

УДК 581.1

## АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ В ІНФІКОВАНИХ ГРИБОМ HETEROBASIDIUM ANNOSUM (FR.) BREF. ПРОПОСТКАХ PINUS SYLVESTRIS L. ТА PINUS PALLASIANA D. DON ЗА ПОПЕРЕДНЬОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ САЛІЦИЛОВОЮ КИСЛОТОЮ

О.В. ЧЕМЕРІС, М.І. БОЙКО

Донецький національний університет  
83050 Донецьк, вул. Щорса, 46  
e-mail: chemeris07@rambler.ru

Досліджено вплив попередньої обробки насіння *Pinus sylvestris* темного і світлого кольору та *Pinus pallasiana* 2 мМ розчином саліцилової кислоти (СК) на енергію проростання й активність пероксидази проростків, отриманих із цього насіння та інфікованих грибом *Heterobasidion annosum*. Встановлено, що в проростках *P. sylvestris*, *P. pallasiana*, отриманих з обробленого СК насіння та інфікованого *H. annosum*, підвищується активність пероксидази порівняно з необробленими (контрольними) проростками. Виявлено різний характер зміни активності пероксидази у проростків *P. sylvestris*, отриманих із насіння темного і світлого кольору, що вказує на їх фізіологічну різноякісність. СК підвищує енергію проростання насіння і стійкість проростків *P. sylvestris*, *P. pallasiana* до гриба *H. annosum* на початковому етапі їх зараження.

*Ключові слова:* *Pinus sylvestris* L., *Pinus pallasiana* D. Don, *Heterobasidion annosum*, пероксидаза, саліцилова кислота.

Саліцилова, або ортогідроксибензойна, кислота належить до групи фенольних сполук рослинного походження. Вона бере участь у захисних реакціях при інфікуванні рослин різними патогенами [2, 4, 12] та в разі дії на них абіотичних чинників [5, 9]. Важливу роль СК відіграє у формуванні системної набутої стійкості рослин [21], що супроводжується синтезом індивідуальних PR-білків (pathogenesis related) [2, 21]. Вважають, що екзогенна СК пригнічує активність каталази у клітинах рослин і це приводить до збільшення вмісту пероксиду водню [17, 23], що, у свою чергу, індукує експресію генів, відповідальних за синтез захисних білків [24] і деяких ферментів [16].

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) виконує важливу функцію при нейтралізації активних форм кисню, які виникають за реакції рослин на патоген внаслідок «окиснювального спалаху» [7, 17]. Вважають, що пероксидаза може брати участь у регулюванні рівня й активності ендогенних та екзогенних сигнальних молекул у рослині [25].

Гриб *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. — коренева губка — небезпечний патоген, який завдає значної шкоди лісовому господарству багатьох країн світу. Захворювання, яке він спричинює, призводить до зниження продуктивності деревостанів, захисних функцій лісів, якості деревини [13, 18]. Біологічні методи боротьби з цим патогеном розроблені недо-

статньо у зв'язку зі слабким вивченням взаємодії гриба і рослини-хазяїна. Для створення стійких хвойних насаджень необхідно дослідити фізіолого-біохімічні процеси хворих і здорових рослин, а також з'ясувати механізми стійкості різних видів сосни.

Насіння *P. sylvestris* має різне забарвлення насінневої оболонки, яке в межах одного дерева стає і не змінюється протягом його життя [8, 14]. Вивченню стійкості проростків *Pinus sylvestris* L. — сосни звичайної та *Pinus pallasiana* D. Don — сосни кримської до гриба *H. annosum* присвячено чимало праць. Можливо, проростки *P. sylvestris*, отримані з різнобарвного насіння, відрізняються за фізіолого-біохімічними показниками, й отже, за стійкістю до *H. annosum* [1, 6].

Так, згідно з літературними даними, в стеблах проростків *P. sylvestris* із насіння темного кольору активність пероксидази істотно зростає в разі зараження *H. annosum* порівняно з проростками, отриманими з насіння світлого кольору [6]. Виявлено вірогідне підвищення активності ферменту в інфікованих грибом *H. annosum* проростках *P. sylvestris*, *P. pallasiana* [19]. Поряд з цим важливу роль у регуляції захисних реакцій у рослинах за дії патогенів відіграє СК [21]. Вміст ендогенної СК в інокульованому вірусом тютюнової мозаїки листку тютюну значно збільшувався і досягав 1 мг/г сирової речовини [26]. Однак механізм дії екзогенної СК на ступінь патогенності *H. annosum* щодо проростків хвойних рослин у науковій літературі не висвітлений.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було визначення розвитку хвороби та активності пероксидази в проростках *P. sylvestris* і *P. pallasiana*, отриманих з насіння, обробленого розчином СК, та інфікованих грибом *H. annosum*.

## Методика

У досліді використано насіння *Pinus sylvestris* L. — сосни звичайної та *Pinus pallasiana* D. Don — сосни кримської. Окремо вивчали реакцію проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного і світлого кольору, попередньо обробленого розчином СК, та проростків *P. pallasiana* на інфікування міцелієм штаму НА-6-96 гриба *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. — кореневої губки. До насіння *P. sylvestris* темного кольору відібрали насіння наступних кольорів: brunneus (темно-каштановий, бурий), umbrinus (умбровий), niger (чорний); світлого кольору: plumbeus (свинцевий), cinereus griseus (попелясто-сірий), avallaneus (горіховий) [11].

Насіння *P. sylvestris*, *P. pallasiana* промивали під проточною водою упродовж 1,5 год і стерилізували 15 %-м розчином пероксиду водню протягом 30 хв. Потім насіння *P. sylvestris*, *P. pallasiana* замочували в 2 мМ розчині СК на 1 год (варіант СК-1), 3 год (варіант СК-3) та 24 год (варіант СК-24). Після цього насіння *P. sylvestris*, *P. pallasiana* висаджували на агаризоване поживне середовище Чапека—Докса [3] з вмістом глюкози 3 г/л [1] у пробірки 20 × 200 мм.

Енергію проростання і схожість насіння *P. sylvestris*, *P. pallasiana* визначали на 7-му і 15-ту доби згідно з ДСТУ 14161—86 [22]. Проростки *P. sylvestris*, *P. pallasiana* у віці 21 доба інокульовали міцелієм штаму НА-6-96. В досліді візуально оцінювали ступінь стійкості інфікованих проростків *P. sylvestris*, *P. pallasiana* на 4-ту, 7-му й 10-ту доби після інокуляції грибом за втратою тургору, зміною кольору, появою некрозів порівняно з контрольними (не обробленими СК) проростками.

Зміну активності пероксидази в проростках *P. sylvestris*, *P. pallasiana* визначали за методом Бояркіна [10], що ґрунтується на встановленні швидкості реакції окиснення бензидину до утворення продукту синього кольору певної концентрації, яку визначали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2-УХЛ 4.2 із червоним світлофільтром. Активність ферменту обчислювали за результатами фотометрії реакційних сумішей з урахуванням коефіцієнтів молярної екстинкції за відповідними формулами.

Досліди проводили у шестиразовій повторності. Отримані дані оброблені статистично методом двофакторного дисперсійного аналізу якісних і кількісних ознак, множинне порівняння середньоарифметичних величин виконано методом Дункана [15].

### Результати та обговорення

Обробка насіння *P. sylvestris* темного і світлого кольору розчином 2 мМ СК протягом 1 та 3 год спричинювала підвищення енергії його проростання порівняно з контрольним (рис. 1, а). Обробка розчином СК протягом 24 год призводила до зниження енергії проростання насіння сосни звичайної темного і світлого кольору. Для насіння *P. pallasiana* енергія проростання підвищувалась лише за умови його обробки розчином СК протягом 1 год. Схожість насіння *P. sylvestris*, *P. pallasiana* була на рівні контролю за попередньої обробки розчином СК за винятком насіння *P. sylvestris* темного кольору, варіанта СК-24 (див. рис. 1, б), в якому цей показник вірогідно знижувався. З літератури відомо, що у на-

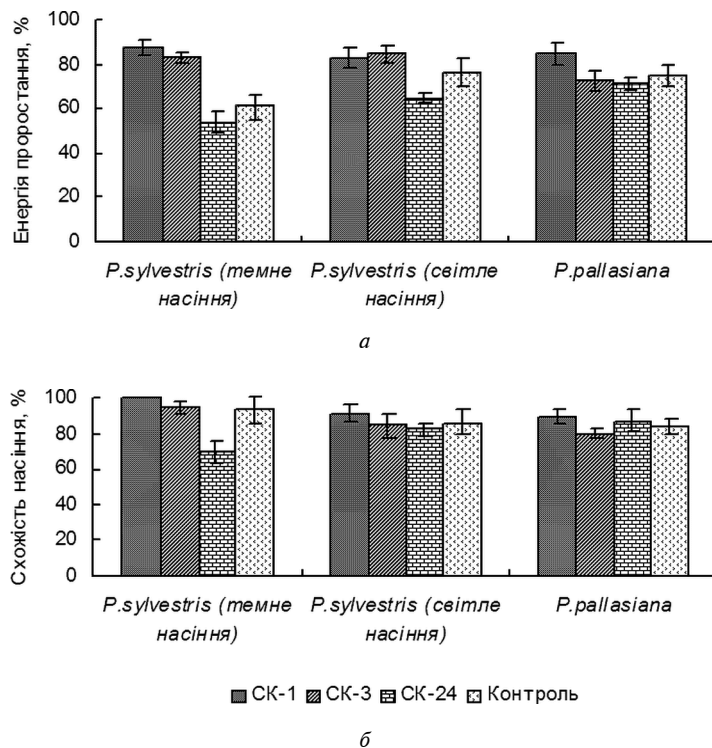


Рис. 1. Енергія проростання (а) та схожість насіння (б) *P. sylvestris*, *P. pallasiana* за попередньої обробки його саліциловою кислотою

сінні пшениці, обробленому розчином 0,1 мМ СК, підвищувався рівень схожості в умовах сольового стресу [20]. Можливо, різна дія СК на енергію проростання та схожість насіння різних рослин пов'язана із застосовуваною в експериментах концентрацією цього хімічного чинника та видовими особливостями організму.

Активність пероксидази в інфікованих проростках *P. sylvestris*, *P. pallasiana* змінювалась порівняно з контрольними рослинами. Активність ферменту в проростках *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного кольору, обробленого 2 мМ розчином СК протягом 3 і 24 год, та проростків, інфікованих штамом НА-6-96 *H. annosum*, на 4-ту добу після інфікування була вірогідно вищою, ніж у контрольних не оброблених СК проростках. Водночас активність пероксидази в проростках *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного кольору, обробленого розчином СК протягом 1 год, була на рівні здорових проростків і нижчою, ніж в інфікованих, але не оброблених СК проростках *P. sylvestris* (рис. 2, а). За попередньої обробки насіння *P. sylvestris* темного кольору розчином СК протягом 3 год та інфікування проростків сосни звичайної штамом НА-6-96 активність пероксидази на 4-ту і 7-му доби після інфікування була на однаковому рівні. Тільки на 10-ту добу після інфікування проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного кольору, попередньо обробленого СК, активність пероксидази у варіантах СК-1 і СК-3 зрівнялась із контрольними та інфікованими, але не обробленими СК рослинами, за винятком варіанта СК-24, де активність ферменту була вірогідно вищою від контрольної. Інфікування проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного кольору й не обробленого СК, штамом НА-6-96 призводило до підвищення активності ферменту на 4-ту й 10-ту доби і до її зниження — на 7-му добу.

Активність пероксидази в проростках *P. sylvestris*, отриманих з насіння світлого кольору, за попередньої його обробки розчином СК та інфікування міцелієм штаму НА-6-96 зростала у варіанті СК-3 на 4-ту добу після інфікування порівняно з інфікованими, але не обробленими СК контрольними рослинами і здоровими (незараженими) рослинами (див. рис. 2, б). Активність ферменту в проростках *P. sylvestris* у варіанті СК-3 на 7-му добу знижувалась. На 7-му добу після інфікування значно підвищувалась активність ферменту у варіанті СК-1, але вона була вірогідно нижчою, ніж у контрольних рослин інфікованого варіанта й істотно вищою порівняно з неінфікованими рослинами. У проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння світлого кольору, обробленого розчином СК, на 10-ту добу після зараження *H. annosum* виявлено підвищення активності пероксидази порівняно зі здоровими рослинами, але вона була значно нижчою, ніж в інфікованих проростків сосни звичайної, отриманих з насіння, не обробленого СК.

Активність ферменту вірогідно підвищувалась протягом розвитку інфекції в інфікованих міцелієм штаму НА-6-96 проростках *P. pallasiana*. Активність пероксидази в проростках сосни кримської, насіння якої було попередньо оброблене розчином СК, за умов інфікування міцелієм гриба *H. annosum* вірогідно підвищувалась порівняно з контрольними рослинами, але була значно нижчою, ніж у проростках *P. pallasiana*, інфікованих лише міцелієм штаму НА-6-96. Слід зазначити, що у варіанті СК-24 активність ферменту була найнижчою (див. рис. 2, в).

Проростки *P. sylvestris*, *P. pallasiana*, насіння яких було оброблене перед висаджуванням розчином СК, виявились стійкішими до ураження

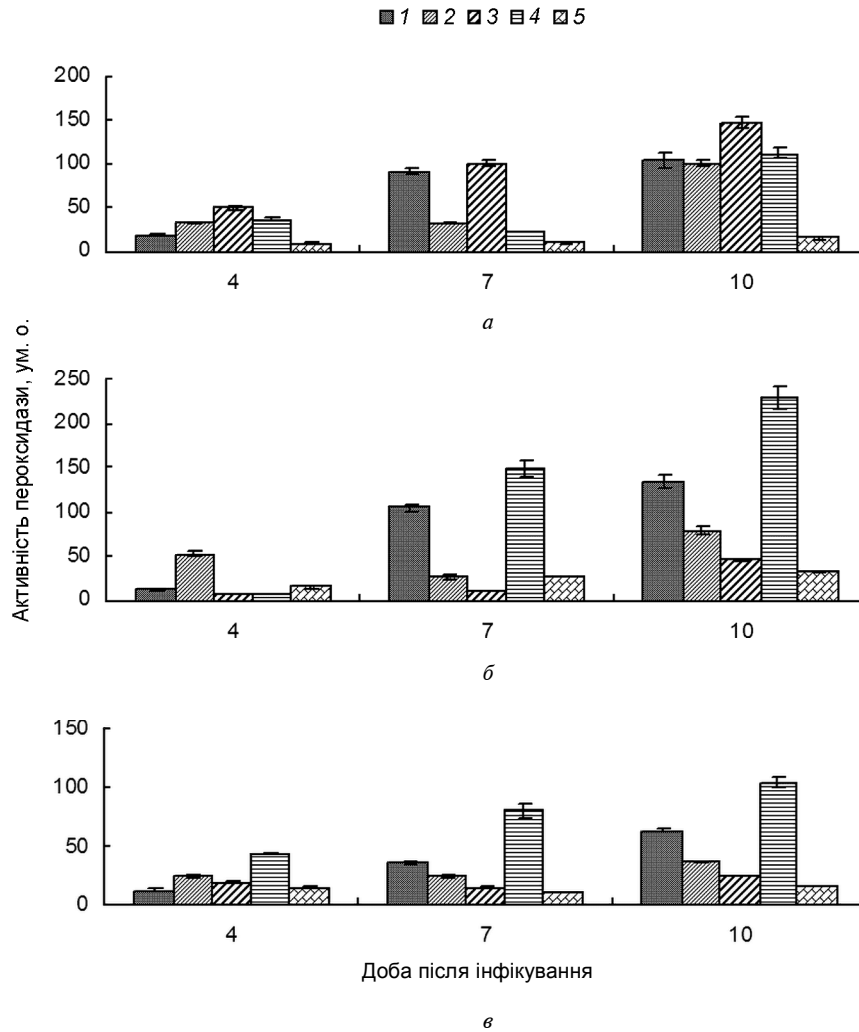


Рис. 2. Активність пероксидази в проростках *P. sylvestris* з насіння темного (а) і світлого (б) кольору і в проростках *P. pallasiana* (в), попередньо оброблених саліциловою кислотою та інфікованих штамом гриба *H. annosum* (НА-6-96):

1–3 – варіанти обробки насіння 2 мМ розчином саліцилової кислоти відповідно упродовж 1, 3 і 24 год; 4 – насіння без попередньої обробки розчином саліцилової кислоти; 5 – контрольні проростки

міцелієм штаму НА-6-96 (рис. 3). Для проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння як темного, так і світлого кольору, на 4-ту добу після інфікування візуальних відмінностей між інфікованими і здоровими проростками в усіх варіантах дослідження не зафіксовано. Для проростків *P. pallasiana*, насіння якої не було оброблене розчином СК, але інфіковане міцелієм штаму НА-6-96, ураження становило 8,9 %. Проростки *P. pallasiana*, насіння якої попередньо обробляли розчином СК, виявились стійкими до патогена.

На 7-му добу з моменту інфікування проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного кольору, у варіантах СК-1 та СК-3 пошкоджених грибом *H. annosum* рослин не зареєстровано. Кількість інфікованих проростків *P. sylvestris* варіанта СК-24 становила 6,3 %, а кількість інфікованих проростків, отриманих з насіння, не обробленого СК, була в

## АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

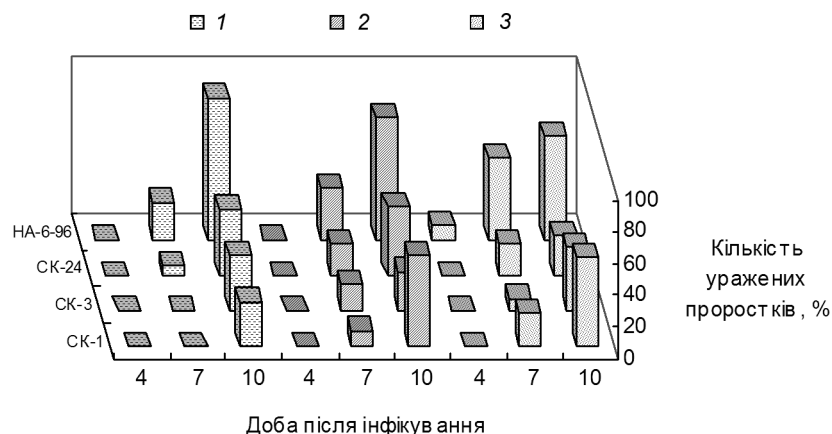


Рис. 3. Кількість уражених грибом *H. annosum* проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного (1) і світлого (2) кольору, та *P. pallasiana* (3), попередньо оброблених розчином саліцилової кислоти

межах 23 %. Найбільшу кількість уражених проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння світлого кольору, зареєстровано у варіанті СК-24, найменшу — у варіантах СК-1 та СК-3.

Для проростків *P. pallasiana* на 7-му добу після інфікування штамом НА-6-96 найменше уражених проростків (8,3 %) було у варіанті СК-3, у варіантах СК-1 та СК-24 відсоток інфікованих проростків знаходився приблизно на однаковому рівні — відповідно 21,4 і 20 %. Кількість інфікованих штамом НА-6-96 проростків *P. pallasiana*, отриманих з насіння, попередньо не обробленого розчином СК, досягала 50 %.

На 10-ту добу після інфікування найбільше уражених проростків *P. sylvestris*, *P. pallasiana* було у варіантах без попередньої обробки насіння розчином СК і дорівнювало для проростків сосни звичайної з насіння темного кольору — 88,9 %, з насіння світлого кольору — 76,9, для сосни кримської — 65,4 %. Для проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного кольору, найменшу кількість інфікованих рослин зафіксовано у варіанті СК-1 — 28,6 %, для проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння світлого кольору — у варіантах СК-3 та СК-24 — відповідно 25 і 20 %, для проростків *P. pallasiana* — у варіанті СК-24 — 25 %.

Отримані дані підтверджують, що попередня обробка насіння *P. sylvestris*, *P. pallasiana* 2 мМ розчином СК підвищує енергію його проростання. Різний характер зміни активності пероксидази проростків *P. sylvestris*, отриманих з насіння темного і світлого кольору в разі попередньої обробки СК й інфікування грибом *H. annosum* вказує на їх фізіологічну різноякісність, яка відіграє важливу роль у формуванні стійкості *P. sylvestris* до гриба *H. annosum*. Реакція проростків *P. sylvestris* з насіння світлого кольору та *P. pallasiana* на попередню обробку насіння СК й подальше інфікування *H. annosum* майже однакова. Стійкість проростків *P. sylvestris* і *P. pallasiana* до гриба *H. annosum* підвищується за попередньої обробки насіння СК на початкових етапах розвитку хвороби і, можливо, в разі постійного її надходження в рослини сприятиме формуванню в них системної набутої стійкості.

1. Бойко М.І. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. — *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дедерувруйнівних грибів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — К., 1996. — 41 с.
2. Васюкова Н.И., Герасимова Н.И., Озерецковская О.Л. Роль салициловой кислоты в болезнестойчивости растений // Прикл. биохимия и микробиология. — 1999. — 35, № 5. — С. 557—563.
3. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1973. — 592 с.
4. Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 4. — С. 64—75.
5. Колупаєв Ю.Є., Карнець Ю.В. Салицилова кислота і стійкість рослин до абіотичних стресорів // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2009. — Вип. 2 (17). — С. 19—39.
6. Кудінова О.В. Фізіологічні реакції проростків *Pinus sylvestris* L. на інфекцію *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2004. — 18 с.
7. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. — 2006. — 126, № 3. — С. 250—261.
8. Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. — М.: Наука, 1972. — С. 95—96.
9. Маменко Т.П., Роїк Л.В. Вплив салицилової кислоти на активність антиоксидантних процесів в озимій пшениці за умов різного водозабезпечення // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — 40, № 1. — С. 69—77.
10. Методи біохімічного дослідження рослин / Под ред. А.И. Ермакова. — 3-е изд., перераб. и доп. — Л.: Агропромиздат, 1982. — 551 с.
11. Мищенко П.И. Шкала цветов. Пособие для ботаников и зоологов при научных и научно-прикладных работах. — Петроград, 1915. — 14 с.
12. Молодченкова О.О. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях // Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — 33, № 6. — С. 463—473.
13. Негруцкий С.Ф. Корневая губка. — М.: Агропромиздат, 1986. — 196 с.
14. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. — М.: Наука, 1964. — 192 с.
15. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
16. Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. Янтарная кислота — миметик салициловой кислоты // Физиология растений. — 1999. — 46, № 1. — С. 23—28.
17. Тарчевский И.А. Элиситор-индуцированные сигнальные системы и их взаимодействие // Там же. — 2000. — 47. — С. 321—331.
18. Федоров Н.И. Корневые гнили хвойных пород. — М.: Лесн. пром-сть, 1984. — 161 с.
19. Чемерис О.В. Зміна активності антиоксидантних ферментів в проростках *Pinus sylvestris* L. та *Pinus pallasiana* D. Don., інфікованих грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Вісн. Донецьк. ун-ту. Сер. Природничі науки. — 2008. — № 2. — С. 322—325.
20. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к засолению среды // Изв. РАН. Сер. Биология. — 1997. — № 2. — С. 149—153.
21. Шакирова Ф.М., Сахабутдинова А.Р. Сигнальная регуляция устойчивости растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. — 2003. — 123, № 6. — С. 563—572.
22. ГОСТ 14161—86. Семена хвойных древесных пород. Посевные качества. Технологические условия.
23. Chen Z., Silva H., Klessing D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. — 1993. — 262, N 12. — P. 1883—1866.
24. Durner J., Klessing D.F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases // J. Biol. Chem. — 1996. — 271. — P. 28492—28501.
25. Low P.S., Merida J.R. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction // Physiol. plant. — 1996. — 96. — P. 533—542.
26. Yalpani N., Silverman P., Wilson T.M. et al. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco // Plant Cell. — 1991. — 3. — P. 809—819.

Отримано 10.12.2009

АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ  
*HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF. ПРОРОСТКАХ *PINUS SYLVESTRIS* L. И  
*PINUS PALLASIANA* D. DON ПРИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН  
САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

О.В. Чемерис, М.И. Бойко

Донецкий национальный университет

Исследовано влияние предварительной обработки семян *Pinus sylvestris* темного и светлого цвета и *Pinus pallasiana* 2 мМ раствором салициловой кислоты (СК) на энергию прорастания и активность пероксидазы проростков, полученных из этих семян и инфицированных грибом *Heterobasidion annosum*. Установлено, что в проростках *P. sylvestris*, *P. pallasiana*, полученных из обработанных СК семян и инфицированных *H. annosum*, повышается активность пероксидазы по сравнению с необработанными (контрольными) проростками. Выявленный разный характер изменения активности пероксидазы в проростках *P. sylvestris*, полученных из семян темного и светлого цвета, указывает на их физиологическую разноразличность. СК повышает энергию прорастания семян и устойчивость проростков *P. sylvestris*, *P. pallasiana* к грибу *H. annosum* на начальном этапе их заражения.

THE ACTIVITY OF PEROXIDASE IN *PINUS SYLVESTRIS* L. AND  
*PINUS PALLASIANA* D. DON SEEDLINGS FROM SEEDS TREATED BY SALICYLIC  
ACID AND INFECTED WITH *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

O.V. Chemeris, M.I. Boyko

Donetsk National University  
46 Schorsa St., Donetsk, 83050, Ukraine

The influence of treatment by solution (2 mM) of salicylic acid (SA) of *Pinus sylvestris* dark and light colour seeds and *Pinus pallasiana* seeds on their germination power and the activity of peroxidase in seedlings received from these seeds and infected with fungus *Heterobasidion annosum* was investigated. The activity of peroxidase in *P. sylvestris* and *P. pallasiana* seedlings received from the SA treated seeds and infected *H. annosum* raised in comparison with the non-treated (control) seedlings. Different character of changes of peroxidase activity in *P. sylvestris* seedlings from seeds of dark and light colour indicates their physiological differences. SA increased the germination power of seeds and resistance of *P. sylvestris* and *P. pallasiana* seedlings to *H. annosum* fungus at the initial stage of infection.

*Key words:* *Pinus sylvestris* L., *Pinus pallasiana* D. Don, *Heterobasidion annosum*, peroxidase, salicylic acid.