МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 1, с. 59–66

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 633.11: 632. 484

ФУНГИСТАТИЧЕСКАЯ И ИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ В ПАТОСИСТЕМЕ “ПШЕНИЦА – *COCHLIOBOLUS SATIVUS*”

© 2021 г. Э. В. Попова[1,*], Н. М. Коваленко[1,]**

[1] *Всероссийский НИИ защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия*

**e-mail: elzavpopova@mail.ru*

***e-mail: nadyakov@mail.ru*

Поступила в редакцию 13.04.2020 г.
После доработки 15.08.2020 г.
Принята к публикации 19.11.2020 г.

Проведено сравнительное изучение фунгистатической и индуцирующей болезнеустойчивость активностей салициловой (СК), бензойной (БК) и парагидроксибензойной кислот (пГБК) в патосистеме “пшеница – *Cochliobolus sativus*”. Показано, что экзогенные СК и БК повышают устойчивость растений пшеницы к темно-бурой пятнистости и в концентрации 5 мМ демонстрируют наибольшую индуцирующую активность. Влияние пГБК на устойчивость пшеницы к этому заболеванию менее выражено. Установлено, что иммуномодулирующий эффект экзогенных фенольных соединений связан с их способностью ингибировать каталазу при инфицировании растений, что приводит к накоплению перекиси водорода, необходимой для обезвреживания фитопатогена в тканях и индуцирования защитных реакций клеток. При оценке фунгистатической активности СК, БК и пГБК выявлена прямая связь между концентрацией бензойных кислот и степенью ингибирования роста мицелия гриба *C. sativus*. Полное подавление роста патогена в течение семи суток культивирования наблюдалось при концентрации в среде СК и БК 10 мМ. Показано, что пГБК в отличие от СК и БК не обладает фунгистатическим эффектом в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ. С повышением концентрации до 60 мМ, пГБК сдерживает рост гриба на 85.7% на 7-е сутки культивирования. Полное ингибирование роста и развития мицелия *C. sativus* наблюдается при концентрации пГБК в среде 100 мМ, что в 10 раз превышает концентрацию СК и БК для получения такого же эффекта.

Ключевые слова: бензойная кислота, индуцированная болезнеустойчивость, пара-гидроксибензойная кислота, пшеница, салициловая кислота, темно-бурая пятнистость, фунгистатическая активность, *Cochliobolus sativus*

DOI: 10.31857/S0026364821010104

ВВЕДЕНИЕ

Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые грибами, наносят существенный ущерб урожаю и приводят к большим экономическим потерям. Наиболее распространенной болезнью зерновых культур является темно-бурая пятнистость, возбудителем которой является *Cochliobolus sativus* (S. Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur (Teplyakov, 2003; Gultyaeva at al., 2016).

Один из путей борьбы с заболеваниями заключается в выявлении возможных механизмов индуцирования устойчивости растений к патогенам, приводящих к активации фитоиммунных реакций и к формированию у растений устойчивости к возбудителям болезней (Tyuterev, 2014). Системная приобретенная устойчивость (СПУ) считается наиболее агрономически значимым типом иммунитета растений (Henry et al., 2013) и может запускаться сигнальными молекулами.

Общепризнано, что салициловая кислота (СК) является одним из ключевых компонентов защитной сигнальной системы, участвующей в формировании СПУ (Wang, Li, 2006; Vasyukova, Ozeretskovskaya, 2007; Chen et al., 2009; Vlot et al., 2009; Kumar, 2014; Janda, 2014). Маркерами развития этого процесса являются связанные с патогенезом PR-белки, а СК выступает в качестве сигнала в индукции их генов (Zhang et al., 2010; Tarchevsky et al., 2010).

Во время атаки патогенов СК быстро накапливается в клетках растений, индуцируя программируемую клеточную смерть вокруг пораженного участка или вызывая реакцию сверхчувствительности. Кроме того, СК также способствует формированию пролонгированной СПУ к широкому спектру последующих инфекций (Zurbriggen et al., 2010; Tarchevsky et al., 2010). Роль СК в регуляции защитных реакций во взаимодействиях растений и микробов описана в обзорах (Dempsey, Klessig, 2017; Klessig et al., 2018).

По литературным данным, кроме салициловой кислоты в механизме иммунитета возможно участие других близких по структуре кислот, которые являются естественными метаболитами фенольного обмена растений, образующимися в заключительных реакциях фенилпропаноидного пути (Senaratna et al., 2003; Catinot et al., 2008; Sircar, Mitra, 2009; Wang et al., 2011). Среди них можно выделить бензойную кислоту (БК), являющуюся предшественником салициловой кислоты, и парагидроксибензойную кислоту (пГБК), представляющую собой структурный аналог СК.

Физиологическая активность БК и пГБК и их возможное участие в защитных реакциях растений мало изучены (Horvath et al., 2007). Есть сообщения о том, что зкзогенная БК повышает устойчивость риса к гельминтоспориозу [возбудитель – *Bipolaris oryzae* Shoem. (= *Helminthosprium oryzae* Br. et Haan)], а также устойчивость растений какао к базидомицету *Ceratobasidium theobromae* (= *Oncobasidium theobromae*, *Thanatephorus theobromae*) (Shabana et al., 2008; Zakariyya et al., 2018). Индуцирующая способность пГБК практически не изучена. Есть свидетельства, что фенольные соединения растений обладают антимикробной активностью, и при определенных условиях могут выполнять защитную роль (Hayat, Ahmad, 2007; Volynets, 2013). Накопление фенольных веществ в местах локализации патогена может замедлять рост патогенного микроорганизма, действуя как антимикробное соединение или путем некроза клетки (Amborabé et al., 2002; Chong et al., 2012; Vio-Michaelis et al., 2012).

Имея в виду механизмы, лежащие в основе регуляции защитных реакций растений наиболее изученной салициловой кислотой, можно говорить о ее двойной роли в повышении устойчивости. По некоторым данным (Sorahinobar et al., 2015), обработка семян СК повышала устойчивость растений пшеницы к различным видам *Fusarium* не только благодаря развитию индуцированной устойчивости, но и в результате прямого действия СК на рост мицелия и прорастания конидий *Fusarium graminearum*, *F. pesudograminearum* и *F. oxysporum*. Нами ранее показано, что обработка экзогенной СК повышает устойчивость пшеницы к возбудителю темно-бурой пятнистости *Cochliobolus sativus* (Popova at al., 2017).

В настоящее время отсутствует информация о влиянии БК, СК и ее структурного аналога пГБК на рост мицелия *C. sativus*, а также об участии БК и пГБК в повышении устойчивости пшеницы к темно-бурой пятнистости. Цель настоящей работы состояла в оценке фунгистатической и индуцирующей болезнеустойчивость активности СК, БК и пГБК при формировании взаимоотношений между растением-хозяином (*Triticum aestivum* L.) и гемибиотрофом *Cochliobolus sativus*.

Актуальность изучения биологических свойств экзогенных производных бензойных кислот определяется необходимостью создания дополнительных возможностей для целенаправленного использования этих физиологически активных веществ в регуляции развития растений и их адаптации к биотическим стрессам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на восприимчивом к болезни сорте пшеницы Саратовская 29. В работе использовали изолят *C. sativus*, выделенный с листьев пшеницы сорта Галина, собранных в Ленинградской обл. в 2019 г. и числящихся в рабочей коллекции под номером Sat 19.

При подборе концентраций салициловой и бензойной (ЛенРеактив, Россия), а также п-гидроксибензойной (Hebei G Biot Go, Китай) кислот для изучения их способности индуцировать устойчивость пшеницы к *C. sativus* была принята во внимание ранее установленная нами пороговая концентрация СК (8 мМ), выше которой проявляется ее фитотоксичность и происходит подавление ростовых процессов растений (Popova at al., 2017).

Для оценки индуцирующей способности исследуемых веществ 7-дневные проростки пшеницы сорта Саратовская 29 опрыскивали 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 мМ р-рами СК, БК, пГБК. Через 24 ч проводили заражение проростков суспензией спор *C. sativus* (4000 спор/мл).

Оценку иммуномодулирующей активности бензойных кислот проводили методом отделенных листьев (Mikhaylova et al., 2012). Эффективность исследуемых образцов оценивали при инокуляции *C. sativus* на 4-е сутки после заражения по интенсивности развития болезни (процент поражения площади листа). Контрольные растения обрабатывали водой.

Определение активности каталазы в листьях пшеницы проводили по методу А.Н. Баха и А.И. Опарина (Novikov, Tarazanova, 2012). Активность каталазы выражали в мккат в расчете на 1 г растительной массы согласно Международной системе единиц (СИ). Варианты включали растения без заражения и обработок (контроль); растения, обработанные 5 мМ растворами бензойных кислот и инфицированные *C. sativus* на 1, 2, 3 и 4-е сутки после заражения. Для определения активности фермента навеску из 10 листьев растирали в 0.05 М фосфатном буфере (pH 6.2) в соотношении 1: 5, экстрагировали 30 минут при 4°С, затем центрифугировали 10 мин при 8000 g на центрифуге Eppendorf 5415R (США).

Прямое фунгистатическое действие исследуемых кислот изучалось in vitro методом агаровых блоков (Bilay, 1982). В стерильные чашки Петри разливали охлажденную до 45°С агаризованную среду Чапека с добавлением в нее испытуемых веществ в соответствующей концентрации (0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 60, 100 мМ). В качестве контроля служили чашки с агаризованной средой Чапека

без испытуемых веществ. После застывания среды на ее поверхность помещали диски мицелия диаметром 6 мм, вырезанные стерильным сверлом из 10-суточных мицелиальных газонов гриба *C. sativus*. Чашки инкубировали в темноте при 25°С. Измерение диаметров грибных колоний проводили на 3, 5 и 7-е сутки культивирования и оценивали фунгистатическое действие испытуемых веществ по формуле Эббота (Methodical recommendations, 1990): П = Дк – Доп/ Дк × 100, где П – подавление роста гриба по сравнению с контролем, %; Дк – диаметр колонии гриба в контроле, мм; Доп – диаметр колонии гриба в опыте, мм.

Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики (на основе стандартных ошибок средних ± SEM, 95%-го доверительного интервала и *t*-критерия Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки действия БК, СК и пГБК на устойчивость пшеницы к возбудителю темно-бурой пятнистости представлены в табл. 1. Выявлена зависимость иммуномодулирующего действия бензойных кислот на устойчивость пшеницы к *C. sativus* от их концентрации. Обработка растений СК в пределах концентраций 0.2–2.0 мМ, снижала развитие болезни на 15–20% (табл. 1). С увеличением концентрации до 5 мМ значительно повышается индуцирующая активность СК, что выражается в уменьшении пораженности листьев пшеницы микромицетом на 30% по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с данными (Sari, Etebarian, 2009), которые выявили зависимость эффективности СК как индуктора устойчивости от концентрации на примере заражения пшеницы аскомицетом *Gaeumannomyces graminis*.

Иммуномодулирующая активность БК, близкая по эффективности к СК, проявилась в снижении поражения листьев растений на 10–25% по отношению к контролю. В пределах концентраций 0.2–5.0 мМ пГБК значительно уступала СК и БК по способности индуцировать болезнеустойчивость. В растениях, обработанных этой кислотой, уменьшение развития болезни составило 5–10% по отношению к контролю.

В настоящее время ряд исследователей (Plotnikova et al., 2009; Maksimov et al., 2011; Yarullina et al., 2011) индуцирующий эффект экзогенной СК в повышении устойчивости пшеницы к бурой ржавчине и септориозу, картофеля к фитофторозу связывают с ее способностью ингибировать каталазу, детоксицирующую H_2O_2, что и приводит к накоплению перекиси. Это вещество рассматривается как важный сигнальный посредник при индуцировании устойчивости растений к действию патогенов. Связь между концентрацией СК и количеством генерированной H_2O_2 изучали Rao et al. (1997). Они показали, что в листьях *Arabidopsis thaliana*, обработанных 1 и 5 мМ СК, через 8 ч повысился уровень H_2O_2 на 59 и 194% соответственно по сравнению с контрольными листьями. При этом генерация H_2O_2 сопровождалась инактивацией каталазы – фермента, разлагающего перекись.

Таблица 1. Влияние экзогенных бензойных кислот на устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости (возбудитель – *Cochliobolus sativus*)

Вариант	Концентрация кислот, мМ	Пораженность листьев, % $НСР_{0.05}$ = 4.5
Контроль		80
СК	0.2	60
” ”	0.5	60
” ”	1.0	65
” ”	2.0	65
” ”	5.0	50
БК	0.2	60
” ”	0.5	65
” ”	1.0	70
” ”	2.0	60
” ”	5.0	55
пГБК	0.2	80
” ”	0.5	75
” ”	1.0	70
” ”	2.0	70
” ”	5.0	75

Участие СК в формировании иммунного статуса растений к настоящему времени связывают со следующими ее свойствами (Chen et al., 1993; Vlot et al., 2009). СК распознается клеточными рецепторами, что приводит к репрограммированию экспрессии генов и к синтезу защитных белков. Идентифицированы четыре SABP белка, которые связывают СК. Первым идентифицированным SABP белком была каталаза. Его деградирующая H_2O_2 активность специфически ингибируется СК или биологически активными аналогами СК. С использованием молекулярных моделей H_2O_2, салициловой и янтарной кислот И.А. Тарчевский (Tarchevsky, 2002) установил, что близость расстояний между водородными атомами гидроксильных групп во всех трех типах молекул (у перекиси водорода – 2.62 А, салицилата – 2.56 А, у одной из возможных конформаций сукцината – 2.64 А) позволяет предположить, что эти кислоты могут связываться с активным центром каталазы, выступая в роли конкурентных ингибиторов в реакции разложения перекиси водорода.

В этой связи нами проведено изучение влияния бензойных кислот на активность каталазы в растениях пшеницы, инфицированных возбудителем

Таблица 2. Активность каталазы в листьях пшеницы, обработанных СК, БК и пГБК и инфицированных *Cochliobolus sativus* (в мккат в расчете на 1 г растительной массы)

Вариант	Активность каталазы в листьях пшеницы				
	сутки после заражения листьев пшеницы *C. sativus*				
	0	1	2	3	4
	26.5 ± 0.9	25.4 ± 0.5	24.8 ± 0.8	24.5 ± 0.4	25.0 ± 0.5
Контроль + заражение	24.6 ± 0.8	48.5 ± 0.8	38.2 ± 0.5	32.0 ± 0.4	28.4 ± 0.4
СК + заражение	24.3 ± 0.6	28.3 ± 0.5	30.0 ± 0.3	38.0 ± 0.5	36.2 ± 0.5
БК + заражение	25.0 ± 0.7	30.3 ± 0.5	31.2 ± 0.4	38.5 ± 0.5	36.0 ± 0.7
пГБК + заражение	23.8 ± 0.5	34.0 ± 0.6	33.0 ± 0.7	39.3 ± 0.8	38.5 ± 0.6

темно-бурой пятнистости (табл. 2). Полученные данные показали, что процесс заражения растений пшеницы возбудителем темно-бурой пятнистости сопровождался увеличением активности каталазы относительно контрольных незараженных растений на всем протяжении опыта. Резкий подъем активности каталазы в листьях пшеницы наблюдается на первые сутки после заражения патогеном. К моменту сильного развития болезни (4 сутки), когда вся ткань листа была некротизирована, активность фермента постепенно снижалась. Развитие болезни в этот период визуально проявлялось в виде коричневых пятен на листьях.

В обработанных 5 мМ растворами СК, БК и пГБК и инфицированных проростках пшеницы активность каталазы на первые сутки после заражения в 1.4–1.7 раза была ниже, чем в зараженных контрольных растениях. Причем ингибирующее действие СК и БК на активность каталазы было выше, чем пГБК.

Как известно, начальный этап инфицирования растений сопровождается активацией системы генерации АФК, которые вызывают окислительный стресс и гибель клеток (Grant, Loake, 2000; Vlot et al., 2009; Zurbriggen et al., 2010; Yarullina et al., 2011). Уменьшение каталазной активности в клетках растений на первой стадии патогенеза – необходимое условие сохранения высокого количества H_2O_2, требующегося для обезвреживания фитопатогена в тканях и формирования устойчивости (Hung et al., 2006; Vlot et al., 2009; Yarullina et al., 2011).

Таким образом, снижение каталазной активности в обработанных бензойными кислотами растениях ведет к повышению количества H_2O_2, необходимого для обезвреживания фитопатогена в тканях, включая непосредственное уничтожение вторгающегося патогена и/или активацию сшивания и лигнификации клеточной стенки, что укрепляет клеточную стенку и помогает сдерживать его распространение. При этом также происходит включение защитных реакций, ведущих к развитию индуцированной устойчивости в растениях пшеницы к темно-бурой пятнистости, что проявляется в снижении развития болезни на 25–30% по отношению к контролю при обработке СК и БК. ПГБК показала небольшую индуцирующую активность, что подтверждается снижением пораженности листьев пшеницы *C. sativus* всего на 5% (табл. 1).

Возможно, что наблюдаемый небольшой индуцирующий эффект пГБК связан с ее меньшим ингибирующим влиянием на активность каталазы, что ведет к появлению меньшего количества пероксида, который является важным сигнальным посредником при формировании устойчивости растений.

Результаты оценки in vitro влияния СК, БК и пГБК на линейный рост возбудителя темно-бурой пятнистости пшеницы *C. sativus* представлены в табл. 3. Установлена прямая зависимость фунгистатической активности от концентрации кислот в питательной среде. В низких концентрациях (0.5–2 мМ) СК не оказывает влияние на линейный рост мицелия гриба. С повышением концентрации в питательной среде до 5 мМ СК ингибирует рост мицелия патогена на –21.4–27.3% на 5 и 7-е сутки культивирования. Только при концентрации 10 мМ салициловая кислота полностью подавляет линейный рост мицелия *C. sativus* (табл. 3).

В диапазоне концентраций 0.5–5 мМ БК практически не обладает активностью (табл. 3). Прямой фунгистатический эффект для БК был получен лишь при концентрации 10 мМ в среде, когда в течение семи суток культивирования полностью подавлялся рост мицелия гриба. ПГБК, в отличие от СК и БК, даже при вдвое повышенной концентрации (20 мМ) не оказывает существенного влияния на рост мицелия патогена. Лишь с повышением концентрации до 60 мМ в среде пГБК сдерживала рост гриба на 85.7% на 7-е сутки его культивирования. Полное подавление развития мицелия *C. sativus* наблюдалось при концентрации пГБК в среде при 100 мМ.

Полученные результаты по фунгистатической активности СК по отношению к аскомицету *C. sativus* согласуются с литературными данными, свидетельствующими об ингибирующем воздействии СК на линейный рост различных патогенов. Например, о значительном влиянии СК при концентрациях 2–8 мМ на мицелиальный рост *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina*

Таблица 3. Влияние СК, БК и пГБК на линейный рост мицелия *Cochliobolus sativus*

Вариант	Концентрация, мМ	Ингибирование линейного роста мицелия в процессе культивирования, %					
		3-и сутки		5-е сутки		7-е сутки	
		Д, мм	%	Д, мм	%	Д, мм	%
Контроль		23.0 ± 0.3		55.0 ± 2.3		70.0 ± 3.5	
СК	0.5	23.0 ± 0.2	0	56.0 ± 2.5	+1.8	70.0 ± 2.0	0
	1	23.5 ± 0.25	+3.2	56.5 ± 2.8	+2.8	70.0 ± 2.5	0
	2	23.0 ± 0.2	0	52.0 ± 2.3	5.4	65.0 ± 2.0	7.1
	5	22.0 ± 0.3	4.3	40.0 ± 2.5	27.3	55.0 ± 2.0	21.4
	7	20.0 ± 0.3	13.0	35.0 ± 2.5	36.4	28 ± 2.5	60.0
	10		100		100		100
БК	0.5	23.0 ± 0.15	0	55.0 ± 2.0	0	70.0 ± 2.5	0
	1	22.5 ± 0.2	2.2	52.0 ± 2.5	4.5	65 ± 2.0	7.1
	2	22.0 ± 0.2	4.3	52.0 ± 2.5	5.4	65.0 ± 2.0	7.1
	5	21.0 ± 0.3	8.7	50.0 ± 2.0	9.1	60.0 ± 1.5	14.3
	7	18.5 ± 0.2	19.6	35.0 ± 1.5	36.4	42.0 ± 2.0	40.0
	10		100		100		100
пГБК	0.5	23.0 ± 0.3	0	55.0 ± 2.3	0	70.0 ± 2.5	0
	1	22.5 ± 0.25	2.1	55.0 ± 2.5	0	70.0 ± 2.5	0
	2	20.0 ± 0.2	13.0	54.0 ± 3.0	1.8	70.0 ± 2.5	0
	5	23.0 ± 0.3	0	55.0 ± 2.0	0	65.0 ± 2.0	7.1
	7	20.0 ± 0.25	13.0	50.0 ± 1.5	9.0	63.5 ± 2.0	9.3
	10	21.0 ± 0.2	8.7	52.5 ± 2.0	4.5	65.0 ± 2.0	7.1
	20	15.0 ± 2.0	34.8	30.0 ± 1.5	45.9	37.5 ± 0.4	46.4
	30	15.0 ± 0.15	34.8	25.0 ± 1.0	54.5	22.5 ± 0.5	68.6
	60	11.0 ± 0.1	52.5	10.0 ± 0.5	81.8	10.0 ± 0.5	85.7
	100		100		100	9.0 ± 0.2	87.1

phaseolina, выделенных из корней огурца на 7-е сутки культивирования (Elwakil et al., 2015). Салициловая кислота является эффективным ингибитором линейного роста *Botrytis fabae* in vitro (Aldesuquy et al., 2015), *B. cinerea* (Dieryckx, et al., 2015) и *Fusarium oxysporum* (Sorahinobar et al., 2015). В концентрации 10 мМ СК полностью подавляет линейный рост *Rhizoctonia solani* и *Macrophomina phasolina* – возбудителей, вызывающих болезни растений подсолнечника (Abd El-Hai et al., 2009). По данным Qi (2012) СК в концентрации 3–20 мМ оказывает ингибирующее действие на рост мицелия *Fusarium graminearum*.

Эффективность фунгистатического действия БК на линейный рост мицелия *Cochliobolus sativus* была аналогична СК. Полное подавление роста мицелия гриба происходило при концентрации БК в среде 10 мМ, как и для СК. Полученные результаты согласуются с данными Shabana et al. (2008) и Shukla, Dwivedi (2013), которые продемонстрировали эффективное ингибирующее действие бензойной и салициловой кислот на рост *Bipolaris oryzae*, *F. oxysporum* и *Botrytis cinerea* при 9 мМ.

В опыте с пГБК полное подавление развития мицелия *Cochliobolus sativus* наблюдалось лишь при концентрации 100 мМ, что в 10 раз превышает концентрацию СК и БК для получения такого же эффекта.

Большое количество исследований свидетельствует о том, что фенольные соединения растений являются потенциально токсичными веществами для фитопатогенных грибов и обладают противогрибковой, антибактериальной и противовирусной активностью, а при определенных условиях могут выполнять защитную роль (Hayat, Ahmad, 2007; Volynets, 2013). Тем не менее, механизмы антимикробного действия фенольных соединений остаются на сегодняшний день не достаточно изученными. Согласно литературным данным предполагается несколько механизмов, которые потенциально могут напрямую препятствовать росту грибов. Так, по данным Dieryckx et al. (2015) ингибирование роста *Botrytis* под действием СК и ее производных происходит в результате нарушения митохондриального дыхания, целостности клеточной стенки гриба, а также увеличения накопления АФК, токсичного для роста и развития гри-

ба. В результате изучения влияния СК на рост мицелия *Eutypa lata* было установлено, что СК ведет себя как разобщающий агент, приводя к нарушению трансмембранного градиента pH через плазмалемму и органеллы мембран, и напрямую влияет на дыхание клеток. Специфическое связывание СК с белком, представляющим собой каталазу, уменьшает активность фермента, способствуя накоплению H_2O_2, который токсичен для многих функций клеток гриба (Amborabé et al., 2002).

Эти данные позволяют предположить, что при ингибировании роста мицелия гриба *C. sativus* изученные бензойные кислоты могут быть вовлечены во все указанные выше механизмы.

Как показали наши исследования, для обеспечения фунгистатического эффекта в среде должны быть достаточно высокие концентрации бензойных кислот. Так, СК и БК полностью подавляет рост гриба при концентрации 10 мМ в среде, а пГБК – при 100 мМ.

На основании вышеизложенного можно предположить, что салициловая и бензойная кислоты повышают устойчивость растений пшеницы к *C. sativus* не только как индукторы устойчивости, но и могут оказывать прямое действие на рост мицелия гриба.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе дана сравнительная оценка фунгистатической активности СК, БК и пГБК, а также их способности индуцировать устойчивость к возбудителю в патосистеме “пшеница – *C. sativus*”. Показано, что экзогенные салициловая и бензойная кислоты в диапазоне концентраций 0.2–5.0 мМ повышают устойчивость растений пшеницы к возбудителю темно-бурой пятнистости и их индуцирующая эффективность коррелирует с концентрацией. Наибольшую иммуномодулирующую активность СК и БК демонстрируют при концентрации 5 мМ. В диапазоне изученных концентраций 0.2–5.0 мМ пГБК как индуктор устойчивости менее эффективна.

Продемонстрирован эффект экзогенных СК, БК и пГБК в повышении устойчивости растений пшеницы к *C. sativus*, обусловленный их способностью ингибировать каталазу при инфицировании растений. Этот процесс приводит к накоплению пероксида, требующегося для обезвреживания фитопатогена в тканях, а также для индуцирования защитных реакций клеток.

Выявлена прямая связь между концентрацией бензойных кислот и степенью ингибирования роста мицелия гриба *C. sativus.* СК, БК в концентрации 0.5–7.0 мМ практически не влияют на рост мицелия в течение семи суток культивирования. Увеличение концентрации веществ до 10 мМ ведет к 100%-му подавлению линейного роста мицелия гриба *C. sativus.* В отличие от СК и БК пГБК не обладает фунгистатическими свойствами вплоть до концентрации 10 мМ. Полное ингибирование роста и развития мицелия патогена наблюдалось при концентрации пГБК в среде 100 мМ, что в 10 раз превышает концентрацию СК и БК для получения такого же эффекта. Проведенные исследования показали, что в дополнение к своей роли в качестве индукторов болезнеустойчивости экзогенные СК и БК могут препятствовать колонизации тканей растений *C. sativus*, проявляя фунгистатическую активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Abd El-Hai K.M., El-Metwally M.A., El-Baz S.M. et al. The use of antioxidants and microelements for controlling damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and charcoal rot caused by *Macrophomina phasoliana* on sun flower. Plant Pathol J. 2009. V. 8. P. 79–89. https://doi.org/10.3923/ppj.2009.79.89

Aldesuquy H., Baka Z., Alazab N. Shikimic and salicylic acids induced resistance in Faba Bean plants against Chocolate Spot Disease. J. Plant Pathol. Microb. 2015. V. 6. (257). P. 2–8. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000257

Amborabé B.E., Fleurat-Lessard P., Chollet J.F. et al. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. Plant Physiol. Biochem. 2002. V. 40. P. 1051–1060.

Bilay V.I. Methods of experimental mycology. Naukova Dumka, Kiev, 1982 (in Russ.).

Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E. et al. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. FEBS Lett. 2008. V. 582. P. 473–478. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.12.039

Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science. 1993. V. 262. P. 1883–1886. https://doi.org/10.1126/science.8266079

Chen Z., Zheng Z., Huang J. et al. Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signal. Behav. 2009. V. 4. P. 493–496. https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8392

Chong K., Markus A., Rossall S. The susceptibility of different varieties of oil palm seedlings to *Ganoderma boninense* infection. Pak. J. Bot. 2012. V. 44. P. 2001–2004.

Dempsey D.M.A., Klessig D.F. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? BMC Biol. 2017. V. 15. (1). P. 15–23. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0364-8

Dieryckx C., Gaudin V., Dupuy J. et al. Beyond plant defense: insights on the potential of salicylic and methylsalicylic acid to contain growth of the phytopathogen *Botrytis cinerea* Front Plant Sci. 2015. V. 6. P. 859. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00859

Elwakil M.A., El-Metwally M.A., Elsherbiny A. et al. Enhancing systemic acquired resistance in cucumber to control root rot and wilt diseases with rReference to yield and quality. Plant Pathology J. 2015. V. 14 (4). P. 223–233. https://doi.org/10.3923/PPJ.2015.223.233

Grant J.J., Loake G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiol. 2000. V. 124 (1) P. 21–29. https://doi.org/10.1104/pp.124.1.21

Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Shipilova N.P. et al. Phytosanitary monitoring of wheat diseases in the Northwest region in 2015. Plant protection and quarantine. 2016. V. 4. P. 29–31 (in Russ).

Hayat S., Ahmad A. Salicylic acid: a plant hormone. Springer, Dordrecht, 2007.

Henry E., Yadeta K.A., Coaker G. Recognition of bacterial plant pathogens: Local, systemic and transgenerational immunity. New Phytol. 2013. V. 199. P. 808–815.

Horvath E., Pal M., Szalai G. et al. Exogenous 4-ydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. Biol. Plant. 2007. V. 51. P. 480–487. https://doi.org/10.1007/s10535-007-0101-1

Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. Physiol. Plant. 2006. V. 127 (2). P. 293–303. https://doi.org/. 1399-3054.2006.00662.x https://doi.org/10.1111/j

Janda T., Gondor O.K., Yordanova R. et al. Salicylic acid and photosynthesis: signaling and effects. Acta Physiol. Plant. 2014. V. 36 (10). P. 2537–2546.

Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.M.A. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. Mol. Plant-Microbe Interact. 2018. V. 31. P. 871–888. https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR

Kumar D. Salicylic acid signaling in disease resistance. Plant Sci. 2014. V. 228. P. 127–124. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014

Maksimov I.V., Sorokan I.V., Cherepanova E.A. et al. The effect of salicylic and jasmonic acids on the components of the pro / antioxidant system in potato plants during late blight . Plant Physiol. 2011. V. 58 (2). P. 243–251.

Methodical recommendations for testing chemicals for fungicidal activity. Cherkasy, 1990 (in Russ.).

Mikhaylova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Laboratory methods of cultivation of wheat tan spot causal agent *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat. SPb., 2012 (in Russ.).

Novikov N.N., Tarazanova T.V. Laboratory workshop on plant biochemistry: textbook. Publishing house of the Russian State Agricultural University, Moscow, 2012 (in Russ.).

Plotnikova L.Ya., Shtubei T.Yu. Effect of salicylic and succinic acids on the cytophysiological reactions of wheat infected with brown rust. Cytology. 2009. V. 51 (1). P. 43–53.

Popova E.V., Domnina N.S., Kovalenko N.M. et al. The effect of salicylic acid and vanilline on wheat resistance to *Cochliobolus sativus*. Mikologiya i fitopatologiya. 2017. V. 51 (3). P. 178–182 (in Russ.).

Qi P.F. Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. Fungal Biol. 2012. V. 6. P. 413–426. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.01.001

Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. et al. Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H,O-metabolizing enzymes' salicylic acid-mediated oxidative damage requires H_2O_2. Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 137–149. https://doi.org/10.1104/pp.115.1.137

Sari E., Etebarian H.R. Concentration-dependent effect of salicylic acid application on wheat seedling resistance to take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Phytoparasitica. 2009. V. 37 (1). P. 67–76.

Senaratna T., Merritt D., Dixon K. et al. Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. Plant Growth Regul. 2003. V. 39. P. 77–81. https://doi.org/10.1023/A:1021865029762

Shabana Y.M., Abdel-Fattah G.M., Ismail A.E. et al. Control of brown spot pathogen of rice (*Bipolaris oryzae*) using some phenolic antioxidants. Braz. J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 438–444. https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300006

Shukla A., Dwivedi S.K. Antifungal approach of phenolic compounds against *Fusarium durum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. African J. Agric. Res. 2013. V. 8 (7). P. 596–600. https://doi.org/10.5897/AJAR11.2318

Sircar D., Mitra A. Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota:* Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. J. Plant Physiol. 2009. V. 166. P. 1370–1380. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.02.006

Sorahinobar M., Jahedi A., Safaie N. et al. Dual functional role of salicylic acid against *Fusarium*; long lasting priming and direct immediate effect. Intl. J. Farm Al. Sci. 2015. V. 4 (5). P. 442–447.

Tarchevsky I.A. Plant cell signaling systems. Moscow, Nauka, 2002 (in Russ.).

Tarchevsky I.A., Yakovleva V.G., Egorova A.M. Salicylate-induced modification of proteomes in plants and induction of the PR group (pathogenesis-related) proteins, in particular chitinases, glucanases and protease inhibitors. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2010. V. 46 (3). P. 263–275 (in Russ.).

Teplyakov B.I. Diseases of spring wheat in Western Siberia. Zaschita i karantin rasteniy. 2003. № 1. P. 17–18 (in Russ.).

Tyuterev S.L. Natural and synthetic inducers of plant resistance to disease. VIZR, SPb., 2014 (in Russ.).

Vasyukova N.I., Ozeretskovskaya O.L. Induced plant resistance and salicylic acid (review). Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2007. V. 43 (4). P. 405–411 (in Russ.). https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2

Vio-Michaelis S., Apablaza-Hidalgo G., Gómez M. et al. Antifungal activity of three Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. Bot. Sci. 2012. V. 90. P. 179–183.

Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Ann. Rev Phytopathol. 2009. V. 47. P. 177–206. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202

Volynets A.P. Phenolic compounds in the life of plants. Minsk, 2013 (in Russ.).

Wang L., Tsuda K., Truman W. et al. CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. Plant J. 2011. V. 67. P. 1029–1041. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04655.x

Wang L.J., Li S.H. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. Plant Sci. 2006. V. 170. P. 685–694. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202

Yarullina L.G., Troshina N.B., Cherepanova E.G. et al. Salicylic and jasmonic acids in the regulation of the pro-antioxidant status of wheat leaves with *Septoria nodorum* Berk. infection. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2011. V. 47 (5). P. 602–608 (in Russ).

Zakariyya F., Susilo A.W., Santoso T.I. et al. Role of exogenous salicylic acid and benzoic acid applications. Pelita Perkebunan. 2018. V. 33 (3). P. 33–39.

Zhang J., Zhou J.M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. Molecular Plant. 2010. P. 1–11. https://doi.org/10.1093/mp/ssq035

Zurbriggen M.D., Carrillo N., Hajirezael M.R. Ros signaling in the hypersensitive response. Plant signaling and Behavior. 2010. V. 5. P. 393–396. https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10793

Билай В.И. (Bilay) Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1982. 275 с.

Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. (Vasiukova, Ozeretskovskaya) Индуцированная устойчивость растений салициловая кислота (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.

Волынец А.П. (Volynets) Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск, 2013. 283 с.

Гультяева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Шипилова Н.П. и др. (Gyltiaeva et al.) Фитосанитарный мониторинг болезней пшеницы в Северо-западном регионе в 2015 г. // Защита и карантин растений. 2016. № 4. С. 29–31.

Максимов И.В., Сорокань И.В., Черепанова Е.А. и др. (Maksimov et al.) Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про/антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 2. С. 243–251.

Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность (Methodic recommendations). Черкассы: ВНИИ ХСЗР, 1990. 68 с.

Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. (Mikhailova et al.) Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости Pyrenophora tritici-repentis и устойчивости сортов. СПб., 2012. 56 с.

Новиков Н.Н., Таразанова Т.В. (Novikov, Tarazanova) Лабораторный практикум по биохимии растений: Учебное пособие. М.: Издательство РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2012. 97 с.

Плотникова Л.Я., Штубей Т.Ю. (Plotnikova, Shtubei) Влияние салициловой и янтарной кислот на цитофизиологические реакции пшеницы, инфицированной бурой ржавчиной // Цитология. 2009. Т. 51. № 1. С. 43–53.

Попова Э.В., Коваленко Н.М., Сокорнова С.В. и др. (Popova et al.) Влияние салициловой кислоты и ванилина на устойчивость пшеницы к возбудителю темнобурой пятнистости Cochliobolus sativus // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 3. С. 178–182.

Тарчевский И.А. (Tarchevskiy) Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М. (Tarchevskiy et al.) Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений и индукции группы PR (pathogenesis-related)-белков, в частности, хитиназы, глюканазы и ингибиторов протеаз // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 263–275.

Тепляков Б.И. (Tepliakov) Болезни яровой пшеницы в Западной Сибири // Защита и карантин растений. 2003. № 1. С. 17–18.

Тютерев С.Л. (Tyuterev) Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб.: ВИЗР, 2014. 212 с.

Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.Г. и др. (Yarullina et al.) Салициловая и жасмоновая кислоты в регуляции про-антиоксидантного статуса листьев пшеницы при инфицировании Septoria nodorum Berk. // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 5. С. 602–608.

Fungistatic and Inducing Activity of Benzoic Acids in the "Wheat – *Cochliobolus sativus*" Pathosystem

E. V. Popova[a,#] and N. M. Kovalenko[a,##]

[a] *All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: elzavpopova@mail.ru,*

[##]*e-mail: nadyakov@mail.ru*

The paper provides a comparative assessment of the fungistatic activity of SA, BA, and p-HBA, as well as their ability to induce resistance to dark brown spot in the pathosystem "wheat – *Cochliobolus sativus* (the causative agent of dark brown spot). It is shown that exogenous salicylic and benzoic acids in the concentration range of 0.2–5.0 mM increase the resistance of wheat plants to dark brown spot and their inducing efficiency correlates with the concentration. The highest immunomodulatory activity of SA and BA is demonstrated at a concentration of 5 mM. p-HBA in the studied concentration range of 0.2–5 mM is less effective as a resistance inducer. It has been demonstrated that the effect of exogenous SA, BA, and p-HBA in increasing the resistance of wheat plants to *C. sativus* is associated with their ability to inhibit catalase during plant infection, which leads to the accumulation of peroxide, which is required to neutralize the phytopathogen in tissues, as well as to induce defense reactions cells. A direct relationship was found between the concentration of benzoic acids and the degree of inhibition of the growth of the mycelium of the fungus *C. sativus*. SA, BA at a concentration of 0.5–7.0 mM practically do not affect the growth of mycelium during 7 days of cultivation. An increase in the concentration of substances to 10 mM leads to 100% suppression of the linear growth of the mycelium of the fungus *C. sativus*. p-HBA, in contrast to SA and BA, does not exhibit fungistatic properties up to a concentration of 10 mM. Complete inhibition of the growth and development of the pathogen mycelium was observed at a concentration of p-HBA in the medium of 100 mM, which is 10 times higher than the concentration of SA and BA to obtain the same effect. Studies have shown that, in addition to their role as inducers of disease resistance, exogenous SA and BA can prevent the colonization of tissues of *C. sativus* plants, exhibiting fungistatic activity.

Keywords: benzoic acid, dark brown spotting, fungistatic activity, p-hydroxybenzoic acid, induced resistance, salicylic acid, wheat