

О. В. Чемеріс, М. І. Бойко

**ВМІСТ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК В ІНФІКОВАНИХ ГРИБОМ
HETEROBASIDION ANNOSUM (FR.) BREF. ПРОРОСТКАХ *PINUS SYLVESTRIS* L.
ТА *PINUS PALLASIANA* D. DON**

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

Чемеріс О. В., Бойко М. І. Вміст фенольних сполук в інфікованих грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L. та *Pinus pallasiana* D. Don. – Вивчено зміну вмісту фенольних сполук у проростках *Pinus sylvestris*, отриманих із насіння темного та світлого забарвлення та *Pinus pallasiana* при інфікуванні штамом НА-6-96 гриба *Heterobasidion annosum*. Виявлено достовірне підвищення вмісту фенольних сполук у проростках *P. sylvestris*, отриманих із темного насіння на 6-ту добу після інфікування, у проростків *P. sylvestris* із насіння світлого забарвлення та *P. pallasiana* – на 9-ту добу після інокуляції міцелієм штаму НА-6-96.

Ключові слова: *Pinus sylvestris*, *Pinus pallasiana*, *Heterobasidion annosum*, фенольні сполуки.

Вступ

Останнім часом велика увага приділяється вивченню механізмів формування стійкості рослин в умовах дії різних факторів. У рослин адаптація забезпечується численними фізіолого-біохімічними механізмами. Однією з особливостей формування стійкості рослин є здатність до синтезу вторинних метаболітів, до яких відносяться фенольні сполуки [4, 5, 20].

Фенольні сполуки беруть участь у різних фізіологічних процесах, а також у захисті клітин проти стресових умов. Патогени в якості реакції-відповіді з боку рослини викликають утворення різноманітних фенольних сполук, водночас відбувається індукція активності ферментів фенольного синтезу. Так, у сприйнятливих до *Fusarium* проростків *Pinus sylvestris* спостерігалось зниження синтезу фенольних сполук та активності НАД(Ф)⁺-оксидоредуктази та L-фенілаланінаміакліази [19]; концентрація вільних проантоціанідів у калусних культурах *P. sylvestris* знижується, а зв'язаних – збільшується [6]. Під впливом важких металів відбуваються зміни в фенольному метаболізмі калусних культур *Camellia sinensis* L. [3]. Деякі фенольні сполуки беруть участь у регуляції процесів фотосинтезу та дихання [21], в ініціюванні симбіотичних відносин [9], при дії низьких температур [15].

Значної шкоди лісовому господарству багатьох країн світу завдає гриб *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. – коренева губка. Хвороба, яку він викликає, призводить до зниження продуктивності деревостоїв та поступової загибелі лісу. Велика кількість лісів Південного Сходу України має штучний характер насадження і інтенсивно інфікуються *H. annosum* [14, 22]. Домінуючою породою цих лісів є *Pinus sylvestris* L. – сосна звичайна. Використання кількох видів роду *Pinus* (Сосна) як рослин-диференціаторів дасть змогу виявити більш стійкий вид до патогену та його подальше використання в лісонасадженнях. Для створення стійких хвойних насаджень необхідне вивчення та пізнання порівняючи фізіолого-біохімічні процеси, що є в хворих та здорових рослинах.

Серед літературних джерел зустрічається низка праць, що присвячені вивченню питання стійкості *P. sylvestris* до *H. annosum* [1, 7] та одиничні дані щодо впливу гриба на інші представники роду *Pinus* [1, 11]. Деякі автори виділяють п'ять основних кольорів зрілого насіння *P. sylvestris*: чорний, строкатий, жовтий, коричневий та бежевий [16, 17] або групи світлого насіння, коричневого, з перехідним забарвленням, чорного та строкатого [10]. Забарвлення насінневої оболонки в межах одного дерева постійне і не змінюється протягом життя. Можливо, що ці дерева *P. sylvestris* можуть відрізнятися за відповідними фізіолого-біохімічними показниками та стійкістю до *H. annosum*. Ця проблема недостатньо вивчена та потребує подальших досліджень.

Метою дослідження було вивчення зміни вмісту фенольних сполук у проростках *P. sylvestris*, отриманих із насіння світлого й темного кольору та *Pinus pallasiana* при інфікуванні грибом *H. annosum*.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні було використане насіння *P. sylvestris* та *P. pallasiana*, що зростають у Краснолиманському лісгоспі Донецької області. Окремо вивчали реакцію проростків *P. sylvestris*, отриманих із насіння темного та світлого забарвлення та проростків *P. pallasiana* на інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum*. Насіння проростків *P. sylvestris* було розділено на групи – насіння світлого та темного забарвлення. До групи темного відібрали насіння наступних кольорів *brunneus* (темно-каштановий, бурий), *umbrinus* (умбровий), *niger* (чорний), до групи світлого забарвлення – *plumbeus* (свинцевий), *cinereus griseus* (попелясто-сірий), *avallaneus* (горіховий) [13].

Після стерилізації насіння *P. sylvestris* та *P. pallasiana* було висаджено на агаризоване поживне середовище Чапека-Докса [2] з вмістом глюкози 3 г/л [1]. Проростки у віці 21 доби інфікували міцелієм штаму НА-6-96 *H. annosum*. Вміст фенольних сполук визначали на 6, 9 та 12 добу після інюкуляції проростків *P. sylvestris* та *P. pallasiana*.

Суму фенольних сполук у проростках *P. sylvestris* та *P. pallasiana* визначали за методом Суейна та Хілліса [8]. Наважку рослинного матеріалу від 0,1 г – проростки *P. sylvestris* та *P. pallasiana* без корінця екстрагували у 80%-му етанолі на киплячій водяній бані протягом 10-15 хв. 5-6 разів. В об'єднаних етанольних екстрактах визначали сумарний вміст фенольних сполук із реактивом Фоліна-Деніса на КФК-2-УХЛ 4.2, за червоним світофільтром. Калібрувальну криву будували за галовою кислотою.

Вміст фенольних сполук визначали за формулою:

$$X = \frac{a \cdot y \cdot 100}{H \cdot y_1} \text{ мкг/100 г сирої маси,}$$

де a – концентрація фенольних сполук за калібрувальною кривою, мг/мл; y – загальний об'єм фільтрату, мл; y_1 – дослідний об'єм фільтрату, мл; H – наважка рослинного матеріалу, г.

Статистичну обробку результатів експериментів проводили методом двох факторного дисперсійного аналізу якісних та кількісних ознак, а порівняння середніх арифметичних величин – методом Дункана [18].

Результати та обговорення

Серед багаточисельних функцій фенольних сполук визначають їх роль у стійкості рослин до грибних захворювань. Показано накопичення поліфенольних сполук, що протидіяли радіальному проникненню гіфів гриба *H. annosum* та локалізували розвиток патологічного процесу [25, 26, 28]. Акумуляція фенолів призводила до уповільнення проникнення гіфів *H. annosum* у тканини сосни, ніж при інфікуванні ялини [24]. Стійкість сосни звичайної може бути пов'язана з утворенням специфічних та токсичних до *H. annosum* фенольних сполук різного кількісного та якісного складу [23], а їх склад залежить від дози азотного добрива [27].

При інфікуванні проростків *P. sylvestris* та *P. pallasiana* штамом гриба *H. annosum* спостерігається збільшення вмісту фенольних сполук.

У проростках *P. sylvestris*, одержаних із темного насіння на 6-ту та на 9-ту добу інфікування штамом НА-6-96, вміст фенольних сполук достовірно збільшувався в 1,4 рази, на 12-ту добу – в 1,8 рази. На цей час у інфікованих проростків *P. sylvestris* із світлого насіння вміст фенольних сполук достовірно збільшувався на 9-ту добу в 2 рази, а на 12-ту добу – в 3,5 рази. Слід відзначити, що вміст сполук фенольної природи в здорових проростках *P. sylvestris*, одержаних із насіння темного та світлого забарвлення, знаходився приблизно на одному рівні на усіх етапах визначення для проростків відповідного кольору насіння. Отже, результати свідчать, що здорові проростки *P. sylvestris* із світлого насіння містять достовірно більшу кількість фенольних сполук, ніж проростки *P. sylvestris*, одержані з темного насіння, що вказує на їх фізіологічну різноякісність.

Ураження проростків *P. sylvestris* визначали візуально, враховуючи зниження в них тургору, зміну кольору – з яскраво-зеленого на жовтий, підгнивання стебельців на рівні кореневої шийки. Кількість уражених проростків *P. sylvestris*, одержаних із темного насіння,

на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу становила 37,0, 66,7 та 95,0% відповідно. Для проростків *P. sylvestris*, отриманих із насіння світлого забарвлення, на відповідну добу становила 18,3, 61,9 та 94,8%.

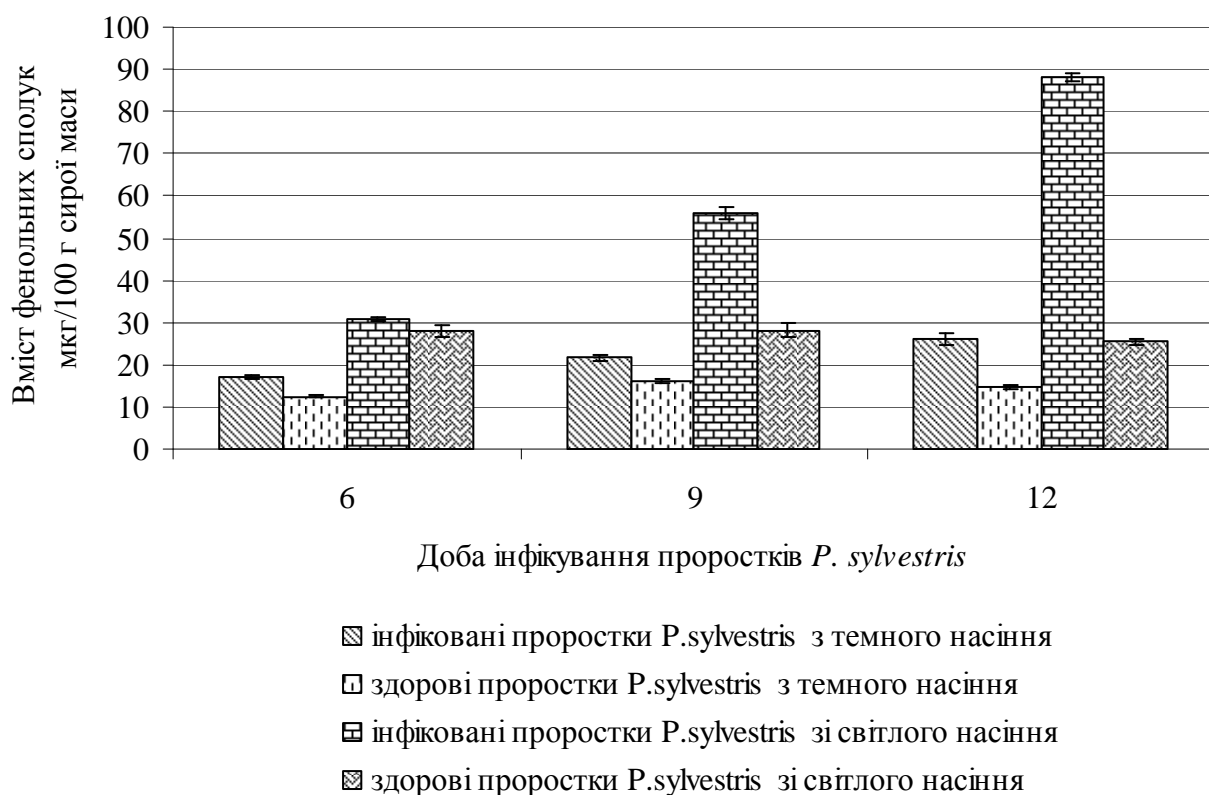


Рис. 1. Вміст фенольних сполук у проростках *P. sylvestris*, інфікованих штамом НА-6-96 *H. annosum*

У проростків *P. pallasiana*, інфікованих штамом НА-6-96 *H. annosum*, на 6-ту добу не спостерігалось вірогідного збільшення вмісту фенольних сполук. Вірогідні відмінності порівняно зі здоровими проростками відмічено на 9-ту та 12-ту добу інфікування. На 9-ту добу інвазії вміст суми фенольних сполук в інфікованих проростках сосни кримської становив у 2,5 рази більше, ніж у здорових проростках. На 12-ту добу інфекції в проростків сосни кримської вміст фенольних сполук був у 3,5 рази вищий, ніж у здорових. На 6-ту добу інфекції кількість уражених проростків склала 34,6%. На 9-ту та 12-ту добу інвазії кількість інфікованих проростків *P. pallasiana* становила 84,1 та 99,1% відповідно. У контрольних проростків *P. pallasiana* вміст фенольних сполук достовірно не змінювався між періодами проведення їх визначення (табл. 1).

**Вміст фенольних сполук у проростках *P. pallasiana*, інфікованих штамом НА-6-96
*H. annosum***

Варіанти досліджу	Вміст фенольних сполук, мкг/100 г сирової маси (M±m)	Різниця середніх величин	Допуск Дункана, t _D	Достовірність
6 доба інфікування				
НА-6-96	39,65 ±5,43	12,97	28,828	Ні
Контроль	26,68±3,37	–	–	–
9 доба інфікування				
НА-6-96	71,36±5,4	43,06	28,828	Так
Контроль	28,3±4,18	–	–	–
12 доба інфікування				
НА-6-96	83,57±3,7	59,3	30,529	Так
Контроль	24,27±1,97	–	–	–

Висновки

Проростки *P. sylvestris*, що отримані з насіння темного та світлого забарвлення відрізняються за своїми фізіолого-біохімічними показниками, реакцією на інфікування грибом *H. annosum*. Проростки *P. sylvestris*, одержані з темного насіння, вже на 6-ту добу інфекції реагували підвищеним синтезом фенольних сполук порівняно з проростками *P. sylvestris* із світлого насіння. Проростки *P. sylvestris* із світлого насіння менше пошкоджуються кореневою губкою на початкових етапах розвитку хвороби, ніж проростки *P. sylvestris* із темного насіння.

Проростки *P. sylvestris* та *P. pallasiana* активно реагують на інфікування грибом *H. annosum* синтезом фенольних сполук.

Таким чином, розвиток патологічного процесу можливий лише у рослин із недостатньою ефективністю метаболізму фенольних сполук. Життєздатними після інвазії залишаються лише рослини з активним основним та фенольним обміном речовин [19].

Список літератури

1. Бойко М. І. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дереворуйнівних грибів: Автореф. дис. ... докт. біол. наук: спец. 03.00.12 "Фізіологія рослин", 03.00.24 "Мікологія" / М. І. Бойко. – К., 1996. – 51 с.
2. Гродзинский А. М. Краткий справочник по физиологии растений / А. М. Гродзинский, Д. М. Гродзинский. – К.: Наук. думка, 1973. – 592 с.
3. Загоскина Н. В. Изменения в образовании фенольных соединений при действии кадмия на каллусные культуры, инициированные из различных органов чайного растения / Н. В. Загоскина, Е. А. Гончарук, А. К. Алявина // Физиол. раст. – 2007. – Т. 54, № 2. – С. 267-274.
4. Запрометов М. Н. Специализированные функции фенольных соединений в растениях / М. Н. Запрометов // Физиол. раст. – 1993. – Т. 40, № 6. – С. 921-931.
5. Запрометов М. Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях / М. Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
6. Изменения содержания фенольных соединений в каллусе сосны в ответ на элиситацию *Fusarium* разной степени патогенности / И. В. Шейн, О. Н. Андреева, Г. Г. Полякова [и др.] // Физиол. раст. – 2003. – Т. 50, № 5. – С. 710-715.
7. Кудінова О. В. Фізіологічні реакції проростків *Pinus sylvestris* L. на інфекцію *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.12 "Фізіологія рослин" / О. В. Кудінова. – К., 2004. – 18 с.

8. *Лабораторные работы по большому практикуму "Вещества вторичного происхождения" / М. И. Бойко, Л. П. Фильчаков. – Донецк: ДонГУ, 1984. – С. 17-19.*
9. *Макарова Л. Е. Влияние фенольных соединений, выделяемых корнями растений гороха (*Pisum sativum* L.) на размножение *Rhizobium* в ризосфере / Л. Е. Макарова, С. Е. Латышева, Т. Е. Путилина // Вісн. Харків. нац. аграрного ун-ту. Сер. Біол. – 2005. – Вип. 2 (7). – С. 42-49.*
10. *Мамаев С. А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений (на примере семейства *Pinaceae* на Урале) / С. А. Мамаев. – М.: Наука, 1972. – 284 с.*
11. *Матеріали I наук.-практ. конф. "Рослини та урбанізація" (м. Дніпропетровськ, 21-23 листопада 2007 р.). – Дніпропетровськ: ООО ТПГ "Куница", 2007. – С. 250-251.*
12. *Матеріали XII з'їзду Укр. ботан. тов-ва / Відп. ред. К. М. Ситник. – Одеса, 2006. – С. 270.*
13. *Мищенко П. И. Шкала цветов. Пособие для ботаников и зоологов при научных и научно-прикладных работах / П. И. Мищенко. – Петроград, 1915. – 14 с.*
14. *Негруцкий С. Ф. Корневая губка / С. Ф. Негруцкий. – М.: Агропромиздат, 1986 – 196 с.*
15. *Олениченко Н. А. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланин-аммиак-лиазы / Н. А. Олениченко, Н. В. Загоскина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 681-685.*
16. *Правдин Л. Ф. Основные закономерности географической изменчивости сосны (*Pinus sylvestris* L.) / Л. Ф. Правдин // Вопросы лесоведения и лесоводства. – М.: Изд-во АН СССР, 1960. – С. 245-250.*
17. *Правдин Л. Ф. Сосна обыкновенная / Л. Ф. Правдин. – М.: Наука, 1964. – 192 с.*
18. *Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю. Г. Приседський. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.*
19. *Содержание фенольных соединений и активность ключевых ферментов их синтеза в гипокотиле сосны обыкновенной при фузариозе / И. В. Шейн, О. Б. Шибистова, Г. К. Зражевская и [др.] // Физиол. раст. – 2003. – Т. 50, № 4. – С. 581-586.*
20. *Способность различных сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к образованию фенольных соединений / Н. В. Загоскина, Н. А. Олениченко, Чжоу Юньвэй и [др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 113-116.*
21. *Ультрафиолетовые лучи стимулируют развитие фотохимической активности фотосистемы II и накопление фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения (*Camellia sinensis*) / Н. В. Загоскина, А. К. Алявина, Т. О. Гладышко и [др.] // Физиол. раст. – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 830-838.*
22. *Федоров Н. И. Корневые гнили хвойных пород / Н. И. Федоров. – М.: Лесн. пром-ть, 1984. – 161 с.*
23. *Хименко Н. Л. Диагностические признаки устойчивости деревьев сосны обыкновенной / Н. Л. Хименко, И. М. Усцький // Сб. науч. тр. Ин-та леса НАН Беларуси. – 2001. – № 53. – С. 345-346.*
24. *Johansson S. M. Initial reactions in sapwood of Norway spruce and Scots pine after wounding and infection by *Heterobasidion parviporum* and *Heterobasidion annosum* / S. M. Johansson, L. N. Lundgren, F. O. Asiogbu // Forest Pathol. – 2004. – V. 34, N 3. – P. 197-210.*
25. *Krekling Trygve. Differential anatomical response of Norway spruce stem tissues to sterile and fungus infected inoculations / Krekling Trygve, Franceschi Vincent R., Krokene Paal [and others] // Trees. – 2004. – V. 18, N 1. – P. 1-9.*
26. *Nagy N. E. Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens / N. E. Nagy, P. Krokene, H. Solheim // Tree Physiol. – 2006. – V. 26 (2). – P. 159-167.*

27. Tomova L. The effect of nitrogen fertilization on fungistatic phenolic compounds in roots of beech (*Fagus sylvatica*) and Norway spruce (*Picea abies*) / L. Tomova, S. Braun, W. Fruckiger // Forest Pathol. – 2005. – V. 35, N 4. – P. 262-276.

28. Werner A. Growth of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. through bark of one-year-old *Pinus sylvestris* seedlings grown *in vitro* / A. Werner // Dendrobiology. – 2001. – V. 46. – P. 65-73.

Чемерис О. В., Бойко М. И. Содержание фенольных соединений в инфицированных грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L. и *Pinus pallasiana* D. Don. – Изучено изменение содержания фенольных соединений в проростках *Pinus sylvestris*, полученных из семян темного и светлого цвета, а также *Pinus pallasiana* при инфицировании штамом HA-6-96 гриба *Heterobasidion annosum*. Выявлено достоверное повышение содержания фенольных соединений в проростках *P. sylvestris*, полученных из семян темного цвета на 6-й день после инфицирования, в проростках *P. sylvestris* из семян светлого цвета и *P. pallasiana* – на 9-й день после инокуляции мицелием штамма HA-6-96.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, *Pinus pallasiana*, *Heterobasidion annosum*, фенольные соединения.

Chemeris O. V., Boyko M. I. The content of phenolic compounds in infected *Pinus sylvestris* L. and *Pinus pallasiana* D. Don seedlings by fungus *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. – The change of phenolic compounds in *Pinus sylvestris* received from dark and light seeds and *Pinus pallasiana* seedlings under infection by strain HA-6-96 *Heterobasidion annosum* has been studied. The content of phenolic compounds in *P. sylvestris* seedlings from dark seeds reliable increased on 6th day after infection, in *P. sylvestris* seedlings from light seeds and *P. pallasiana* seedlings – on 9th day after infection by mycelium of strain HA-6-96.

Key words: *Pinus sylvestris*, *Pinus pallasiana*, *Heterobasidion annosum*, phenolic compounds.