

О.В. Чемеріс, М.І. Бойко**СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПРОРОСТКІВ *PINUS SYLVESTRIS* L. ЗА ДІЇ ГРИБА *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.**пероксид водню, пероксидаза, каталаза, *Pinus sylvestris* L., *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.**Вступ**

Ураження рослин грибами або бактеріями викликає посилення генерації активних форм кисню (АФК), що призводить до розвитку «окиснювального спалаху», за рахунок якого рослина може знешкодити патоген [1, 13, 20, 22]. Пероксид водню, що генерується під час окиснювального спалаху під впливом біотичних стресорів, має різні механізми дії. З одного боку, шляхом збільшення міцності клітинної стінки, синтезу фітоалексинів і PR-білків (pathogenesis related), H_2O_2 підвищує стійкість рослини [16]. З іншого боку, за взаємодії з патогеном H_2O_2 може вбивати патоген або викликати індукцію захисних генів, які обмежують його розвиток [18]. У свою чергу реакція посилення утворення АФК викликає зміну активності антиоксидантних ферментів [2, 20]. Для нейтралізації АФК важливе значення мають ферменти, здатні до ліквідації H_2O_2 , – каталаза (КФ 1.11.1.6), пероксидаза (КФ 1.11.1.7) [3]. Дія цих ферментів спрямована на зниження рівня окиснювального стресу, що в свою чергу запобігає або усуває негативні наслідки його дії. Каталаза залучається в сигнальні трансдукційні шляхи рослини, які включаються за розвитку системної набутої стійкості. Це свідчить про те, що багато компонентів, які індукують експресію генів PR-білків і стійкості, прямо чи опосередковано зв'язані з каталазою [15]. Пероксидаза регулює реакції у відповідь на грибну інфекцію [5], крім того, показана позитивна кореляція між активністю пероксидази й рівнем індукованої стійкості до патогена [23].

Досить детально вивчені стійкість і прооксидантна-антиоксидантна рівновага трав'янистих рослин за дії абіотичних факторів навколишнього середовища [7] і за взаємодії з патогеном [18]. Питання адаптивних реакцій хвойних рослин за дії патогенних грибів досліджені менше. Серед фітопатогенів, що паразитують на хвойних деревах, особливо небезпечний грибок *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Цей грибок завдає значної шкоди лісовому господарству багатьох країн різних континентів Землі, в тому числі України. Хвороба, яку він викликає, призводить до зниження продуктивності деревостанів і поступової загибелі лісу [10, 14]. *Pinus sylvestris* L. – домінуюча хвойна порода лісових насаджень Південного Сходу України і інтенсивно інфікується *H. annosum*. Для створення стійких хвойних насаджень необхідно вивчення у порівнянні фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються у хворих та здорових рослинах, а також пізнання механізмів їхньої стійкості до цього патогена [4].

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було визначити зміни стану антиоксидантної системи у інфікованих різними штамми гриба *Heterobasidion annosum* проростків *Pinus sylvestris*. Для досягнення мети провести дослідження з визначення ступеня патогенності штамів гриба *H. annosum*, зміни вмісту H_2O_2 і характеру зміни активності антиоксидантних ферментів у рослинах на різних етапах розвитку хвороби.

Об'єкт і методи дослідження

Насіння *P. sylvestris* після промивання під проточною водою впродовж 1,5 години і стерилізації в 15 % розчині H_2O_2 протягом 30 хв. висаджували на агаризоване живильне середовище Чапека-Докса [6] з вмістом глюкози 3 г/л [4] у пробірці 20 × 200 мм. Проростки *P. sylvestris* у віці 21 доби інокулювали міцелієм штамів НА-6-96, НЦСГ-1м, НЦСГ-2м і ВЕ-08 гриба *H. annosum*. Патогенність штамів *H. annosum* визначали за кількістю уражених рослин. Ураження проростків *P. sylvestris* фітопатогеном визначали за втратою тургору, підсиханням хвоїнок і розвитком некрозів

на рівні кореневої шийки у порівнянні зі здоровими рослинами. Вміст перексиду водню, зміну активності антиоксидантних ферментів у проростках *P. sylvestris* визначали на 4-ту, 7-му і 10-ту добу після інфікування в порівнянні зі здоровими (контрольними) рослинами.

Вміст перексиду водню в інфікованих і здорових проростках визначали ферогіюціанатним методом [21]. Для дослідження використовували рослини без корінця. Наважку рослинного матеріалу гомогенізували на холоді в 5%-ному розчині трихлороцтової кислоти (ТХО) і центрифугували 10 хвилин при 5000 об./хв. До 3 мл супернатанту додавали 0,4 мл 50% розчину ТХО, 0,4 мл 10 мм $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, 0,2 мл 2,5 М KSCN. Оптичну густину розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 480 нм. Концентрацію перексидів водню розраховували за калібрувальною кривою, побудованої за H_2O_2 .

Активність каталази визначали за методом С.Н.М. Kumar, N.R. Knowles [19]. Оптичну густину розчинів вимірювали за довжини хвилі 240 нм. Фіксували зменшення значень оптичної густини за 1 хв. Коефіцієнт екстинції дорівнює $39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Вивчення зміни активності пероксидази в інфікованих і здорових проростках *P. sylvestris* визначали методом А.Н. Бояркіна [9] за швидкістю реакції окиснення бензидину пероксидом водню.

Досліди проводили у триразовій повторності. Статистичну обробку отриманих даних проводили методом двофакторного дисперсійного аналізу якісних і кількісних ознак, а множинне порівняння середніх арифметичних величин – методом Дункана [12]. На графіках наведено середні арифметичні величини та їх стандартні помилки

Результати дослідження та їх обговорення

Штами *H. annosum* відрізнялись один від одного ступенем патогенності (табл.). Штам НА-6-96 виявив більшу патогенність до проростків *P. sylvestris*, ніж штам НЦСГ-1м, НЦСГ-2м і ВЕ-08. Кількість уражених штамами *H. annosum* проростків сосни на початковому етапі захворювання була досить низькою – від 0 до 7%. В цей період дуже важко візуально виявити ураження проростків. Кількість інфікованих штамами *H. annosum* рослин підвищувалась на 7-му добу: найбільшу кількість інфікованих проростків *P. sylvestris* виявлено за дії штамів НА-6-96 і НЦСГ-1м; найменшу – за інфікування штамами НЦСГ-2м і ВЕ-08. На 10-ту добу після інфікування штамами гриба *H. annosum* кількість уражених проростків *P. sylvestris* збільшувалась. Найбільш патогенним штамом виявився штам НА-6-96 – кількість інфікованих проростків *P. sylvestris* складала близько 80%. Середній рівень патогенності виявляють штам НЦСГ-1м і НЦСГ-2м, найменшу кількість інфікованих рослин – 43,3% визначено за дії штаму ВЕ-08. Одержані дані свідчать про те, що досліджені штам гриба *H. annosum* відрізнялись за патогенністю щодо проростків *P. sylvestris*.

Таблиця. Кількість уражених (%) штамами *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростків *Pinus sylvestris* L.

Доба після інфікування	Штами			
	НА-6-96	НЦСГ-1м	НЦСГ-2м	ВЕ-08
	Кількість інфікованих і загиблих проростків, %			
4	6,3±0,41	7,0±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0
7	37,7±2,16	38,0±2,5	28,3±2,3	23,0±0,7
10	82,7±1,1	74,0±3,1	65,3±2,2	43,3±1,1

Інфікування штамами гриба *H. annosum* викликало відповідні реакції антиоксидантної системи проростків *P. sylvestris*. Найбільш високий вміст H_2O_2 встановлено в інфікованих проростках *P. sylvestris* на 4-ту добу, незалежно від патогенності штамів (рис. 1). На 7-му добу розвитку хвороби підвищений вміст H_2O_2 спостерігався тільки у проростків, інфікованих штамами НЦСГ-1м і НЦСГ-2м, але був нижчим порівняно з 4-добовими пошкодженими рослинами.

При цьому вміст H_2O_2 у заражених штамми НА-6-96 і ВЕ-08 проростках *P. sylvestris* зменшувався до рівня контролю, а за інфікування штамми НЦСГ-1м і НЦСГ-2м – значно його перевищував. У 10-добових проростках *P. sylvestris*, інфікованих штамми НЦСГ-1м, НЦСГ-2м і ВЕ-08 *H. annosum*, вміст H_2O_2 достовірно зростав порівняно з 7-мою добою. У проростків *P. sylvestris*, інфікованих штамом НА-6-96, вміст H_2O_2 залишався на рівні 7-мої доби, але був достовірно вищим за контрольний варіант.

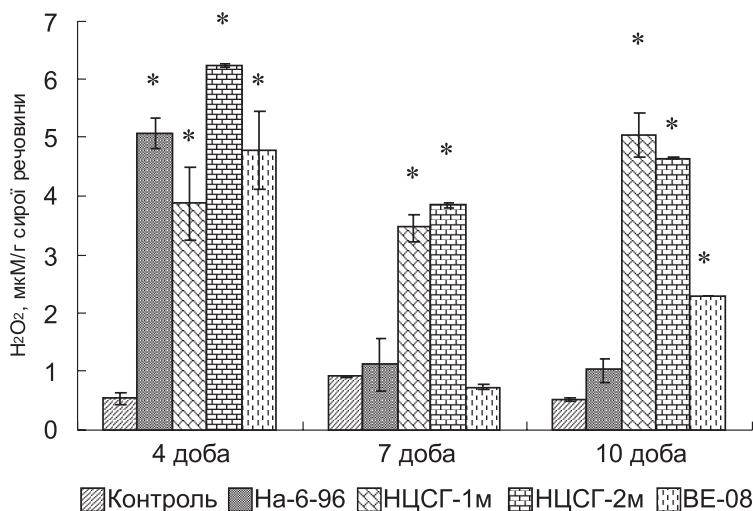


Рис. 1. Зміна вмісту пероксиду водню в інфікованих штамми *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L. Тут і на рис. 2 та 3: * – $p \leq 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю

Посилення утворення H_2O_2 у проростках *P. sylvestris*, інфікованих штамми *H. annosum*, викликало достовірні зміни активності антиоксидантних ферментів, що знешкоджують його. Підвищення активності каталази майже в 3 рази, порівняно з контролем, у проростках *P. sylvestris* спостерігалось вже на 4-ту добу, за винятком інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum* (рис. 2). Це зростання активності ферменту може бути пов'язано з виконанням функції нейтралізації H_2O_2 , що накопичувався в цей період у рослинах. Впродовж розвитку захворювання рослин активність ферменту підвищувалась у варіантах НА-6-96 і НЦСГ-1м. Зниження активності каталази відбувалось у варіанті НЦСГ-2м на 10-ту добу і ВЕ-08 – на 7-му добу.

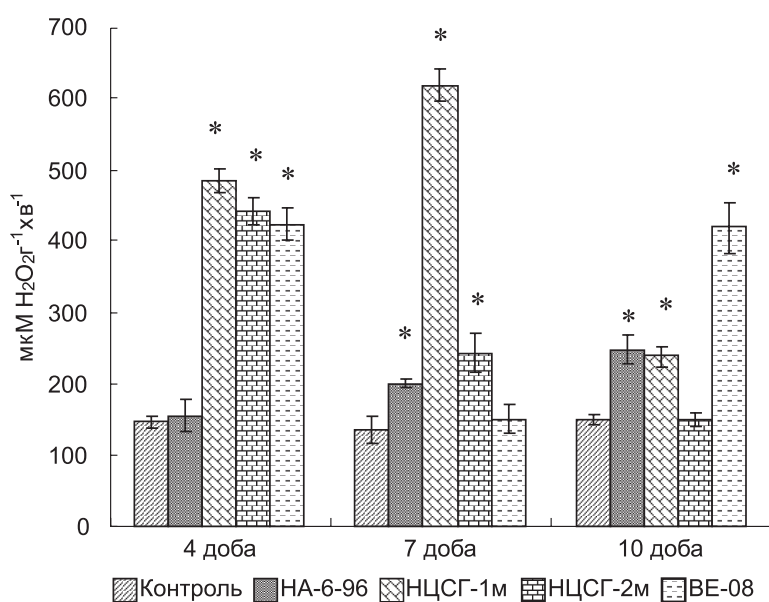


Рис. 2. Активність каталази в інфікованих штамми *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L.

Збільшення активності пероксидази у проростках *P. sylvestris* за інфікування найбільш патогенним штамом НА-6-96 спостерігалось вже на 4-ту добу і досягало максимальних значень на 10-ту, а за іншими варіантами інфікування сосни – лише на 10-ту добу (рис. 3).

Досліджені штами гриба *H. annosum* мали різний ступінь патогенності по відношенню до проростків *P. sylvestris*: штам НА-6-96 викликав найбільше ураження рослин, штами НЦСГ-1м і НЦСГ-2м вражали меншу кількість проростків, а за дії штаму ВЕ-08 виявлено найменшу кількість пошкоджених рослин. Активність каталази у рослинах найвища за інфікування штамами *H. annosum* середньої патогенності, саме у них спостерігалась і генерація H_2O_2 . За інфікування штамом з високим ступенем патогенності реакція підвищення активності каталази у проростках *P. sylvestris* менше виражена, що, можливо, пов'язано з перехопленням антиоксидантної функції пероксидазою – ферментом, що бере участь у формуванні стійкості рослин за рахунок його активації біотичним чинником [11]. Саме у варіанті інфікування сильнопатогенним штамом *H. annosum* активність пероксидази максимальна. Зростання пероксидазної активності може сприяти біосинтезу фенольних речовин [1], що призводить до інгібування росту патогена в рослині. Це вказує на важливу роль пероксидази у формуванні стійкості *P. sylvestris* проти патогенного гриба *H. annosum*.

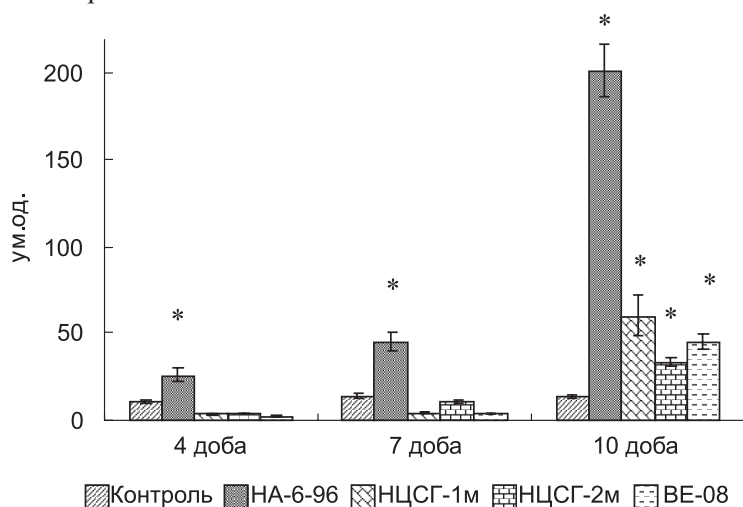


Рис. 3. Активність пероксидази в інфікованих штамами *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L.

Висновки

На основі проведеного дослідження можна зробити висновки: штами *H. annosum* відрізнялись за ступенем патогенності до проростків *P. sylvestris*; інфікування штамами *H. annosum* різної патогенності призводило до генерації пероксиду водню і підвищення активності каталази і пероксидази у проростках *P. sylvestris*. Динамічні зміни антиоксидантного стану заражених рослин *P. sylvestris* лежать в основі їхньої стійкості до патогенного гриба *H. annosum*.

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // Успехи сов. биологии. – 1991. – Т. 111, вып. 6. – С. 923–932.
3. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В.А. Барабой, Д.А. Сутковой; Под общ. ред. Зозули Ю.А. – Киев: Наук. думка, 1997. – 420 с.
4. Бойко М.І. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дереворуйнівних грибів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук: спец. 03.00.12 «Фізіологія рослин»; 03.00.24 «Мікологія» / М.І. Бойко. – К., 1996. – 51 с.
5. Власова Т.А. Влияние заражения *Verticillium dahliae* Кав. на активность пероксидазы и фенолоксидазы и содержание фенолов в изолированных корнях хлопчатника / Т.А. Власова // Вестн. Московск. гос. ун-та. – Сер. 16. – 1993. – № 1. – С. 49–57.
6. Гродзинский А.М. Краткий справочник по физиологии растений / А.М. Гродзинский, Д.М. Гродзинский. – Киев: Наук. думка, 1973. – 592 с.
7. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю.Е. Колупаев // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 6–26.
8. Максимов И.В. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам / И.В. Максимов, Е.А. Черепанова // Успехи сов. биологии. – 2006. – Т. 126, № 3. – С. 250–261.
9. Методы биохимического исследования растений / [Под ред. А.И. Ермакова. 3-е изд., перераб. и допол.] – Л.: Агропромиздат, 1987. – С. 279–280.

10. *Негруцкий С.Ф.* Корневая губка / Сергей Федорович Негруцкий. – М.: Агропромиздат, 1986. – 196 с.
11. *Пероксидаза* как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили / [Граскова И.А., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В. и др.] // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 5. – С. 692–697.
12. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Юрій Георгійович Приседський. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.
13. *Тарчевский И.А.* Элиситор-индуцированные сигнальные системы и их взаимодействие / И.А. Тарчевский // Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – С. 321–331.
14. *Федоров Н.И.* Корневые гнили хвойных пород / Николай Ильич Федоров. – М.: Лесн. пром-ть, 1984. – 160 с.
15. *Dempsey D.A.* Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plant / D.A. Dempsey, D.F. Klessig // Trends Biochem. Sci. – 1994. – Vol. 4. – P. 334–338.
16. *Dempsey D.A.* Signal in plant disease resistance / D.A. Dempsey, D.F. Klessig // Bull. Inst. Pasteur. – 1995. – Vol. 93. – P. 167–186.
17. *Hydrogen peroxide in plant: a versatile molecule of the reactive oxygen species network* / [Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y.] // Journal of Integrative Plant Biology. – 2008. – Vol. 50, № 1. – P. 2–18.
18. *Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris* / [Garcia-Limones C., Hervás A., Navas-Cortés J.A. et al.] // Physiol. and Molec. Plant Pathol. – 2002. – Vol. 61. – P. 325–337.
19. *Kumar C.N.M.* Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of Potata (*Solanum tuberosum* L.) / C.N.M Kumar, N. R. Knowles // Plant Physiol. – 1993. – Vol. 102, № 1. – P. 115–124.
20. *Omran R.G.* Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings / R.G. Omran // Plant Physiol. – 1980. – Vol. 65. – P. 407–408.
21. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* / Plant Physiol. – 1976. – Vol. 57, № 2. – P. 308–309.
22. *The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers* / Potikha T.S., Collins C.C., Johnson D.I. [et al.] // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 119, № 3. – P. 849–858.
23. *Ye X.S.* Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus / X.S. Ye, S.Q. Pan, J. Kuć // Phytopathology. – 1990. – Vol. 80. – P. 1295–1299.

Донецький національний університет

Надійшла 10.09.2012

УДК 581.19:632

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПРОРОСТКІВ *PINUS SYLVESTRIS* L.
ЗА ДІЇ ГРИБА *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

О.В. Чемеріс, М.І. Бойко

Донецький національний університет

Досліджений стан антиоксидантної системи проростків *Pinus sylvestris* L. за інфікування фітопатогенним грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Установлено різний ступінь патогенності штамів *H. annosum* по відношенню до рослин. У інфікованих проростків *P. sylvestris* спостерігався підвищений вміст H_2O_2 на початку розвитку хвороби та зберігався у рослинах, що заражені штамми середньої патогенності. Активність антиоксидантних ферментів у проростках *P. sylvestris* залежала від патогенності штамів *H. annosum*: штами гриба з середнім ступенем патогенності викликали більш інтенсивні зміни активності каталази, а активність пероксидази у проростках підвищувалась впродовж патогенезу, але максимальні значення активності ферменту виявлені саме за дії високопатогенного штаму.

UDC 581.19:632

THE STATE OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN *PINUS SYLVESTRIS* L. SEEDLINGS INFECTED
WITH *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

O.V. Chemeris, M.I. Boiko

Donetsk National University

The state of antioxidative system in *Pinus sylvestris* L. seedlings infected with *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref., a phytopathogenic fungus, has been studied. The different degrees of pathogenicity of *H. annosum* strains in relation to plants have been detected. The high content of H_2O_2 was noted in *P. sylvestris* seedlings at the beginning of pathogenesis and was preserved at the same level in plants infected with strains of medium levels of pathogenicity. The activity of antioxidative enzymes in *P. sylvestris* seedlings depended on pathogenicity of *H. annosum* strains. Fungal strains with a medium degree of pathogenicity caused more intensive changes in the activity of catalase and increase in the activity of peroxidase during pathogenesis, but the maximum values of peroxidase enzymatic activity were detected in plants infected with strains of a high degree of pathogenicity.