

**АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ
HETEROBASIDION ANNOSUM ПРОРОСТКАХ *PINUS PALLASIANA*
ПРИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН
САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ**

О.В. ЧЕМЕРИС

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», Донецк (chemeris07@rambler.ru)

**ACTIVITY OF CATALASE IN SEEDLINGS OF *PINUS PALLASIANA*
INFECTED BY FUNGUS *HETEROBASIDION ANNOSUM*
IN PRELIMINARY PROCESSING OF SEEDS WITH SALICYLIC ACID**

O.V. CHERERIS

SEI HPE «Donetsk National University», Donetsk (chemeris07@rambler.ru)

Резюме. В работе приведены данные о влиянии предпосевной обработки салициловой кислотой (СК) семян *Pinus pallasiana* D. Don на устойчивость и активность каталазы проростков, инфицированных фитопатогенным грибом *Heterobasidion annosum*. Установлено, что активность каталазы в инфицированных грибом *H. annosum* проростках *P. pallasiana*, полученных из обработанных СК 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* D. Don, гриб *Heterobasidion annosum*.

Abstract. The paper presents data on the effect of salicylic acid (SA) pretreatment of *Pinus pallasiana* D. Don seeds on the stability and activity of catalase in seedlings infected with the phytopathogenic fungus *Heterobasidion annosum*. It was found that the activity of catalase was reduced in seedlings *P. pallasiana*, obtained from the SA-treated seeds 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, seedlings of *Pinus pallasiana* D. Don, fungus *Heterobasidion annosum*.

Салициловая кислота (СК), или орто-гидроксibenзойная кислота, относится к группе фенольных соединений растительного происхождения. СК принимает участие в различных процессах – от реализации программ раннего развития [Rajjou et al., 2006] до участия в защитных реакциях при инфицировании растений разными патогенами [Васюкова и др., 1999; Молодченкова, 2001] и действия на них абиотических факторов [Колупаев, Карпец, 2009]. Особо внимание учёных направлено на экзогенную салициловую кислоту. Считается, что экзогенная СК угнетает активность каталазы в клетках растений и это приводит к увеличению содержания пероксида водорода [Тарчевский, 2000], что в свою очередь, индуцирует экспрессию генов, отвечающих за синтез защитных белков [Durner, Klessing, 1996] и некоторых ферментов [Тарчевский и др., 1999]. Повышенный синтез H_2O_2 при действии экзогенной СК связывают с повышением активности антиоксидантных ферментов – Cu, Zn-супероксиддисмутазы и снижением активности каталазы и аскорбатпероксидазы *Arabidopsis thaliana* [Rao et al., 1997].

В научной литературе встречаются единичные данные о влиянии экзогенной СК на экспрессию генов дефензинов *PsDef1* и *PsDef2* *Pinus sylvestris* L. [Гут и др., 2011], что может свидетельствовать о вовлечении их в механизм защиты против патогенных грибов. Установлено, что предварительная обработка СК семян *P. sylvestris* и *Pinus pallasiiana* D. Доп повышала устойчивость и влияла на активность пероксидазы в проростках, инфицированных фитопатогенным грибом *Heterobasidion annosum* [Чемеріс, Бойко, 2010]. Нужно отметить, что вопрос влияния экзогенной салициловой кислоты на устойчивость разных видов сосны к грибу *H. annosum*, возможности индуцирования салициловой кислотой защитных механизмов хвойных растений изучен недостаточно. В связи с этим были проведены исследования активности каталазы инфицированных грибом *H. annosum* проростков *P. pallasiiana*, полученных после предварительной обработки семян.

Семена *P. pallasiiana* 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 салициловой кислоты в течение 1 часа (вариант СК-1), 3-х часов (вариант СК-3) и 24-х часов (вариант СК-24). Обработанные СК семена *P. pallasiiana* высаживали на агаризованную питательную среду Чапека-Докса с содержанием глюкозы 3 г/л [Бойко, 1996] в пробирки 20×200 мм. Затем 21-суточные проростки *P. pallasiiana* инокулировали мицелием штамма *H. annosum* НА-6-96. Устойчивость проростков *P. pallasiiana* 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 [Чемеріс, 2015].

Активность каталазы в проростках *P. pallasiiana* определяли по методу С. N. M. Kumar, N. R. Knowles (1993), 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 $\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Опыты проводили в трёх повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом дисперсионного анализа качественных и количественных признаков, а множественное сравнение средних арифметических величин – методом Дункана [Приседский, 1999]. На графиках приведены средние арифметические величины и их стандартные ошибки.

Для проростков *P. pallasiiana* на 4-е сутки после инфицирования штаммом НА-6-96 (табл. 1) не наблюдалось визуальных отличий между инфицированными и здоровыми проростками во всех вариантах исследования. Для проростков *P. pallasiiana* на 7-й день после инфицирования штаммом НА-6-96 наименьшее количество поражённых проростков 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 поражённых 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, достигала 50%. В данном варианте исследования количество проростков с визуальными признаками болезни составляло 20%.

На 10-е сутки после заражения наибольшее количество поражённых 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%. Для инфицированных 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. Таким образом, устойчивость проростков *P. pallasiana* к грибу *H. annosum* повышалась при обработке семян СК на начальных этапах развития заболевания.

При инфицировании штаммом *H. annosum* НА-6-96 активность каталазы в проростках *P. pallasiana* вариантов СК-1 и СК-24, и в необработанных СК, но заражённых растениях повышалась по сравнению с контролем на 4-е сутки. Активность фермента в варианте СК-3 проростков *P. pallasiana* 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 заражённых растений, в сравнении с 4-ми сутками. В инфицированных вариантах СК-3 и СК-24 проростков *P. pallasiana* 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* [Чемерис, 2011].

Таблица 1
Устойчивость проростков *Pinus pallasiana* D. Don, 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

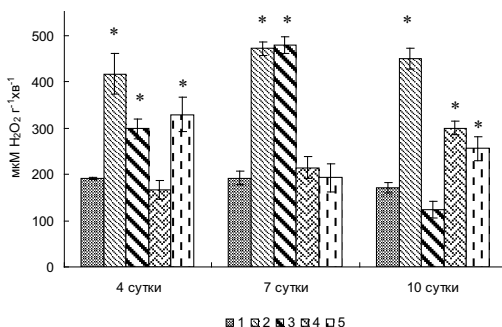


Рис. 1. Активность каталазы в инфицированных штаммом *Heterobasidion annosum* НА-6-96 проростках *Pinus pallasiana* D. Don из обработанных СК семян: 1 – контроль, 2 – НА-6-96, 3 – СК-1+НА-6-96, 4 – СК-3+НА-6-96, 5 – СК-24+НА-6-96 (* – разница достоверна относительно контроля при $p \leq 0,05$).

Снижение активности каталазы наблюдалось 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 вариантах СК-3 и СК-24 выявлено повышение активности фермента в сравнении с 7-ми сутками.

Таким образом, активность каталазы в проростках *P. pallasiana*, полученных из обработанных 2 мМ раствором салициловой кислоты, при инфицировании грибом *H. annosum* снижалась, что, очевидно, оказывало влияние на повышение содержания пероксида водорода в растениях и способствовало повышению устойчивости к патогену.

ЛИТЕРАТУРА

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