

О.В. КУДИНОВА, М.І. БОЙКО

Донецький національний університет
вул. Щорса, 46, Донецьк, 83050, Україна

ВМІСТ ПІГМЕНТІВ ТА ОРГАНІЧНОГО ВУГЛЕЦЮ В ІНФІКОВАНИХ КОРЕНЕВОЮ ГУБКОЮ ПРОРОСТКАХ *PINUS SYLVESTRIS* L.

Ключові слова: *Pinus sylvestris*, *Heterobasidion annosum*, проростки, ізоляти, фотосинтез, хлорофіли, каротиноїди.

Вступ

Серед фітопатогенів одним з найнебезпечніших є гриб *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref — коренева губка. Хвороба, яку він спричиняє, заподіює збитки через подальшу загибель лісу, зниження продуктивності деревостанів, захисних і санітарно-гігієнічних функцій лісів, знецінювання деревини [2, 10, 12, 13, 15, 21—23]. Патоген уражує багато порід дерев, однак в Україні найбільшого збитку завдає штучно створеним насадженням, серед яких переважає *Pinus sylvestris* L. [7, 14].

Захворювання сосни характеризується глибокими патологічними змінами, що виявляються у зовнішніх ознаках і внутрішніх прихованих процесах життєдіяльності. Очевидно, що зовнішнє благополуччя рослин ще не є свідченням того, що відсутні порушення їхнього метаболізму. Вивчення прихованих порушень має велике значення, тому що дає змогу виявити найперші реакції живого організму на дію патогену.

Важлива роль належить вивченню фізіологічних функцій рослини в умовах стресу (вплив гриба-патогену): фотосинтезу, дихання, транспорту асимілятів [1, 6, 8, 15, 17—19]. Дослідження асиміляційних структур рослин, і насамперед пігментів — хлорофілів і каротиноїдів — головних фоторецепторів рослинних клітин, дає надзвичайно цінну інформацію щодо обмінних процесів хворих рослин [1, 18]. Дослідження спрямованості й інтенсивності обмінних процесів у поєднанні із зовнішніми морфологічними ознаками ослаблення дозволяють скласти точніше уявлення про особливості захворювання і динаміку патологічного процесу в разі ураження кореневою губкою. У наших дослідженнях ми тією чи іншою мірою вивчали фотосинтетичну активність, динаміку змін вмісту зелених і жовтих пігментів у інфікованих кореневою губкою проростках *P. sylvestris*.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктом досліджень була система *Pinus sylvestris* L.—*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Ізоляти *H. annosum* з колекції кафедри фізіології рослин Донецького національного університету були виділені в чисті культури з плодкових тіл,

зібраних на уражених грибом деревах сосни в Ямпольському лісництві Краснолиманського державного лісного господарства (ДЛГ) Донецької обл. (НА-3-95); у Веригінському лісництві Кременського ДЛГ Луганської обл. (КВ-82166) і у Воронежській обл. (ЦНЛГ). В експериментах використовували насіння чорного та бежевого кольорів *P. sylvestris* з різних областей України.

Насіння стерилізували у такий спосіб: протягом 2 год його промивали проточною водою для видалення забруднень [5], потім на 30 хв вміщували в 0,01 %-й розчин $KMnO_4$. Після цього промивали і залишали на добу в дистильованій воді [4]. Через 24 год насінний матеріал обробляли 15 %-м H_2O_2 протягом 30 хв і висаджували у великі пробірки на агаризоване середовище Чапека—Докса [5] з виключенням з нього високої концентрації глюкози, яка пригнічувала проростання насіння [1]. Живильне середовище розливали по 15 мл у пробірки, стерилізували в автоклаві АГ-1 при 0,8—1,0 атм протягом 40 хв. Насіння (3—5 шт.) вносили у пробірки і пророщували при кімнатній температурі. Тритижневі проростки інокулювали шматочками міцелію *H. annosum* ($\approx 1 \times 1$ см). На 6, 9 і 12-ту доби після інокуляції проростки використовували для визначення інтенсивності фотосинтезу та вмісту пігментів.

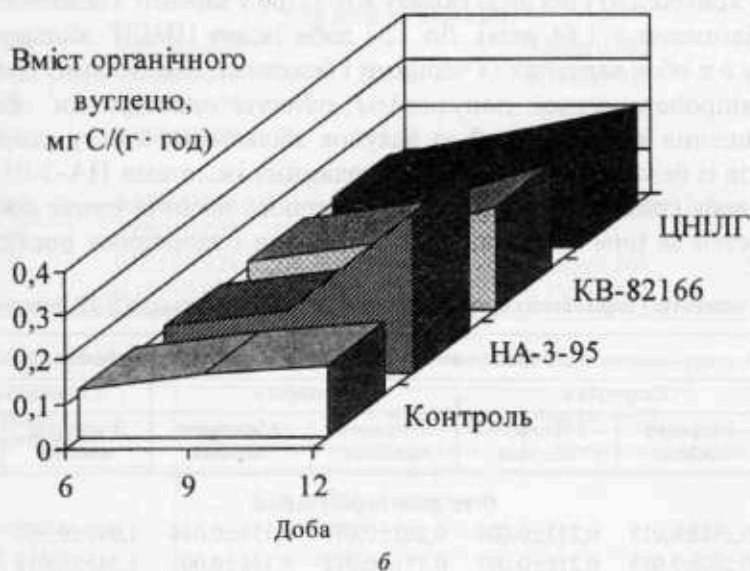
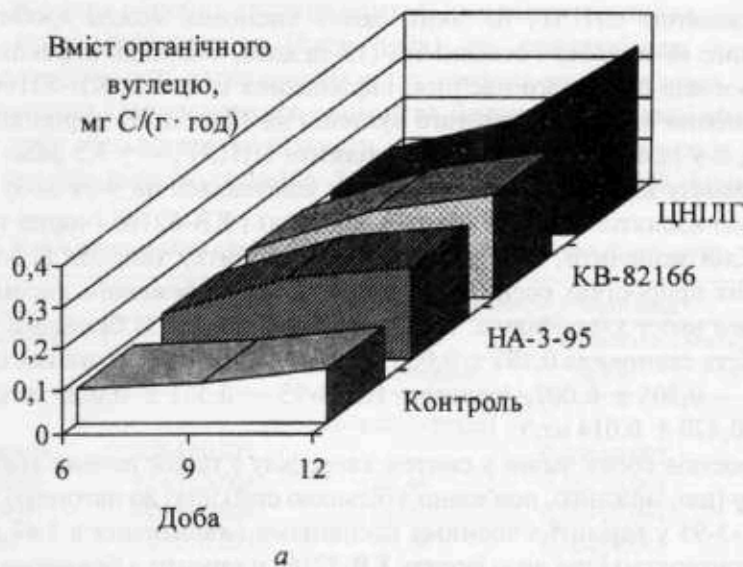
Інтенсивність фотосинтезу в інфікованих кореневою губкою проростках *P. sylvestris* визначали за зміною вмісту вуглецю та органічних речовин, використовували методику Бородуліної, яка ґрунтується на мокрому спалюванні рослинних тканин у суміші біхромату калію і сірчаної кислоти [16].

Вміст пігментів у проростках *P. sylvestris* визначали спектрофотометрично за методикою Вернона [3, 9]. Пігменти екстрагували за допомогою 80 %-го ацетону. Оптичну щільність вимірювали на такій довжині хвиль: 665 нм (хлорофіл *a*), 649 нм (хлорофіл *b*) і 440 нм (жовті пігменти). Концентрацію зелених пігментів у екстракті (мг/л) розраховували за формулами Вернона, а концентрацію каротиноїдів — за формулою Ветштейна [3]. Одержані результати обробляли статистично [11].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень засвідчують, що на ранніх стадіях розвитку хвороби (6-та і 9-та доби) різниці у накопиченні органічного вуглецю у хворих і здорових проростках, одержаних із насіння сосни з Піщаного лісництва Луганської обл., немає. Цей висновок є правомірним щодо проростків, вирощених як із чорного, так і з бежевого насіння. На 12-ту добу дії інфекції спостерігали значне збільшення вмісту органічного вуглецю у проростках із чорного насіння, інфікованих ізолятами КВ-82166 і ЦНЛГ (відповідно, у 1,94 і 2,78 раза порівняно з контролем), та у проростках із бежевого насіння, інфікованих ізолятом НА-3-95 — у 2,23 раза (рисунок).

Динаміка накопичення органічного вуглецю засвідчує, що у контрольних рослинах немає достовірних відмінностей за цим показником у ході експерименту (6—12-та доба). Однак у хворих проростках із бежевого насіння, уражених культурами НА-3-95 і КВ-82166, достовірно збільшувалась кількість вуглецю на 12-ту добу інфікування порівняно з 6-ю і 9-ю. Відносно проростків,



Вміст органічного вуглецю (мг С/(г · год)) в інфікованих *H. annosum* проростках *P. sylvestris*, отриманих із чорного (а) і бежевого (б) насіння Піщаного ДЛГ: контроль — здорові проростки *P. sylvestris*; НА-3-95 — проростки *P. sylvestris*, інфіковані ізолятом НА-3-95; КВ-82166 — проростки *P. sylvestris*, інфіковані ізолятом КВ-82166; ЦНІЛГ — проростки *P. sylvestris*, інфіковані ізолятом ЦНІЛГ

The contents of organic carbon (mg C/(g · h)) in infected *H. annosum* seedlings *P. sylvestris* received from black (a) and beige (b) of seeds Pishani SFE: control — healthy seedlings *P. sylvestris*; НА-3-95 — seedlings *P. sylvestris* infected isolate НА-3-95; КВ-82166 — seedlings *P. sylvestris* infected isolate КВ-82166; ЦНІЛГ — seedlings *P. sylvestris* infected isolate ЦНІЛГ

уражених ізолятом ЦНІЛГ, то такий самий висновок можна зробити саме щодо першого (6-та доба) і останнього (12-та доба) етапів дії інфекції.

У проростків із чорного насіння, інфікованих ізолятом КВ-82166, виявлено збільшення вмісту органічного вуглецю на 12-ту добу порівняно з 6-ю в 2,21 раза, а у проростків, уражених ізолятом ЦНІЛГ, — у 3,5 раза.

Зміна вмісту хлорофілу *a* у проростках відбувалась на 9-ту добу патогенезу під дією ізолятів НА-3-95 (бежеве насіння) і КВ-82166 (чорне насіння) (табл. 1). Слід зазначити, що на пізній стадії розвитку хвороби (12-та доба) в усіх хворих проростках сосни як із чорного, так і з бежевого насіння різко збільшувався вміст хлорофілу *a*. Так, у здорових соснах із бежевого насіння його кількість становила $0,188 \pm 0,008$ мг/г, у проростків, уражених ізолятом КВ-82166, — $0,305 \pm 0,007$, ізолятом НА-3-95 — $0,361 \pm 0,001$ та ізолятом ЦНІЛГ — $0,420 \pm 0,014$ мг/г.

У проростків сосни зміни у синтезі хлорофілу *b* також почали відбуватися на 9-ту добу (що, можливо, пов'язано з більшою стійкістю до патогену) під дією ізоляту НА-3-95 у варіанті з чорними насінинами (збільшення в 1,47 раза порівняно з контролем) і під дією ізоляту КВ-82166 у варіанті з бежевими насінинами (збільшення у 1,64 раза). До 12-ї доби ізолят ЦНІЛГ збільшував вміст хлорофілу *b* в обох варіантах (з чорними і бежевими насінинами) (табл. 1).

У дніпропетровської популяції *P. sylvestris* спостерігали збільшення співвідношення хлорофілів *a/b* за рахунок збільшення вмісту хлорофілу *a* у проростків із бежевого насіння у разі ураження ізолятами НА-3-95 і ЦНІЛГ на 12-ту добу (табл. 1). У проростках із чорного насіння немає достовірних розбіжностей за цим показником між хворими і здоровими рослинами.

Таблиця 1. Вміст пігментів у інфікованих проростках *P. sylvestris* Царичанського ДЛГ Дніпропетровської обл.

Ізолят <i>H. annosum</i>	Вміст пігментів у проростках, мг/г сирої маси, $M \pm m$					
	Хлорофіл <i>a</i>		Хлорофіл <i>b</i>		Співвідношення <i>a/b</i>	
	З чорного насіння	З бежевого насіння	З чорного насіння	З бежевого насіння	З чорного насіння	З бежевого насіння
	6-та доба інфікування					
Контроль	0,212±0,013	0,233±0,004	0,202±0,055	0,154±0,014	1,099±0,363	1,517±0,163
КВ-82166	0,230±0,013	0,218±0,007	0,171±0,012	0,144±0,001	1,343±0,018	1,520±0,042
НА-3-95	0,241±0,014	0,220±0,001	0,183±0,014	0,144±0,008	1,318±0,024	1,530±0,099
ЦНІЛГ	0,203±0,018	0,267±0,013	0,162±0,011	0,162±0,008	1,253±0,026	1,650±0,003
	9-та доба інфікування					
Контроль	0,197±0,032	0,199±0,028	0,114±0,004	0,089±0,011	1,730±0,212	2,240±0,042
КВ-82166	0,264±0,042	0,333±0,001	0,151±0,032	0,146±0,013	1,745±0,092	2,290±0,198
НА-3-95	0,291±0,004	0,247±0,054	0,168±0,017	0,107±0,025	1,740±0,198	2,315±0,049
ЦНІЛГ	0,231±0,008	0,205±0,016	0,128±0,008	0,091±0,001	1,815±0,177	2,240±0,141
	12-та доба інфікування					
Контроль	0,216±0,015	0,188±0,008	0,105±0,011	0,110±0,028	2,065±0,078	1,765±0,516
КВ-82166	0,260±0,086	0,305±0,007	0,117±0,034	0,157±0,001	2,210±0,099	1,970±0,071
НА-3-95	0,266±0,086	0,361±0,001	0,123±0,040	0,157±0,004	2,155±0,007	2,280±0,028
ЦНІЛГ	0,310±0,037	0,420±0,014	0,137±0,018	0,187±0,003	2,265±0,035	2,265±0,021

Статистична обробка експериментальних даних показала, що на початковому етапі інфікування (6-та доба) не спостерігали достовірного збільшення кількості каротиноїдів у проростках як із чорного, так і з бежевого насіння Царичанського лісництва Дніпропетровської обл. (табл. 2). На 9-ту добу збільшувалась кількість каротиноїдів у проростків із чорного насіння під впливом ізолятів НА-3-95 і ЦНІЛГ (на 46 і 44 %, відповідно) і у

Таблиця 2. Вміст каротиноїдів у інфікованих *H. annosum* проростках *P. sylvestris*

Ізолят <i>H. annosum</i>	Вміст каротиноїдів, мг/г сирої маси			
	Проростки з чорного насіння		Проростки з бежевого насіння	
	M ± m	% до контролю	M ± m	% до контролю
6-та доба дії інфекції				
Контроль	0,064±0,011		0,054±0,002	
КВ-82166	0,063±0,004	98,44	0,057±0,004	105,56
НА-3-95	0,085±0,006	132,81	0,059±0,004	109,26
ЦНІЛГ	0,038±0,025	59,38	0,064±0,001	118,52
9-та доба дії інфекції				
Контроль	0,065±0,008		0,068±0,005	
КВ-82166	0,090±0,014	138,46	0,114±0,007	167,65
НА-3-95	0,095±0,004	146,15	0,087±0,014	127,94
ЦНІЛГ	0,094±0,009	144,62	0,074±0,008	108,82
12-та доба дії інфекції				
Контроль	0,073±0,006		0,079±0,018	
КВ-82166	0,090±0,023	123,29	0,105±0,000	132,91
НА-3-95	0,095±0,024	130,14	0,120±0,000	151,90
ЦНІЛГ	0,107±0,008	146,58	0,130±0,000	164,56

Таблиця 3. Співвідношення зелених і жовтих пігментів в інфікованих *H. annosum* проростках *P. sylvestris*

Ізолят <i>H. annosum</i>	Σ хлорофілів / Σ каротиноїдів	
	Проростки з чорного насіння	Проростки з бежевого насіння
6-та доба інфікування		
Контроль	6,469	7,167
КВ-82166	6,381	6,333
НА-3-95	4,988	6,170
ЦНІЛГ	9,605	6,703
9-та доба інфікування		
Контроль	4,785	4,221
КВ-82166	4,611	4,211
НА-3-95	4,832	4,069
ЦНІЛГ	3,819	3,986
12-та доба інфікування		
Контроль	4,397	3,785
КВ-82166	4,189	4,381
НА-3-95	4,095	4,400
ЦНІЛГ	4,178	4,769

проростків з бежевого насіння — під дією ізоляту KB-82166 (на 67 %). Через 12 діб після зараження рівень жовтих пігментів приблизно відповідав 9-добовим значенням (табл. 2).

В контрольних рослинах кількість каротиноїдів достовірно не змінювалася протягом усього експерименту, тимчасом як у динаміці (6—12-та доба) ізоляти KB-82166 і ЦНЛГ збільшували вміст пігментів у проростків із бежевого насіння у 1,8 і 2,0 раза, а у проростків із чорного насіння — у 1,4 і 2,8 раза, відповідно.

Співвідношення зелених і жовтих пігментів у проростках *P. sylvestris* різко знижувалось вже до 9-ї доби інфікування, що пов'язано зі збільшенням рівня жовтих пігментів (табл. 3).

Висновки

1. У відповідь на зараження кореневою губкою в тканинах проростків *Pinus sylvestris* збільшувалась кількість органічного вуглецю.

2. На 12-ту добу розвитку хвороби в інфікованих проростках сосни, одержаних як із чорного, так і з бежевого насіння, різко збільшувався вміст хлорофілу *a*.

3. У результаті проникнення *H. annosum* у проростки *P. sylvestris* збільшувався вміст жовтих пігментів, які, можливо, виконують свою фотопротекторну функцію не лише за несприятливих фізичних факторів середовища, а й у разі атаки рослини грибом-паразитом.

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. ... д-ра біол. наук. — К., 1996. — 51 с.
2. Василюк А.П. Экология и биология корневой губки (*Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst) и факторы, ограничивающие ее патогенность в хвойных насаждениях Литовской ССР: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Тарту, 1981. — 26 с.
3. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.И. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание: Учеб. пособие. — М.: Высш. шк., 1975. — 392 с.
4. ГОСТ 13056.6-75. Правила отбора образцов и методы определения качеств семян. — Взамен ГОСТ 13056.6-68. Введ. 01.01.76. — М.: Изд-во гос. стандартов, 1988. — С. 87—124.
5. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1973. — 592 с.
6. Истратий Л.Н. Изменения в ассимиляционном аппарате сливы при вертициллезе в инкубационном периоде // Изв. АН МССР. Сер. биол. и хим. наук. — 1969. — № 6. — С. 79.
7. Калиниченко В.А. Биология и гистология паразитизма и некоторые обоснования биологических средств борьбы с корневой губкой: Дис. ... канд. биол. наук / Укр. НИИ лесн. хоз. и агролесомелиор. им. Г.Н. Высоцкого. — Харьков, 1971. — 155 с.
8. Марютин Ф.П., Темнохуд Н.П. Влияние патогена *Helminthosporium gramineum* Rabh. на некоторые физиологические и биохимические процессы в растениях ячменя // Сб. науч. тр. Харьк. с.-х. ин-та. — 1979. — 259. — С. 58—62.
9. Методические указания к выполнению лабораторных работ по теме «Фотосинтез» курса «Физиология растений» / Бойко М.И., Приседский Ю.Г. и др. — Донецк, 1999. — 38 с.
10. Неграцкий С.Ф. Корневая губка. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1986. — 196 с.
11. Приседский Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
12. Раптунович Е.С. О распространении корневой губки в очагах усыхания насаждений // Лесоведение и лес. хоз-во. — 1992. — № 26. — С. 116—121.
13. Синадский Ю.В. Сосна. Ее вредители и болезни. — М.: Наука, 1983. — 344 с.

14. Снугирев Г.С., Парфенова Г.Г., Фурсевич Н.В. Густота посадки сосновых культур как один из факторов их устойчивости к корневым гнилям // Лесохоз. инф. — 1992. — № 11. — С. 46.
15. Федоров Н.И. Корневые гнили хвойных пород. — М.: Лесн. пром-сть, 1984. — 160 с.
16. Физиология растений: Практикум / За ред. М.М. Мусиенка. — К.: Вища шк., 1995. — С. 59—60.
17. Asiegbe F.O., Daniel G., Johansson M. Studies on the infection of Norway spruce roots by *Heterobasidion annosum* // Can. J. of Botany. — 1993. — № 71. — P. 1552—1561.
18. Benada J. The gradients of oxidation-reduction potentials in cereals and the dependence of obligate parasites on the redox potentials of host tissues // Phytopathology. — 1966. — 55, № 3. — P. 265—290.
19. Dabala J. Asura unor modificarii in proportia pigmentilor asimilatori la frunzele de orz infectate de *Helmintosporium gramineum* // Bull. Sti. Inst. Ped. — 1970. — Ser. B. — P. 69—74.
20. Desai B.G., Goyal J.P., Bhatnagar L.G., Pathak V.N. Changes in chlorophyll *a* and *b* contents in leaves of *Phaseolus aconitifolius* Jacq. infected by *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus and Moore // Indian J. Exp. Biol. — 1971. — 9, № 3. — P. 406—407.
21. Munda A. Preliminary report on the distribution of *Heterobasidion annosum* intersterility groups in Slovenia // Proc. Eighth IUFRO Conference on Root and Butt Rots (Sweden, Aug. 1993). — Uppsala, Sweden: Swedish Univ. Agricultural Sciences, 1994. — P. 272—273.
22. Swedjemark G., Stenlid J. Population dynamics of the rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies* // Oikos. — 1993. — 66. — P. 247—254.
23. Woodward S., Stenlid J., Karjalainen R., Hyltermann A. *Heterobasidion annosum*: biology, ecology, impact, and control. — Wallingford: CAB International, 1998. — 590 p.

Рекомендуе до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 06.10.1993

О.В. Кудинова, М.І. Бойко

Донецкий национальный университет

СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ И ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В ИНФИЦИРОВАННЫХ КОРНЕВОЙ ГУБКОВОЙ ПРОРОСТКАХ *PINUS SYLVESTRIS* L.

Исследовали содержание органического углерода, динамику изменений количества зеленых и желтых пигментов в инфицированных корневой губкой проростках *Pinus sylvestris*, полученных из семян черного и бежевого цветов. Установлено, что при инфицировании *H. annosum* интенсифицируется фотосинтез во всех проростках сосны. Содержание хлорофилла *a* увеличивается на 9-е сутки патогенеза и к 12-м суткам это происходит уже под влиянием всех изученных изолятов. Некоторые изоляты корневой губки вызывают также изменения хлорофилла *b* на 9-е и 12-е сутки инфицирования. Обнаружены изменения в соотношении хлорофиллов *a/b*, что объясняется увеличением синтеза хлорофилла *a*. В результате проникновения *H. annosum* в проростки *P. sylvestris* усиливается синтез желтых пигментов, что указывает на их защитную роль при атаке растения грибом-патогеном.

О. V. Kudinova, M. I. Bojko

Donetsk national university

CHANGE CONTENTS OF PIGMENTS AND ORGANIC CARBON IN INFECTED *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF SEEDLINGS *PINUS SYLVESTRIS* L.

Dynamics of changes of the contents of green and yellow pigments in infected *Heterobasidion annosum* seedlings *Pinus sylvestris* received from seeds of black and beige colors were investigated. It is established, that in reply to infection *H. annosum* there is an intensification of photosynthesis at all seedlings of a pine. The increase in a chlorophyll *a* begins for 9 day of pathogenesis and by 12 day it is observed already under influence of all investigated isolates. *Heterobasidion annosum* would cause also changes in synthesis of a chlorophyll *b* for 9 and 12 day of infection at action of the some isolates. Changes in the correlation chlorophylls *a/b* are found out, that speaks due to increase in synthesis of a chlorophyll *a*. As a result of penetration *H. annosum* into seedlings *P. sylvestris* synthesis of yellow pigments that specifies their protective role at attack of a plant by a fungus pathogen.