

О.В. Чемерис

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ *HETEROBASIDIUM ANNOSUM* (FR.) BREF. ПРОРОСТКАХ *PINUS PALLASIANA* D. DON

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Донецкий национальный университет»

Приведены данные о влиянии предпосевной обработки салициловой кислотой (СК) семян *Pinus pallasiana* D. Don на устойчивость проростков, инфицированных грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., и активность каталазы в них. Выявлено, что предварительная обработка семян салициловой кислотой в течение 1, 3 и 24 часов приводит к повышению устойчивости проростков к грибу *H. annosum*. Защитный эффект салициловой кислоты наблюдался сильнее при увеличении времени обработки семян *P. pallasiana*. Активность каталазы в инфицированных грибом *H. annosum* проростках *P. pallasiana*, полученных из обработанных салициловой кислотой семян, снижалась, что может свидетельствовать об увеличении содержания пероксида водорода и способствовать повышению устойчивости растений к патогену.

Ключевые слова: каталаза, салициловая кислота, проростки *Pinus pallasiana*, гриб *Heterobasidion annosum*

Введение

Салициловая кислота (СК), или орто-гидроксибензойная кислота, относится к группе фенольных соединений растительного происхождения. СК принимает участие в различных процессах – от реализации программ раннего развития [15] до участия в защитных реакциях при инфицировании растений разными патогенами [2, 5] и действия на них абиотических факторов [4]. Однако пристальное внимание ученых направлено на экзогенную салициловую кислоту. Считается, что экзогенная СК угнетает активность каталазы в клетках растений и это приводит к увеличению содержания пероксида водорода [7, 12], что в свою очередь, индуцирует экспрессию генов, отвечающих за синтез защитных белков [13] и некоторых ферментов [8]. Сверхпродукция H_2O_2 при действии экзогенной СК связывают с повышением активности антиоксидантных ферментов – Cu,Zn-супероксиддисмутазы и снижением активности каталазы и аскорбатпероксидазы [16].

В научной литературе встречаются единичные данные о влиянии экзогенной СК на экспрессию генов дефензинов *PsDef1* и *PsDef2* *Pinus sylvestris* L. [3], что может свидетельствовать о вовлечении их в механизм защиты против патогенных грибов. Отмечено, что предварительная обработка СК семян *P. sylvestris* и *Pinus pallasiana* D. Don повышала устойчивость и влияла на активность пероксидазы в проростках, инфицированных фитопатогенным грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. [11]. Нужно отметить, что вопрос влияния экзогенной СК на устойчивость разных видов сосны к грибу *H. annosum*, возможности индуцирования СК защитных механизмов хвойных растений изучен недостаточно.

Цель и задачи исследований

Цель наших исследований – определение влияния предварительной обработки семян СК на активность каталазы в инфицированных грибом

H. annosum проростках *P. pallasiana*. Задачи: изучить влияние предварительной обработки семян СК в течение 1, 3 и 24 часов на устойчивость проростков *P. pallasiana* при инфицировании штаммом *H. annosum* НА-6-96, исследовать изменение активности фермента в инфицированных фитопатогеном проростках *P. pallasiana*, полученных после предварительной обработки семян СК в течение 1, 3 и 24 часов.

Объекты и методики исследований

Семена *P. pallasiana* после промывания под проточной водой в течение 1,5 часов и стерилизации в 15 % растворе H_2O_2 в течение 30 мин замачивали в 2 мМ растворе СК в течение 1 часа (вариант СК-1), 3-х часов (вариант СК-3) и 24-х часов (вариант СК-24). Обработанные СК семена *P. pallasiana* высаживали на агаризованную питательную среду Чапека-Докса с содержанием глюкозы 3 г/л [1] в пробирки 20×200 мм. Затем 21-суточные проростки *P. pallasiana* инокулировали мицелием штамма *H. annosum* НА-6-96. Устойчивость проростков *P. pallasiana* к штамму *H. annosum* НА-6-96 определяли по двум показателям – распространению и развитию болезни на 4, 7 и 10-е сутки после инфицирования и выражали в процентах. Интенсивность развития болезни определяли по шкале поражения растений. Поражение растений определяли визуально по потере ими тургора, подсыханию хвоинок, развитию некрозов на уровне корневой шейки по сравнению со здоровыми проростками. Распространение болезни определяли по формуле, учитывая соответствующий балл поражения растений [9].

Активность каталазы в проростках *P. pallasiana* определяли по методу С. N. M. Kumar, N. R. Knowles [14], при этом оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) при длине волны 240 нм. Фиксировали уменьшение значений оптической плотности за 1 мин. Коэффициент экстинкции $\epsilon=39,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Опыты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом дисперсионного анализа качественных и количественных признаков, а множественное сравнение средних арифметических величин – методом Дункана [6]. На графиках приведены средние арифметические величины и их стандартные ошибки.

Результаты исследований и их обсуждение

Для проростков *P. pallasiana* на 4-е сутки после инфицирования штаммом НА-6-96 не наблюдалось визуальных отличий между инфицированными и здоровыми проростками во всех вариантах исследования (табл. 1).

Таблица 1. Устойчивость проростков *Pinus pallasiana*, полученных из обработанных салициловой кислотой семян, к штамму *Heterobasidion annosum* НА-6-96

Вариант исследования	Сутки после инфицирования	Развитие болезни, %	Распространение болезни, %
НА-6-96 (контроль)	4	0,0±0,0	0,0±0,0
	7	20,0±1,8	50,0±2,5
	10	45,0±3,8	65,4±4,2
СК-1+НА-6-96	4	0,0±0,0	0,0±0,0
	7	7,8±1,2	21,4±3,5
	10	26,2±0,5	57,7±4,6
СК-3+НА-6-96	4	0,0±0,0	0,0±0,0
	7	2,5±0,7	9,3±2,2
	10	20,6±1,7	40,0±4,2
СК-24+НА-6-96	4	0,0±0,0	0,0±0,0
	7	6,8±1,2	20,0±4,2
	10	12,7±1,9	25,0±2,8

На 7-й день после инфицирования штаммом НА-6-96 наименьшее количество пораженных проростков *P. pallasiana* было в варианте обработки растений в течение 3-х часов и составляло 9,3 %. Наблюдалось незначительное количество растений с потерей тургора. В инфицированных вариантах СК-1 и СК-24 процент пораженных проростков находился приблизительно на одном уровне 21,4 % и 20 % соответственно. Развитие болезни составляло 7,8 % и 6,8 % соответственно. Количество инфицированных штаммом НА-6-96 проростков *P. pallasiana*, полученных из необработанных СК семян, достигало 50 %. В данном варианте исследования количество проростков с визуальными признаками болезни составляло 20 %.

На 10-е сутки после заражения наибольшее количество пораженных проростков *P. pallasiana* наблюдалось в варианте, семена которого не были обработаны раствором СК, и составляло 65,4 %. Наименьшее количество инфицированных растений наблюдалось в варианте СК-24 – 25 %. Количество растений с явными признаками болезни

составило 12,7 %. При инфицировании штаммом *H. annosum* НА-6-96 вариантов СК-1 и СК-3 количество проростков с признаками развития болезни увеличивалось до 26,2 % и 20,6 % соответственно, а болезнь распространялась на 57,7% и 40,0 % проростков. Устойчивость проростков *P. pallasiana* к грибу *H. annosum* повышалась при обработке семян СК в течение 1, 3 и 24 часов на начальных этапах развития заболевания, что согласуется с литературными данными [9, 11].

Салициловая кислота, принимая участие в функционировании сигнальных систем, способна объединять их в комплексную систему взаимоотношений. К числу рецепторов СК относится каталаза [12], которая, действуя как вторичный мессенджер, приводит к повышению содержания клеточного уровня H_2O_2 . Установлено, что предварительная обработка 2 мМ раствором СК семян *P. pallasiana* в течение 1, 3 и 24 часов вызывала достоверные изменения активности каталазы в проростках, полученных из этих семян (рис. 1).

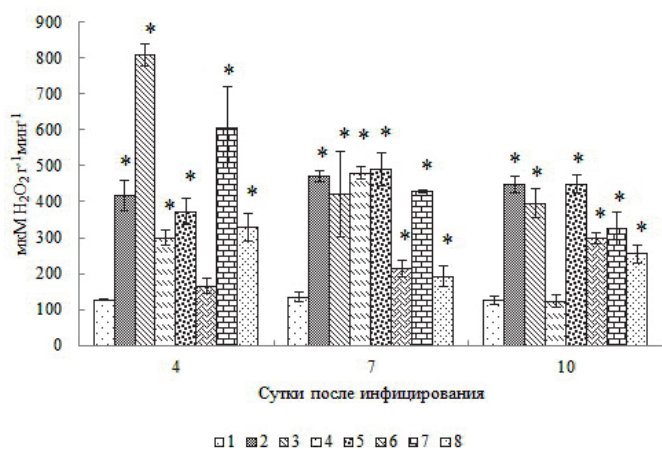


Рис. 1. Активность каталазы в инфицированных штаммом *Heterobasidion annosum* НА-6-96 проростках *Pinus pallasiana* из обработанных салициловой кислотой семян: 1 – контроль, 2 – НА-6-96, 3 – СК-1, 4 – СК-1+НА-6-96, 5 – СК-3, 6 – СК-3+НА-6-96, 7 – СК-24, 8 – СК-24+НА-6-96. Примечание: * – $p \leq 0,05$ разница достоверна относительно контроля

Fig. 1. Catalase activity in *Pinus pallasiana* seedlings from seeds treated with salicylic acid (infected with *Heterobasidion annosum* НА-6-96): 1 – control, 2 – НА-6-96, 3 – SA-1, 4 – SA+НА-6-96, 5 – SA-3, 6 – SA-3+НА-6-96, 7 – SA-24, 8 – SA-24+НА-6-96

Note: * – $p \leq 0,05$ the difference is significant relative to the control

Активность фермента в растениях при всех вариантах обработки СК значительно возросла по сравнению с контролем. В вариантах СК-1 и СК-24 наблюдалось достоверное снижение активности каталазы во времени, однако она оставалась выше, чем в контрольном (необработанном СК) варианте.

При инфицировании штаммом *H. annosum* НА-6-96 активность каталазы в проростках *P. pallasiana*, обработанных СК в течение 1 и 24 часов, и в необработанных СК, но зараженных растениях повышалась по сравнению с контролем на 4-е сутки. Активность фермента в проростках *P. pallasiana*, полученных после обработки семян СК в течение 3 часов, при заражении штаммом *H. annosum* НА-6-96 находилась на уровне контроля (рис. 1).

На 7-е сутки после инфицирования наблюдалось повышение активности каталазы в варианте СК-1 проростков *P. pallasiana* до уровня необработанных СК, но зараженных растений, по сравнению с 4-ми сутками патогенеза. В инфицированных фитопатогеном проростках *P. pallasiana* – вариантах СК-3 и СК-24 – активность фермента находилась на уровне контроля, что, очевидно, связано с продукцией пероксида водорода в растениях. Данное явление наблюдалось для проростков *P. sylvestris* при действии салициловой кислоты и патогенного гриба *H. annosum* [10, 11]. Снижение активности каталазы отмечено в инфицированных штаммом НА-6-96 проростках *P. pallasiana*, обработанных СК в течение 1 часа на 10-е сутки, что, видимо, также обусловлено повышением содержания H_2O_2 . В зараженных проростках *P. pallasiana*, полученных в вариантах обработки СК-3 и СК-24, выявлено повышение активности фермента в сравнении с 7-ми сутками.

Активность каталазы в проростках *P. pallasiana*, полученных из обработанных 2 мМ раствором салициловой кислоты, при инфицировании грибом *H. annosum* снижалась.

Выводы

Предварительная обработка СК семян *P. pallasiana* в течение 1, 3 и 24 часов приводит к повышению устойчивости проростков к грибу *H. annosum*. При этом защитный эффект СК наблюдался сильнее при увеличении времени обработки семян *P. pallasiana*. Активность каталазы в инфицированных фитопатогеном проростках *P. pal-*

lasiana из обработанных СК семян была ниже, чем в зараженных, но необработанных СК растениях. Очевидно, что СК угнетала активность каталазы в проростках, что может привести к накоплению H_2O_2 и осуществлению сигнальной функции в индуцированной экспрессии защитных генов.

1. Бойко М.І. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дереворуйнівних грибів: дис. ... д-ра біол. наук. К., 1996. 461 с.
2. Васюкова Н.И., Герасимова Н.И., Озерецковская О.Л. Роль салициловой кислоты в болезнеустойчивости растений // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. Т. 35, N 5. С. 557–563.
3. Гут Р.Т., Юсипович Ю.М., Ковальова В.А. Особливості експресії генів дефензинів у різних органах сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.). // Наукові праці Лісівничої академії наук України: збірник наукових праць. 2011. Т. 9. С. 86–89.
4. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Салициловая кислота і стійкість рослин до абіотичних стресорів // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2009. Т. 2(17). С. 19–39.
5. Молодченкова О.О. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях // Физиология и биохимия культурных растений. 2001. Т. 33, N 6. С. 463–473.
6. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк: Кассиопея, 1999. 210 с.
7. Тарчевский И.А. Элиситор-индуцированные сигнальные системы и их взаимодействие // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 321–331.
8. Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. Янтарная кислота – миметик салициловой кислоты // Физиология растений. 1999. Т. 46, N 1. С. 23–28.
9. Чемерис О.В. Адаптивні реакції проростків *Pinus sylvestris* L. і *Pinus pallasiana* D.Don за інфікування грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.: автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2015. 21 с.
10. Чемерис О.В. Вплив салицилової кислоти на вміст пероксиду водню в інфікованих грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L. // Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти: Матеріали II Міжнародної наукової конференції (Харків, 11-13 жовтня 2011 р.). Харків, 2011. С. 159–160.
11. Чемерис О.В., Бойко М.І. Активність пероксидази в інфікованих грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L. і *Pinus pallasiana* D.Don за попередньої обробки насіння салициловою кислотою // Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42, N 4. С. 348–355.
12. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. 1993. Vol. 262(12). P. 1883–1866.
13. Durner J., Klessig D.F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 28492–28501.
14. Kumar C.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of Potato (*Solanum tuberosum* L.) // Plant Physiol. 1993. Vol. 102(1). P. 115–124.
15. Rajjou L., Belghazi M., Huguet R. et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms // Plant Physiol. 2006. Vol. 141(3). P. 910–923.
16. Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. et al. Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H_2O_2 -metabolizing enzymes // Plant Physiol. 1997. Vol. 115 (1). P. 137–149.

Поступила редакцию: 04.03.2019

UDC 581.198:632.915

INFLUENCE OF SALICYLIC ACID ON CATALASE ACTIVITY IN *PINUS PALLASIANA* D.DON SEEDLINGS INFECTED WITH *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

O.V. Chemeris

Public Educational Institution of Higher Vocational Education «Donetsk National University»

The data on the effect of pre-treatment by salicylic acid of *Pinus pallasiana* D. Don seeds on the stability and activity of catalase in seedlings infected with *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. are presented. It was revealed that pre-treatment of seeds with salicylic acid for 1, 3 and 24 hours leads to an increase in the resistance of seedlings to the fungus *H. annosum*. The greater protective effect of SA was observed with an increase in the time of treatment of *P. pallasiana* seeds. It was found that the activity of catalase was reduced in seedlings of *P. pallasiana*, obtained from the seeds treated with salicylic acid and infected with *H. annosum*. It may indicate an increase in hydrogen peroxide content and cause an increase in plant resistance to the pathogen.

Key words: catalase, salicylic acid, *Pinus pallasiana* seedlings, *Heterobasidion annosum* fungus