батрак. На рис.7 представлены результаты измерений опытных и контрольных проростков на 10-ый день прорастания зерна гороха.

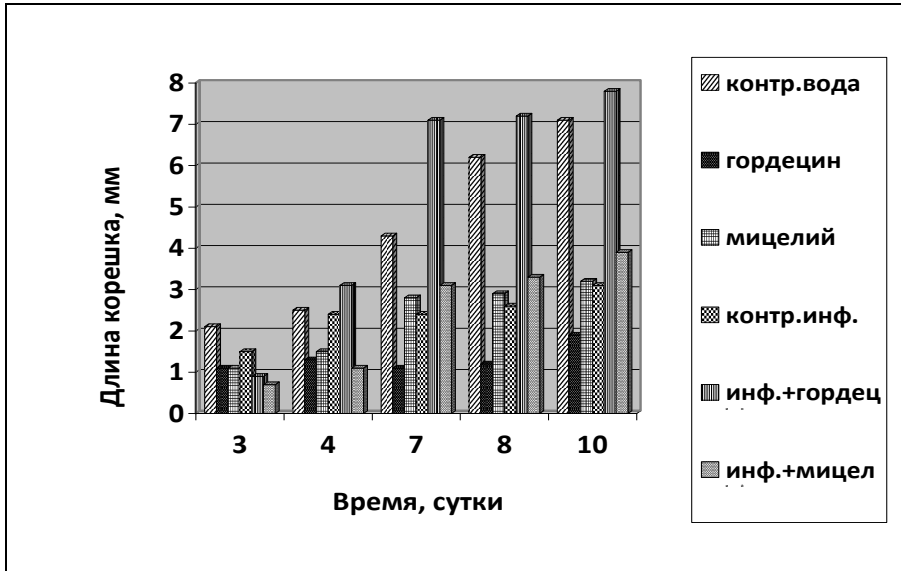


Рис.7- Развитие проростков гороха сорта Батрак по вариантам:

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

Как видно из рисунков, у здоровых проростков гороха за 10 дней корни выросли до 7 см. Под влиянием гордецина в концентрации 10^{-12} М корни угнетены и 10-дневные имеют размер менее 2 см. Вытяжка из плесени (мицелия) также действует угнетающе и у 10-дневных проростков гороха составляет 3 см. Инфицирование семян гороха *F. Oxysporum* приводит у 10-дневных проростков к угнетению развития корневой системы, хотя боковых корешков становится больше. Вместе с тем, обработанные гордецином инфицированные проростки гороха имеют размер корней больше контрольных (до 8 см). Обработка вытяжкой из плесени (мицелия) больных проростков гороха не привела к таким положительным результатам. Длина корешков была около 4 см.

Между тем, практически у всех вариантов обработка гордецином, вытяжкой из плесени и инфицирование действуют угнетающе на рост и развитие побегов.

Гриб *Fusarium oxysporum* проникает в растение гороха через корневую систему и по этой причине угнетает рост корней. 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 её патологическое влияние на проростки гороха. Обработка гордецином инфицированных *Fusarium oxysporum* проростков приводит не только к восстановлению ростовой активности корней, но и к их стимулированию.

Таким образом, гордецин оказывает избирательное действие на возбудителя корневых гнилей у гороха, восстанавливая нормальные функции гороха, инфицированного *F. oxysporum*. Вытяжка из плесени таким свойством не обладает.

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 средства защиты растений от болезней.

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

Антиоксидантная система растений является тест-системой на состояние клеток, а активность отдельных ферментов служит способом оценки новых препаратов, оказывающих выздоравливающее действие на зараженные растения. Горох является индикатором для подобных экспериментов.

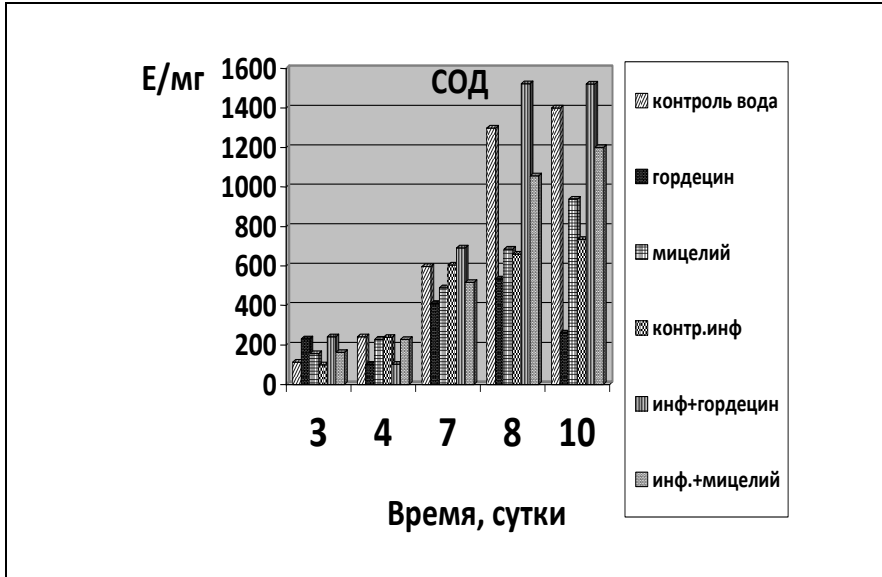


Рис.8 - Изменение активности супероксиддисмутазы здоровых и больных проростков гороха под влиянием гордецина и вытяжки из плесени ячменя

На рис.8 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 (162-1200Е/мг.) 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. Показано ее довольно стабильно 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 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.

Пероксидаза использует перекись как окислитель множества соединений фенольной природы. Кривые активности пероксидазы гороха в процессе его развития повторяют таковые по супероксиддисмутазе (рис.9). 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.

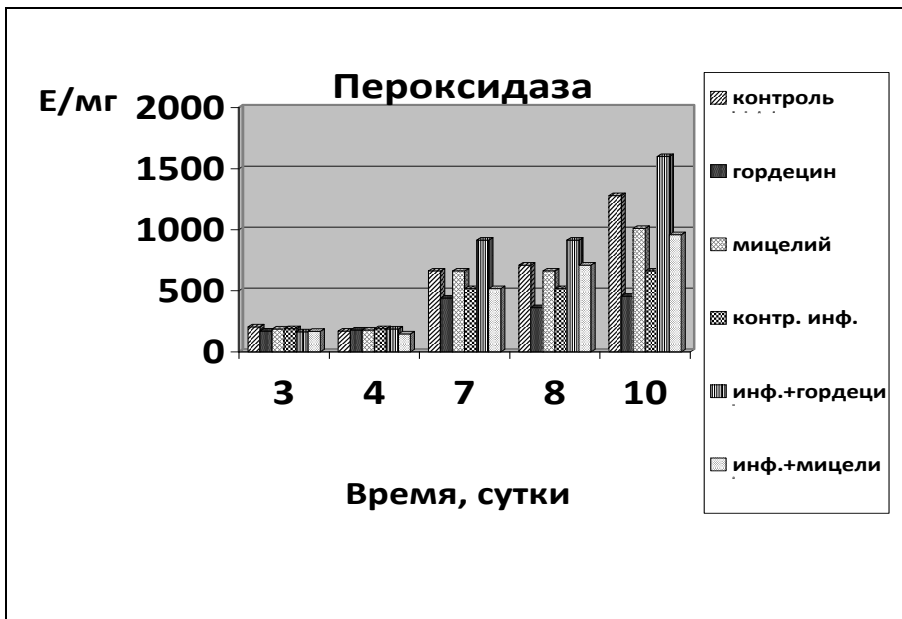


Рис.9-Изменение активности пероксидазы здоровых и больных проростков гороха под влиянием гордецина и вытяжки из плесени ячменя.

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.

7. Связь между содержанием антибиотиков и устойчивостью ячменя к болезням

Резюмируя полученные данные, можно констатировать, что скрининг генетической коллекции ячменя показал, что генотипы ячменя существенно различаются по содержанию гордецина. Разброс данных составляет 1 - 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 Сигнал *nutans* и Амулет, у которых количество гордецина достигает 11-12 мг/%. Сорт Сигнал среднеполегаемый и поражается всеми грибными заболеваниями, а сорт 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.

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.

Содержание в образцах: пенициллина (0,02-0,06 мг), стрептомицина (0,0062-0,0071), тетрациклина (0,0-0,0079) и грамицидина (0,0-0,048 мг). Рекордсменом по накоплению антибиотиков пенициллина, стрептомицина и тетрациклина является образец сорта 6557 Армения и по грамицидину сортов 27080 Белорусский 76 и 30943 Амулет Чехия.

ВЫВОДЫ

1. Проведен скрининг генотипов ячменя на содержание антибиотических веществ. Разброс данных составляет 1 мг/% - 12 мг/%. Наибольшее количество гордецина определено у сортов Сигнал и Амулет (11-12 мг/%). Сорт Сигнал среднеполегаемый и поражается всеми грибными заболеваниями, а сорт Амулет устойчив к полеганию, к мучнистой росе и слабо поражается пятнистостями.

2. У большинства генотипов ячменя содержание гордецина колеблется от 4 до 9 мг/%. Из них среднеустойчивыми к полеганию являются сорта Белогорский, Золотник, Белорусский 76, Московский 121. Сорт Белорусский 76 устойчив к мучнистой росе.

3. Четкая зависимость между содержанием гордецина, полеганием и устойчивостью к грибным заболеваниям выявлена не у всех исследуемых образцов. Это дает возможность отбора соответствующих по данным признакам образцов для включения их в селекционную программу создания устойчивых сортов ячменя.

4. Разработана оригинальная методика выделения гордецина из малых проб зерна ячменя и ВЭЖХ для очистки гордецина. Гордецин в условиях снятия масс-спектра, видимо, переходит в окисленную форму.

5. 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.

6. Установлено наличие на зерне ячменя группы микроорганизмов: актиномицета *Streptomyces* и бактерий *Bac. subtilis*, *Bac. brevis*, *Klebsiela pneumoniae*.

7. В плесени на корнях ячменя выявлены антибиотики: пенициллин (0,02-0,06 мг), стрептомицин (0,0062-0,0071), тетрациклин (0,0-0,0079) и грамицидин (0,0-0,048 мг) в зависимости от сортообразца. Рекордсменом по накоплению антибиотиков пенициллина, стрептомицина и тетрациклина является образец сорта 6557 Армения и по грамицидину сорта 27080 Белорусский 76 и сорта 30943 Амулет Чехия.

8. 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.

9. 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.

10. Гордецин следует отнести к антимикробным препаратам направленного действия и к средствам защиты растений биологической природы от возбудителя корневых гнилей и увядания.

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

11. Выделены генотипы сортов ячменя к-27080 Белорусский 76 *nudum* и к-30943 *Amulet nutans* Чехия, устойчивые к полеганию и мучнистой росе, слабо поражающиеся пятнистостями, для которых характерно высокое содержание гордецина и грамицидина.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Павловская Н.Е. Выявление антибиотических веществ ячменя и их влияние на проростки гороха / Н.Е. Павловская, Е.И. Юшкова, Е.С. Кулешова // Ученые записки ОГУ. №3. - 2012. - С.132-136.

2. Кулешова Е.С. Скрининг генотипов ярового ячменя по содержанию гордецина в семенах / Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская, В.Г. Лоскутов // Ученые записки ОГУ. №6. - 2012. - С.138-142.

3. Павловская Н.Е. Ячмень-источник антибиотиков / Н.Е. Павловская, Е.В. Костромичева, Е.С. Кулешова, И.В. Горькова, И.Н. Гагарина // Вестник Орел ГАУ. №4. - 2012. - С.70-72.

4. Солохина И.Ю. Скрининг генотипов овса по содержанию авенацина / И.Ю. Солохина, Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская, И.Г. Лоскутов, Ученые записки ОГУ. №3. - 2013. - С. 181-186.

Статьи и материалы конференций:

5. Кулешова Е.С. Применение гордецина в животноводстве / Е.С. Кулешова // Материалы международной научно-практической конференции «Инновации аграрной науки и производства», Орел. – 2011. - С.77-79.

6. Кулешова Е.С. К вопросу о получении гордецина из ячменя /Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская//Материалы региональной научно-практической конференции молодых ученых «АПК в современном мире: взгляд научной молодежи», Орел. - 2011. - С.48-50.

7. Кулешова Е.С. Плесень ячменя - источник получения антибиотиков/Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская//Материалы 5

Международной заочной научно-практической Интернет-конференции «Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству», Орел. - 2012. - С.252-255.

8. Кулешова Е.С. Выявление антибиотических веществ, продуцируемых корневыми плеснями ячменя/Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская, Е.И. Юшкова //Сборник трудов международной Интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее», Казань.-2012. - С.191-193.

9. Кулешова Е.С. Динамика накопления гордецина в образцах ячменя различного происхождения / Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская //Материалы региональной научно-практической конференции молодых ученых « Современный агропромышленный комплекс глазами молодых исследователей», Орел. – 2012 .- С.95-97.

10. Кулешова Е.С. Гордецин-антибиотик природного происхождения /Е.С. Кулешова, С.В. Квасова, Е.И. Юшкова// Сборник трудов «Обучение и развитие студентов-основа стратегического управления в фармацевтическом бизнесе», Орел.-2012.-С.31-33.

11. Кулешова Е.С. Изучение состава микрофлоры корневых плесеней ячменя/Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская, Е.И. Юшкова // Межрегиональный научный сборник выпуск 14. «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов», Воронеж. - 2012. - С.148-152.

12. Кулешова Е.С. Природные сырьевые ресурсы для создания биологически активных препаратов защиты растений / Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская, Е.И. Юшкова, Н.И. Ботуз //Материалы международной конференции «Биология – наука 21 века», Москва.-2012. - С.671-673.

13. Кулешова Е.С. Особенности применения антибиотика гордецина в сельском хозяйстве /Е.С. Кулешова // Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых «Животноводство России в условиях ВТО: от фундаментальных и прикладных исследований до высокопродуктивного производства», Орел. - 2013. - С.218-220.

14. Кулешова Е.С. Плесневые грибы как источник антибиотических веществ /Е.С. Кулешова // Материалы 6 международной заочной научно-практической интернет-конференции «Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственного производства», Орел. – 2013. - С.22-26

15. Кулешова Е.С. Зараженность ячменя микрофлорой/ Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская // Материалы международной научно-технической интернет-конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты создания биосферосовместимых систем», Орел. - 2013. - С.300-302.

16. Кулешова Е.С. Выявление связи между устойчивостью ячменя к болезням и наличием антибиотиков в плесени корней/ Е.С. Кулешова, Н.Е. Павловская // Межрегиональный научный сборник

«Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов», Воронеж. - 2013. - С.105-108.

17. Кулешова Е.С. Выделение, очистка и некоторые физико-химические свойства антибиотика гордецина из ячменного зерна / Е.С. Кулешова, А.Н. Даниленко, Н.Е. Павловская // Материалы международной заочной научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке», Тамбов. - 2013. - С.55-57.

Подписано в печать 23.04.2014 г.
Формат 60x90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 1,0. Заказ 129. Тираж 100 экз.

Отпечатано в издательстве Орел ГАУ, 2013, Орел, бульвар Победы, 19