

УДК 577.1

БЕЛОРУССКИЙ ИЗОЛЯТ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* КК-1: ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГЕРБИЦИДУ ГЛИФОСАТУ

Е. В. КУЛИК¹⁾, М. А. ШУКШИНА¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Проанализированы рост мицелия, формирование склероциев, а также полигалактуроназная, α -амилазная и целлюлазная активность у белорусского изолята гриба *Sclerotinia sclerotiorum* КК-1, выделенного из инфицированной ткани корнеплода моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus*). Установлено, что продукция полигалактуроназы индуцируется пектином и подвергается катаболитной репрессии. С использованием PDA-среды, содержащей индикаторный реактив бромфеноловый синий, выявлена секреция щавелевой кислоты, которая является значимым фактором патогенности гриба. Показано, что глифосат (коммерческий аналог – «Торнадо»), добавленный в среду культивирования в минимальной из используемых доз (200 мг/л), вызывал существенное ингибирование как роста мицелия, так и формирования склероциев. Установлено, что продукция α -амилазы и целлюлазы, в отличие от синтеза полигалактуроназы, ингибируется глифосатом.

Ключевые слова: *Sclerotinia sclerotiorum*; формирование склероциев; полигалактуроназная активность; α -амилазная активность; целлюлазная активность; глифосат.

SCLEROTINIA SCLEROTIORUM КК-1 ISOLATE FROM BELARUS: PATHOGENICITY FACTORS AND GLYPHOSATE SENSITIVITY

A. V. KULIK^a, M. A. SHUKSHINA^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. V. Kulik (alena.kulik31@gmail.com)

In the presence work, mycelial growth, sclerotia formation, polygalacturonase, α -amylase and cellulase activities of a Belarusian fungal isolate *Sclerotinia sclerotiorum* КК-1 collected from infected carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) were analyzed. It was established that polygalacturonase was induced by pectin and subject to catabolite repression by

Образец цитирования:

Кулик ЕВ, Шукшина МА, Евтушенков АН. Белорусский изолят *Sclerotinia sclerotiorum* КК-1: факторы патогенности и чувствительность к гербициду глифосату. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020; 3:54–63.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-54-63>

For citation:

Kulik AV, Shukshina MA, Evtushenkov AN. *Sclerotinia sclerotiorum* КК-1 isolate from Belarus: pathogenicity factors and glyphosate sensitivity. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;3:54–63. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-54-63>

Авторы:

Елена Вячеславовна Кулик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Маргарита Александровна Шукшина – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Е. В. Кулик.
Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Alena V. Kulik, PhD (biology); head of the laboratory of transgenic plants, department of molecular biology, faculty of biology.
alena.kulik31@gmail.com
Margarita A. Shukshina, student at the faculty of biology.
shukshina.margarita@yandex.by
Anatoliy N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology.
evtushenkov@bsu.by

glucose. The ability of the isolate to produce oxalic acid, an important factor of pathogenesis, was observed throughout fungus incubation on PDA medium amended with bromophenol blue. Glyphosate (commercial counterpart «Tornado») starting from its level in the medium of 200 mg/L caused a significant inhibition of mycelial growth and sclerotia formation. It was observed that α -amylase and cellulase activities were inhibited by glyphosate unlike polygalacturonase activity.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; sclerotia formation; polygalacturonase activity; α -amylase activity; cellulase activity; glyphosate.

Введение

Sclerotinia sclerotiorum – широко распространенный фитопатогенный гриб, который поражает более 400 видов растений и вызывает заболевание под названием «склеротиниоз», или «белая гниль» [1]. Большинство растений, подверженных заражению, относятся к двудольным, хотя выявлено значительное количество сельскохозяйственных видов однодольных растений, поражаемых *S. sclerotiorum*. Особенно сильную угрозу склеротиниоз представляет для соевых бобов, фасоли, подсолнечника, рапса, арахиса. Как в процессе культивирования растений на полях, так и при размещении их в хранилищах гриб может заражать молодые саженцы, взрослые растения, плоды, корнеплоды. Благодаря способности *S. sclerotiorum* выживать на инфицированных тканях, в почве, на живых растениях заболевание может быстро распространяться от растения к растению.

Данные, накопленные в течение последних лет, указывают на тонкое взаимодействие этого агрессивного некротрофного патогена с его многочисленными хозяевами. У склеротинии были идентифицированы небольшие секреторные белки, функция которых заключается не только в подавлении защитных механизмов хозяина, но и в индукции гибели его клеток [2; 3]. Кроме того, характеристика генов, участвующих в биосинтезе и деградации щавелевой кислоты, показала, что высокий уровень вирулентности поддерживается благодаря динамическому контролю накопления щавелевой кислоты, осуществляемому посредством разнообразных механизмов. Результаты экспериментов с мутантами фитопатогена, у которых отсутствовала щавелевая кислота, указывали на возможную ее роль как фактора колонизации [4].

Фитопатогенный гриб *S. sclerotiorum* – один из наиболее неспецифичных растительных патогенов. На начальных этапах инфекционного процесса он секретирует большое количество гидролитических ферментов, участвующих в деградации клеточной стенки растений, – полигалактуроназы [5; 6], целлюлазы [7], глюканы, ксиланазы [8–10], амилазы [11; 12].

Среди различных гидролаз полигалактуроназа является значимым ферментом пектолитического комплекса склеротинии и считается одним из основных факторов патогенности, который необходим для внедрения гриба в клетки хозяина. Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что образование у *S. sclerotiorum* множественных форм эндополигалактуроназ объясняется посттрансляционной (гликолизирование) или постсекреционной (протеолиз) модификацией фермента. Альтернативной причиной такого разнообразия эндополигалактуроназ может быть принадлежность кодирующих их генов к мультигенному семейству [5; 6]. Весьма вероятно, что наличие множественности пектиназных генов у гриба обеспечивает гибкость и адаптацию патогена к широкому спектру поражаемых растений.

Физиологические исследования патогенеза, вызванного *S. sclerotiorum*, выявили тесную связь с целлюлолитическими ферментами [7]. Наблюдаемая последовательная деградация как нативной, так и растворимой целлюлозы указывает на то, что этот гриб обладает полной целлюлолитической системой. Установлено, что целлюлаза *S. sclerotiorum* представлена комплексом из трех ферментов: фактора набухания, инициирующего подготовку к дальнейшему расщеплению целлюлозы, термостабильной «вискозиметрической» целлюлазы и термолабильной β -глюкозидазы.

Амилаза – конститутивный фермент, встречающийся у представителей различных таксономических групп. Она есть не один фермент, а комплекс энзимов, гидролизующих крахмал, – α -амилазы, декстриназы и глюкоамилазы. В культуральной жидкости коллекционного штамма *S. sclerotiorum* (Тунис), выращенного на овсяной муке, были обнаружены две формы α -амилазы (1,4- α -D-глюканглюканогидролазы) с молекулярной массой 43 и 54 кДа [11; 12]. Выявленная у α -амилазы меньшей молекулярной массы способность образовывать мальтотриозу в качестве основного конечного продукта открывает перспективы ее использования в различных биотехнологических процессах.

На сегодняшний день главным способом защиты сельскохозяйственных растений от склеротиниоза остается применение фунгицидов. В ряде научно-исследовательских работ было показано, что уникальный гербицид глифосат, мишенью действия которого является фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтаза шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот у растений, обладает антифунгальной активностью *in vivo* и *in vitro* в отношении большого спектра фитопатогенных грибов:

Phytophthora cinnamomi (возбудитель корневой гнили сосны лучистой), *Septoria nodorum* (возбудитель септориоза колоса), *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (возбудитель желтой ржавчины пшеницы), *P. triticina* (возбудитель листовой ржавчины пшеницы), *Phakopsora pachyrhizi* (возбудитель азиатской ржавчины сои) [13–17].

Цель данной работы состояла в выявлении у белорусского изолята *S. sclerotiorum* КК-1 полигалактуроназной, α -амилазной, а также целлюлазной активности как основных факторов патогенности и оценке его чувствительности к гербициду глифосату.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся белорусский изолят фитопатогенного гриба *S. sclerotiorum* КК-1, выделенный из пораженной ткани корнеплода моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus*).

Оценка чувствительности изолята к действующему веществу гербицида «Торнадо» (глифосат – изопропиламинная соль N-фосфонометилглицина) проводилась в чашках Петри на картофельно-глюкозной агаризованной среде PDA (*Fluka Biochemika*, Швейцария) без гербицида (контроль) и с его добавлением в диапазоне концентраций 200–1000 мг/л. На среду выкладывались агаризованные диски диаметром 5 мм с активно растущими колониями гриба. После инкубации в условиях темноты при температуре 20–22 °С на 5-й день осуществлялся учет результатов: измерение диаметра зоны покрытия мицелием среды и подсчет количества склероциев. Процент ингибирования (I) рассчитывался по формуле [18]

$$I = \frac{C - F}{C} \cdot 100,$$

где C – диаметр (в сантиметрах) зоны покрытия мицелием среды (или количество склероциев) на контрольной чашке без добавления гербицида; F – аналогичные параметры, анализируемые на чашке с гербицидом. Эксперимент проводился в трехкратной повторности.

Для получения препарата полигалактуроназы осуществлялось культивирование гриба в жидкой минимальной солевой среде, состав которой представлен в работе [9], с добавлением 1 % цитрусового пектина или 2 % глюкозы при 28 °С и непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин. После инкубации в течение времени, определяемого экспериментом, выполняли центрифугирование (6000 об/мин, 20 мин) и отбор супернатанта, к которому добавляли 2 объема ацетона для осаждения белков. После инкубации при –20 °С в течение 18 ч белки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин), ацетон выпаривали, белковый препарат растворяли в ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH 5,0).

Полигалактуроназную активность определяли методом, основанным на использовании 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) [19]. Предварительно нагретая на водяной бане до 50 °С реакционная смесь (400 мкл) содержала 1,1 % полигалактуроновой кислоты в ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH 5,0). После введения 100 мкл ферментного препарата и инкубирования при 50 °С в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 1,5 мл реактива с ДНС и последующим немедленным помещением пробирок на кипящую водяную баню на 10 мин. Контрольные пробирки содержали те же компоненты, что и опытные образцы, но в них не прошла реакция гидролиза полигалактуроновой кислоты. Светопоглощение в охлажденных пробирках измеряли при длине волны 520 нм. За ноль принималась оптическая плотность смеси субстрата и натрий-ацетатного буфера после реакции с ДНС, за единицу активности полигалактуроназы – количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль/л моногалактуроновой кислоты за 1 мин реакции при 50 °С в пересчете на 1 мл культуральной жидкости или 1 мг белка. Для расчета значений активности пользовались калибровочным графиком зависимости интенсивности поглощения от концентрации моногалактуроновой кислоты.

Для получения препарата α -амилазы гриб культивировали в жидкой минимальной солевой среде, состав которой представлен в статье [11], с добавлением 1 % растворимого крахмала при 28 °С и непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин. Спустя 7 дней инкубирования проводили центрифугирование (6000 об/мин, 20 мин) для отделения мицелия от супернатанта, к которому добавляли 2 объема ацетона для осаждения белков. После инкубации при –20 °С в течение 18 ч белки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин), ацетон выпаривали, белковый препарат растворяли в ацетатном буфере (0,02 моль/л, pH 4,7).

Определение α -амилазной активности также проводили методом, основанным на использовании ДНС [19]. Предварительно нагретая на водяной бане до 50 °С реакционная смесь (400 мкл) содержала 1,1 % растворимого крахмала в ацетатном буфере (0,02 моль/л, pH 4,7). Реакцию начинали добавлением 100 мкл ферментного препарата. После инкубирования при 50 °С в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 1,5 мл реактива с ДНС и последующим немедленным помещением пробирок на кипящую водяную баню на 10 мин. Контрольные пробирки содержали те же компоненты, что и опытные

образцы, но в них не прошла реакция гидролиза крахмала. Светопоглощение в охлажденных пробирках измеряли при длине волны 540 нм. За ноль принималась оптическая плотность смеси субстрата и натрий-ацетатного буфера после реакции с ДНС, за единицу активности α -амилазы – количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль/л глюкозы за 1 мин реакции при 50 °С в пересчете на 1 мг белка. Для расчета значений активности пользовались калибровочным графиком зависимости интенсивности поглощения от концентрации глюкозы.

Количественное содержание белка в образцах определяли методом Бредфорда [20].

Качественное определение щавелевой кислоты проводили с использованием красителя бромфенолового синего в концентрации 50 мг/л, который вводили в среду культивирования PDA. Исходное значение pH среды доводили до 7,0, добавляя 0,1 моль/л NaOH. Изменение окраски среды с синей на желтую свидетельствовало о секреции щавелевой кислоты [21].

Для выявления влияния глифосата на целлюлолитическую активность *S. sclerotiorum* КК-1 гриб культивировали на минимальной агаризованной среде Чапека с 0,1 % карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) в присутствии коммерческого гербицидного препарата «Торнадо» в диапазоне концентраций действующего вещества 20–1800 мг/л. После 5-дневной инкубации при 22 °С на поверхность среды наслаивали 0,1 % водный раствор конго красного. Результат взаимодействия реактива с целлюлозой оценивали после 15 мин инкубации при комнатной температуре. Визуализацию зон гидролиза КМЦ осуществляли после отмывания среды 10 % NaCl. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение

Современные подходы к созданию агрокультуры, устойчивой к заболеваниям, включают как классические методы селекции, направленные на получение резистентных сортов, так и конструирование генно-модифицированных сельскохозяйственных растений, обладающих определенными свойствами. Одним из направлений в области трансгенных растений является придание им свойства устойчивости к гербицидам. В ряде стран в хозяйственной деятельности широко используются трансгенные сорта таких сельскохозяйственных растений, как рапс, хлопчатник, кукуруза, соя, сахарная свекла, которые обладают резистентностью к гербициду глифосату¹. В Республике Беларусь также созданы и зарегистрированы в международной базе BCH (*Biosafety Clearing-House*) трансгенные линии рапса (*Brassica napus* subsp. *oleifera* (Moench) DC.) и картофеля (*Solanum tuberosum* L.), имеющие вышеуказанную устойчивость. Культивирование таких растений позволяет в течение вегетации использовать гербицид, селективно уничтожающий всю сорную растительность без повреждения агрокультуры. Гербицидное свойство глифосата обусловлено мишенью его действия – ферментом 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазой шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот у растений. Кроме воздействия глифосата на растения, в ряде исследований было установлено, что он оказывает угнетающее действие на фитопатогенные грибы на уровне роста мицелия, образования и прорастания спор, синтеза аминокислот, вирулентности [13–17].

В данной работе проводилась *in vitro* оценка чувствительности белорусского изолята *S. sclerotiorum* КК-1 к действующему веществу гербицида «Торнадо» – глифосату (изопропиламинная соль N-фосфонометилглицина). На 5-й день инкубации гриба в контрольной чашке при поверхностном культивировании без добавления гербицида был зарегистрирован максимальный рост мицелия по всей площади среды. Добавление глифосата в минимальной из используемых концентраций (200 мг/л) приводило к ингибированию как роста мицелия, так и формирования покоящихся образований – склероциев, что составило ($66,3 \pm 1,7$) и ($79,4 \pm 7,1$) % соответственно. По мере увеличения дозы гербицида в среде до 1000 мг/л процент ингибирования сохранялся на высоком уровне (табл. 1).

Выявленный фунгицидный эффект глифосата, выражающийся в подавлении образования склероциев, может учитываться при проведении защитных мероприятий от склеротиниоза, поскольку эти пигментированные структуры играют важную роль в циклах заражения и позволяют грибу оставаться жизнеспособным в течение длительного времени при неблагоприятных для роста условиях. В результате впитывания воды из почвы происходит прорастание склероциев с образованием апотециев, в которых формируются аскоспоры, являющиеся источником инфекции.

Основным барьером для распространения инфекции, вызванной *S. sclerotiorum*, служит растительная клеточная стенка, которая на 30 % состоит из пектина. Для преодоления этого барьера склеротиния синтезирует различные типы пектинолитических ферментов, такие как эндо- и экзополигалактуроназы, пектинметилэстераза, пектинлиазы, которые вызывают мацерацию растительных тканей и некроз. Показано, что именно начальное действие пектинолитических ферментов на клеточную стенку инфицированной растительной клетки определяет доступность ее составных компонентов для остальных энзимов [22].

¹Biosafety Clearing-House [Electronic resource]. URL: <http://bch.cbd.int/> (date of access: 21.03.2020) ; ISAAA [Electronic resource]. URL: <http://www.isaaa.org/> (date of access: 21.03.2020).

Таблица 1

Влияние гербицида глифосата («Торнадо») на рост мицелия
и образование склероциев у *S. sclerotiorum* КК-1

Table 1

Effect of glyphosate («Tornado») on mycelial growth
and sclerotial production of *S. sclerotiorum* КК-1

Концентрация глифосата, мг/л	Ингибирование, %	
	Рост мицелия	Образование склероциев
200	66,3 ± 1,7*	79,4 ± 7,1*
400	77,8 ± 4,7*	84,1 ± 3,1*
500	76,3 ± 3,6*	88,6 ± 3,0*
700	76,7 ± 3,8*	83,2 ± 2,8*
900	79,3 ± 1,3*	89,6 ± 4,3*
1000	80,7 ± 3,4*	97,9 ± 3,6*

* $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем.

В результате исследований, направленных на выявление роли полигалактуроназ в инфекционном процессе, было установлено, что продукция полигалактуроназы индуцируется пектином или пектиновыми мономерами, в частности галактуроновой кислотой, и подвергается катаболитной репрессии в присутствии глюкозы [23]. Однако согласно другим работам отдельные пектинолитические ферменты *S. sclerotiorum* не синтезируются синхронно, что определяется конститутивной и индуцибельной экспрессией генов, детерминирующих эти ферменты. Например, у штаммов склеротинии были выявлены экзополигалактуроназа и экзометилполигалактуроназа, синтез которых не регулируется глюкозой или соответствующими субстратами [24].

В целях установления способа регуляции синтеза полигалактуроназы у белорусского изолята *S. sclerotiorum* КК-1 проводилось его культивирование в минимальной солевой среде с добавлением 1 % пектина или 2 % глюкозы. В течение 12-дневного периода инкубации начиная с 3-го дня через определенные промежутки времени выполнялся отбор проб культуральной жидкости, в которой измерялась ферментативная активность. В результате проведенной работы, как показано на рис. 1, полигалактуроназная активность гриба в среде с добавлением пектина достигла максимума на 5-й день культивирования и составила (6,7 ± 1,3) ед./мл. В среде, содержащей в качестве источника углерода только глюкозу, ферментативная активность оставалась практически на одном уровне на протяжении всего периода инкубации и равнялась (1,40 ± 0,26) ед./мл, что указывает на явление катаболитной репрессии.

В развитии инфекционного процесса, вызываемого склеротинией, кроме гидролаз, важное значение имеет секретируемая щавелевая кислота. Несмотря на простую химическую структуру и ограниченное химическое взаимодействие, она, как фактор патогенности, является значимым компонентом молекулярного механизма, участвующим в процессе заражения растений. Корреляция между патогенностью и синтезом оксалата была подтверждена в опытах, где мутанты *S. sclerotiorum*, дефектные по способности его синтезировать, не вызывали заболевания, в то время как ревертанты снова становились вирулентными [4]. Предположительно, существуют три механизма усиления вирулентности с помощью оксалата. Первый механизм основан на том, что некоторые ферменты грибного патогена, выделяемые во время вторжения в ткани растений (например, полигалактуроназа), имеют максимальную активность при низких значениях рН. Второй механизм обусловлен токсичностью оксалата для клеток растений-хозяев, по-видимому, из-за его кислотности, что приводит к ослаблению растения, тем самым способствуя вторжению патогена. Согласно третьему механизму оксалат-анионы хелатируют ионы кальция, которые находятся в клеточной стенке растений. Хотя каждая из перечисленных гипотез имеет свою логику и привлекательность, подтверждающие их данные являются неполными.

Несмотря на то что щавелевая кислота – фактор патогенности склеротинии, было установлено, что штаммы гриба различаются по ее количественному накоплению в условиях *in vivo* и *in vitro* [22]. В целях выявления у изучаемого белорусского изолята способности к образованию и секреции щавелевой кислоты в данной работе проводился качественный анализ изменения рН агаризованной среды культивирования гриба с использованием индикаторного реактива бромфенолового синего, который изменяет окраску с синей на желтую при значениях рН 3,0–4,6. Как показано на рис. 2, на 7-й день культивирования *S. sclerotiorum* КК-1 четко визуализировалось окрашивание среды в желтый цвет, что свидетельствует о секреции щавелевой кислоты.

Исследование динамики секреции щавелевой кислоты, проводимое путем измерения pH-профиля жидкой минимальной солевой среды с добавлением 1 % цитрусового пектина в процессе 12-дневной инкубации гриба, показало, что к 5-му дню культивирования значение pH среды снизилось с 6,0 до 4,0 и достигло 3,5 на 12-й день (рис. 3).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что белорусский изолят склеротинии обладает способностью секретировать щавелевую кислоту, которая, снижая pH, содействует высокой мацерирующей активности, обеспечивающей эффективное разрушение клеточной стенки растений.

При изучении антифунгального потенциала гербицида глифосата в отношении изолята склеротинии нами было установлено, что его действие приводит к подавлению роста мицелия и образования склероциев. В целях выявления реакции *S. sclerotiorum* КК-1 на воздействие гербицида на уровне активности секретирующихся гидролитических ферментов, участвующих в патогенезе, оценивалась полигалактуроназная, α -амилазная и целлюлолитическая активность.

Для оценки α -амилазной и полигалактуроназной активности гриб культивировали в жидкой минимальной солевой среде в присутствии гербицида в диапазоне концентраций действующего вещества 20–1800 мг/л с добавлением цитрусового пектина в качестве индуктора синтеза полигалактуроназы или крахмала, являющегося субстратом для α -амилазы.

Как следует из результатов эксперимента, представленных на рис. 4, отмечается статистически значимое ($p < 0,01$) по сравнению с контрольным вариантом (культивирование гриба в среде без добавления гербицида) снижение α -амилазной активности в отличие от полигалактуроназной активности ($p > 0,05$).

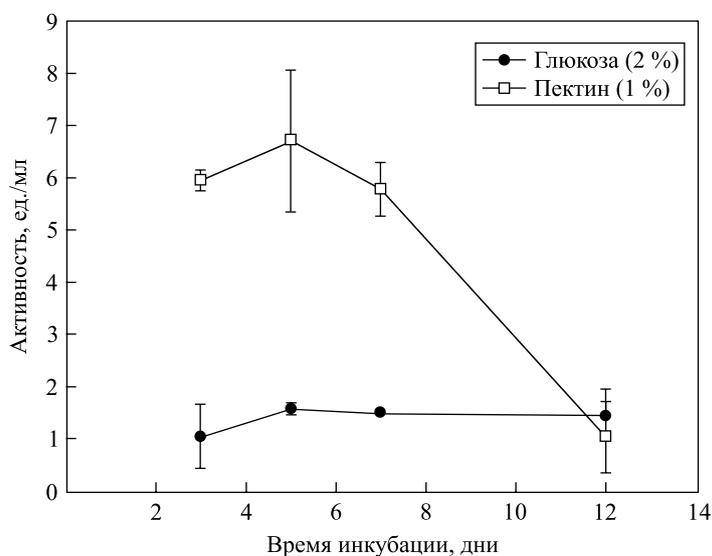


Рис. 1. Продукция полигалактуроназы *S. sclerotiorum* КК-1 при культивировании в минимальной солевой среде с добавлением 1 % цитрусового пектина или 2 % глюкозы

Fig. 1. Expression of polygalacturonase activity by *S. sclerotiorum* КК-1 in minimal salts medium containing 1 % citrus pectin or 2 % glucose



Рис. 2. Секреция щавелевой кислоты изолятом *S. sclerotiorum* КК-1, культивируемым на среде PDA с бромфеноловым синим

Fig. 2. Oxalic acid production of the *S. sclerotiorum* КК-1 isolate on PDA medium amended with bromophenol blue

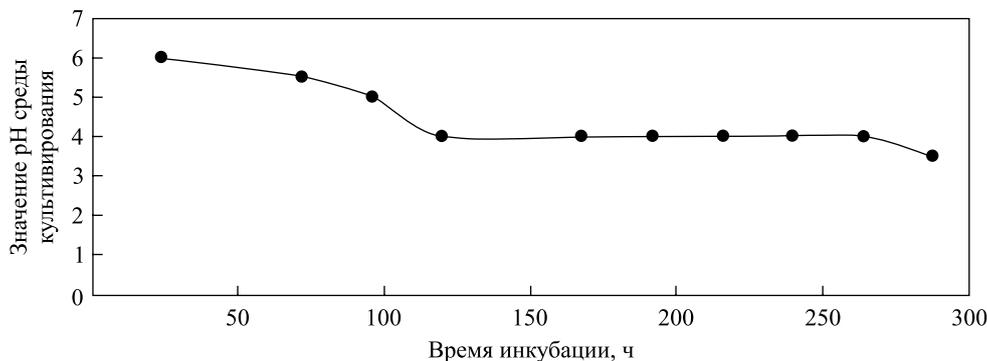


Рис. 3. pH-Профиль минимальной солевой среды культивирования *S. sclerotiorum* КК-1 с добавлением 1 % цитрусового пектина

Fig. 3. The pH of the minimal salts medium containing 1 % citrus pectin after incubation *S. sclerotiorum* КК-1

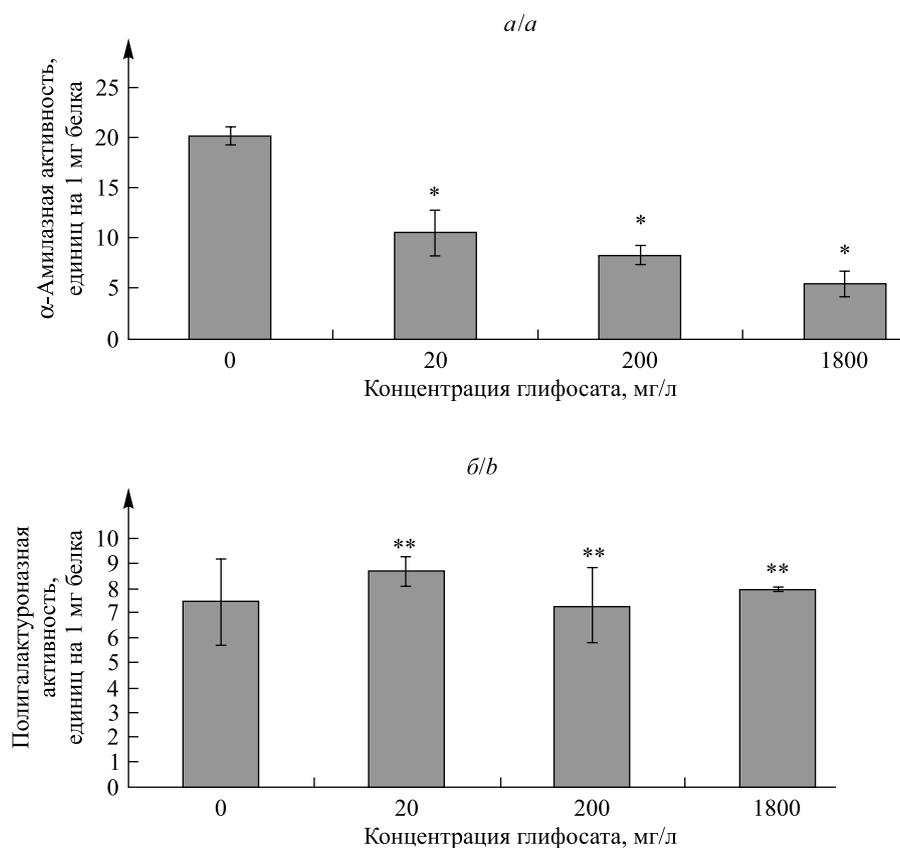


Рис. 4. alpha-Амилазная (а) и полигалактуронозная (б) активность изолята *S. sclerotiorum* КК-1, культивируемого в минимальной солевой среде с добавлением 2 % крахмала или 1 % цитрусового пектина соответственно в присутствии гербицида «Торнадо» (глифосат 20–1800 мг/л): 0 – контрольный образец. Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: * – $p < 0,01$; ** – $p > 0,05$

Fig. 4. alpha-Amylase (a) and polygalacturonase (b) activity of *S. sclerotiorum* КК-1 isolate in minimal salts media with 2 % starch or 1 % citrus pectin and containing herbicide «Tornado» (glyphosate 20–1800 mg/L): 0 – control. The significance of differences was calculated to the control: * – $p < 0.01$; ** – $p > 0.05$

Для выявления влияния глифосата на целлюлолитическую активность исследуемого изолята использовался чашечный метод, который заключался в инкубации гриба на поверхности минимальной агаризованной среды Чапека с добавлением 0,1 % КМЦ в присутствии коммерческого гербицидного препарата «Торнадо» в диапазоне концентраций действующего вещества 20–1800 мг/л. После 5-дневной инкубации при 22 °С для визуализации зон гидролиза КМЦ на поверхность среды наслаивался 0,1 % водный раствор конго красного.

В результате проведенного анализа установлено, что при добавлении в среду культивирования глифосата в дозе до 200 мг/л включительно продукция целлюлазы не ингибировалась, в то время как концентрация гербицида 800 мг/л и выше способствовала полному подавлению синтеза фермента (табл. 2).

Таблица 2

**Продукция целлюлазы *S. sclerotiorum* КК-1
в присутствии гербицида глифосата («Торнадо»)**

Table 2

**Production of *S. sclerotiorum* КК-1 cellulases
in the presence of glyphosate («Tornado»)**

Концентрация глифосата, мг/л	Диаметр зоны гидролиза КМЦ, см
0	2,63 ± 0,29
20	2,56 ± 0,29
100	2,30 ± 0,18
200	2,45 ± 0,28
800	0
1800	0

Заключение

Принимая во внимание полученные данные, можно заключить, что белорусский изолят *S. sclerotiorum* КК-1 проявляет чувствительность к действию гербицида глифосата, которая выражается в подавлении как роста мицелия, так и образования покоящихся структур – склероциев, а также в снижении α -амилазной и целлюлазной активности. Выявленный антифунгальный потенциал гербицида, по всей вероятности, обусловлен его взаимодействием с ключевым ферментом шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазой, что не только приводит к масштабному нарушению формирования морфологических структур гриба, но и подавляет активность его ферментных систем, необходимых для реализации патогенности.

Библиографические ссылки

1. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1994;16(2):93–108. DOI: 10.1080/07060669409500766.
2. Bell JN, Ryder TB, Wingate VP, Bailey JA, Lamb CJ. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a comparable and an incomparable plant-pathogen interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(5):1615–1623. DOI: 10.1128/mcb.6.5.1615.
3. Liang Y, Strelkov SE, Kav NNV. The proteome of liquid sclerotial exudates from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(6):3290–3298. DOI: 10.1021/pr900942w.
4. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1990;37(3):179–191. DOI: 10.1016/0885-5765(90)90010-U.
5. Li R, Rimmer R, Buchwaldt L, Sharpe AG, Seguin-Swartz G, Hegedus DD. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics and Biology*. 2004;41(8):754–765. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.03.002.
6. Bashi ZD, Rimmer SR, Khachatourians GG, Hegedus DD. *Brassica napus* polygalacturonase inhibitor proteins inhibit *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase enzymatic and necrotizing activities and delay symptoms in transgenic plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 2013;59(2):79–86. DOI: 10.1139/cjm-2012-0352.
7. Asoufi H, Hameed KM, Mahasneh A. The cellulase and pectinase activities associated with the virulence of indigenous *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. *The Plant Pathology Journal*. 2007;23(4):233–238. DOI: 10.5423/PPJ.2007.23.4.233.
8. Yajima W, Kav NN. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*. 2006;6(22):5995–6007. DOI: 10.1002/pmic.200600424.

9. Oliveira MB, Barbosa SC, Petrofeza S. Comparative *in vitro* and *in planta* analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(2):1796–1807. DOI: 10.4238/2013.June.6.3.
10. Ellouze O, Mejri M, Smaali I, Limam F, Marzouki MN. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. *Journal of Food Biochemistry*. 2007;31(1):96–107. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00101.x.
11. Abdelmalek IB, Urdaci MC, Ali MB, Denayrolles M, Chaignepain S, Limam F, et al. Structural investigation and homology modeling studies of native and truncated forms of alpha-amylases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;19(11):1306–1318. DOI: 10.4014/jmb.0903.3013.
12. Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch CJr, Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereal* (rye). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2000;32(11–12):1195–1204. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00053-4.
13. Kassaby FY, Hepworth G. Phytophthora cinnamomi: effects of herbicide sonradial growth, sporangial production, inoculum potential and root disease in *Pinus radiata*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987;19(4):437–441. DOI: 10.1016/0038-0717(87)90035-6.
14. Harris D, Grossbard E. Effects of the herbicides gramoxone W and roundup on *Septorianodorum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 1979;73(1):27–33. DOI: 10.1016/S0007-1536(79)80068-6.
15. Anderson JA, Kolmer JA. Rust control in glyphosate tolerant wheat following the application of the herbicide glyphosate. *Plant Disease*. 2005;89(11):1136–1142. DOI: 10.1094/PD-89-1136.
16. Feng PCC, Baley J, Clinton WP, Bunkers GJ, Alibhai MF, Paulitz TC, et al. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(48):17290–17295. DOI: 10.1073/pnas.0508873102.
17. Westerhuis D, Vawdrey LL, Piper R. An *in vitro* study into the effect of glyphosate on *Sclerotium rolfsii*. *Australasian Plant Disease Notes*. 2007;2(1):23–24. DOI: 10.1071/DN07010.
18. Attanayake RN, Carter PA, Jiang D, Del Rio-Mendoza L, Chen W. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology*. 2013;103(7):750–761. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0159-R.
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
20. Досон Р, Эллиот Д, Эллиот У, Джонс М. *Справочник биохимика*. Друза ВЛ, Королева ВН, переводчики. Москва: Мир; 1991. 544 с.
21. Naher N, Shamsi S, Rawshan Ali MD, Nahar MS, Bashar MA. Interrelation of oxalic acid formation with pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing white mold disease of mustard. *Bangladesh Journal of Botany*. 2017;46(3):963–970.
22. Favaron F, Sella L, D'Ovidio R. Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004;17(12):1402–1409. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1402.
23. Fraissinet-Tachet L, Fevre M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology*. 1996;33(1):49–53. DOI: 10.1007/s002849900073.
24. Riou C, Fraissinet-Tachet L, Freyssinet G, Fevre M. Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992;91(3):231–237. DOI: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB05214.X.

References

1. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1994;16(2):93–108. DOI: 10.1080/07060669409500766.
2. Bell JN, Ryder TB, Wingate VP, Bailey JA, Lamb CJ. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a comparable and an incomparable plant-pathogen interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(5):1615–1623. DOI: 10.1128/mcb.6.5.1615.
3. Liang Y, Strelkov SE, Kav NNV. The proteome of liquid sclerotial exudates from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(6):3290–3298. DOI: 10.1021/pr900942w.
4. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1990;37(3):179–191. DOI: 10.1016/0885-5765(90)90010-U.
5. Li R, Rimmer R, Buchwaldt L, Sharpe AG, Seguin-Swartz G, Hegedus DD. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics and Biology*. 2004;41(8):754–765. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.03.002.
6. Bashi ZD, Rimmer SR, Khachatourians GG, Hegedus DD. *Brassica napus* polygalacturonase inhibitor proteins inhibit *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase enzymatic and necrotizing activities and delay symptoms in transgenic plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 2013;59(2):79–86. DOI: 10.1139/cjm-2012-0352.
7. Asoufi H, Hameed KM, Mahasneh A. The cellulase and pectinase activities associated with the virulence of indigenous *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. *The Plant Pathology Journal*. 2007;23(4):233–238. DOI: 10.5423/PPJ.2007.23.4.233.
8. Yajima W, Kav NN. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*. 2006;6(22):5995–6007. DOI: 10.1002/pmic.200600424.
9. Oliveira MB, Barbosa SC, Petrofeza S. Comparative *in vitro* and *in planta* analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(2):1796–1807. DOI: 10.4238/2013.June.6.3.
10. Ellouze O, Mejri M, Smaali I, Limam F, Marzouki MN. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. *Journal of Food Biochemistry*. 2007;31(1):96–107. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00101.x.
11. Abdelmalek IB, Urdaci MC, Ali MB, Denayrolles M, Chaignepain S, Limam F, et al. Structural investigation and homology modeling studies of native and truncated forms of alpha-amylases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;19(11):1306–1318. DOI: 10.4014/jmb.0903.3013.
12. Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch CJr, Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereal* (rye). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2000;32(11–12):1195–1204. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00053-4.

13. Kassaby FY, Hepworth G. Phytophthora cinnamomi: effects of herbicide sonradial growth, sporangial production, inoculum potential and root disease in *Pinus radiata*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987;19(4):437–441. DOI: 10.1016/0038-0717(87)90035-6.
14. Harris D, Grossbard E. Effects of the herbicides gramoxone *W* and roundup on *Septorianodorum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 1979;73(1):27–33. DOI: 10.1016/S0007-1536(79)80068-6.
15. Anderson JA, Kolmer JA. Rust control in glyphosate tolerant wheat following the application of the herbicide glyphosate. *Plant Disease*. 2005;89(11):1136–1142. DOI: 10.1094/PD-89-1136.
16. Feng PCC, Baley J, Clinton WP, Bunkers GJ, Alibhai MF, Paulitz TC, et al. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(48):17290–17295. DOI: 10.1073/pnas.0508873102.
17. Westerhuis D, Vawdrey LL, Piper R. An *in vitro* study into the effect of glyphosate on *Sclerotium rolfsii*. *Australasian Plant Disease Notes*. 2007;2(1):23–24. DOI: 10.1071/DN07010.
18. Attanayake RN, Carter PA, Jiang D, Del Río-Mendoza L, Chen W. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology*. 2013;103(7):750–761. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0159-R.
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
20. Dawson R, Elliot D, Elliot U, Dzhons M. *Spravochnik biokhimiya* [Biochemist's handbook]. Druitsa VL, Koroleva VN, translators. Moscow: Mir; 1991. 544 p. Russian.
21. Naher N, Shamsi S, Rawshan Ali MD, Nahar MS, Bashar MA. Interrelation of oxalic acid formation with pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing white mold disease of mustard. *Bangladesh Journal of Botany*. 2017;46(3):963–970.
22. Favaron F, Sella L, D'Ovidio R. Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004;17(12):1402–1409. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1402.
23. Fraissinet-Tachet L, Fevre M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology*. 1996;33(1):49–53. DOI: 10.1007/s002849900073.
24. Riou C, Fraissinet-Tachet L, Freyssinet G, Fevre M. Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992;91(3):231–237. DOI: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB05214.X.

Статья поступила в редколлегию 05.06.2020.
Received by editorial board 05.06.2020.