

УДК 581.1

**ВМІСТ ПРОЛІНУ І ТРИПТОФАНУ В ПРОРОСТКАХ
PINUS SYLVESTRIS L. І *PINUS PALLASIANA* D. DON
ПРИ ІНФІКУВАННІ ГРИБОМ
HETEROBASIDION ANNOSUM (FR.) BREF.**

© 2009 р. О. В. Чемеріс, М. І. Бойко

*Донецький національний університет
(Донецьк, Україна)*

Вивчали зміни вмісту проліну і триптофану в проростках *Pinus sylvestris*, одержаних з насіння різного забарвлення, та *Pinus pallasiana* за дії штама НА-6-96 *Heterobasidion annosum*. Вміст амінокислот в інфікованих проростках підвищувався. При цьому динаміка вмісту проліну і триптофану відрізнялася залежно від стійкості об'єктів до ураження патогеном.

Ключові слова: *Pinus sylvestris* L., *Pinus pallasiana* D. Don, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., триптофан, пролін

Однією з неспецифічних реакцій рослин на дію абіотичних і біотичних стресорів може бути активація катаболічного потоку, що супроводжується збільшенням вмісту в тканинах низькомолекулярних сполук, зокрема, вільних амінокислот (Колупаєв, 1995). Вміст окремих амінокислот, наприклад, проліну, за дії стресів, пов'язаних зі зневодненням рослин, може зростати в десятки разів (Акініна, Криворученко, 2006; Taylor, 1996). Такі ефекти пов'язані не стільки з посиленням протеолізу, скільки з активацією синтезу цієї амінокислоти (Кузнецов, Шевякова, 1999). Нагромадження проліну та деяких інших амінокислот, які виконують антиоксидантну, антиденатураційну, мембрано- та осмопротекторну функції, при абіотичних стресах розглядається як захисна реакція (Larson, 1988). Водночас нагромадження вільних амінокислот при інфікуванні патогенами може оцінюватися як ознака розвитку катаболічних процесів. Так, наприклад, вміст гліцину, аланіну, гістидину, триптофану та лізину у інфікованих штамом KB-82166 *Heterobasidion annosum* проростках *Pinus sylvestris* (без урахування кольору насінневої оболонки) був достовірно вищим порівняно зі здоровими (Бойко, 1996). Крім того, підвищення вмісту вільних

амінокислот з антиоксидантними властивостями може перешкоджати дії активних форм кисню і підвищувати чутливість рослин до інфекцій (Аверьянов, 1991). До амінокислот з антиоксидантними властивостями належать, зокрема, пролін і триптофан (Larson, 1988).

Серед фітопатогенів, що паразитують на хвойних деревах, особливо небезпечний гриб *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. – коренева губка. Цей гриб завдає значної шкоди лісовому господарству багатьох країн, у тому числі й України. Хвороба, яку він спричиняє, призводить до зниження продуктивності деревостанів і поступової загибелі лісу (Негруцкий, 1986; Федоров, 1984). Значна кількість соснових лісів Південного Сходу України мають штучне походження та інтенсивно інфікуються *H. annosum*. Для створення стійких хвойних насаджень необхідне порівняльне вивчення фізіолого-біохімічних процесів, які відбуваються у хворих та здорових рослинах, а також пізнання механізмів стійкості різних видів сосни до *H. annosum*.

Питанню стійкості проростків *Pinus sylvestris* L. (сосни звичайної) при інфікуванні *H. annosum* присвячено ряд робіт (Бойко, 1996; Кудінова, 2004). В літературних джерелах також зустрічаються поодинокі дані про вплив гриба на інших представників роду *Pinus* (Бойко, 1996; Чемеріс, Бойко, 2007; Чемеріс, Гладишева, 2008).

Зріле насіння *Pinus sylvestris*, на відміну від інших хвойних порід, має різноманітне забарвлення насіннєвої оболонки (Правдин, 1960; 1964). Насіння з одного дерева має стале забарвлення оболонки, яке не змінюється протягом життя. Не виключено, що ці дерева *P. sylvestris* можуть відрізнятися між собою за відповідними фізіолого-біохімічними показниками, зокрема, за стійкістю до *H. annosum*. Слід зазначити, що ця проблема недостатньо вивчена (Бойко, 1996; Кудінова, 2004) і потребує подальших досліджень. У зв'язку з цим метою даної роботи було вивчення зміни вмісту проліну і триптофану в проростках *P. sylvestris*, отриманих з насіння світлого та темного кольору, та *Pinus pallasiana* D.Don (сосни кримської) при інфікуванні грибом *H. annosum*.

МЕТОДИКА

У дослідженні було використане насіння *P. sylvestris* та *P. pallasiana*, що зростають в Краснолиманському лісгоспі Донецької області. Окремо вивчали реакцію проростків *P. sylvestris*, одержаних з насіння світлого та темного забарвлення та проростків *P. pallasiana* на інфікування грибом *H. annosum*. До групи насіння світлого забарвлення відібрали насіння таких кольорів: *plumbeus* (свинцевий), *cinereus griseus* (попелясто-сірий), *avallaneus* (горіховий); до групи насіння темного забарвлення – *brunneus* (темно-каштановий, бурий), *umbrinus* (умбровий), *niger* (чорний) (Мищенко, 1915). Проростки *P. sylvestris* та *P. pallasiana* вирощували на агаризованому середовищі Чапека-Докса (Гродзинский, Гродзинский, 1973) з вмістом глюкози не більше 3 г/л (Бойко, 1996). Проростки віком 21 доба інокулювали міцелієм штаму НА-6-96 *H. annosum*, взятим з колекції кафедри фізіології рослин Донецького національного університету. Вміст вільних амінокислот визначали в проростках на 6, 9 та 12 добу після інфікування їх штамом НА-6-96.

Вміст проліну визначали за методом Bates зі співавт. (Bates et al., 1973). Наважку рослинних тканин (проростки *P. sylvestris* або *P. pallasiana* без корінців) гомогенізували у дистильованій воді, кип'ятили протягом 10 хв. Екстракт фільтрували через паперовий фільтр. Фільтрат обробляли нінгідрином («Pharma industries», Індія), розчиненим в суміші оцтової та фосфорної кислот і кип'ятили протягом 1 год. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 520 нм. Вміст проліну визначали за калібрувальною кривою, побудованою за проліном («Synex Pharma», Китай).

Вміст триптофану визначали за методом Лоренцо-Андрю і Франдзена (Методы ..., 1987). Амінокислоту з наважки проростків *P. sylvestris* та *P. pallasiana* екстрагували сульфонітратною сумішшю на киплячій водяній бані протягом 1 год. Екстракт фільтрували через паперовий фільтр. Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 440 нм. Вміст триптофану визначали за калібрувальною кривою, побудованою за триптофаном («Synex Pharma», Китай).

Досліди проводили у триразовій повторності. Статистичну обробку отриманих даних проводили методом двофакторного дисперсійного аналізу (Приседський, 1999). На графіках наведені середні арифметичні величини та їх стандартні відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На 6-ту добу інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum* у проростків *P. sylvestris* з темного насіння мало місце підвищення вмісту проліну, але воно було статистично недостовірним (рис. 1). Достовірні відмінності порівняно зі здоровими проростками відзначено на 9-ту та 12-ту добу інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum*. У проростках *P. sylvestris* з темного насіння вміст проліну збільшувався у 1,5 та 3 рази порівняно з контролем на 9-ту та 12-ту добу інфікування, відповідно. Для проростків *P. sylvestris* зі світлого насіння на 6-ту добу після інокуляції рівень проліну в інфікованих і контрольних проростках істотно не відрізнявся. Достовірне збільшення вмісту проліну встановлено тільки на 9-ту та 12-ту добу інфікування (рис. 1).

У проростках *P. sylvestris* з темного насіння на 6-ту добу інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum* спостерігалось достовірне збільшення вмісту триптофану (рис. 2). На 9-ту та 12-ту добу інфікування вміст амінокислоти продовжував зростати (в 1,8 та 2,9 рази, відповідно) порівняно з контрольними проростками. У проростках *P. sylvestris* зі світлого насіння на 9-ту добу після інфікування штамом НА-6-96 спостерігалось достовірне збільшення вмісту триптофану в 1,5 рази порівняно зі здоровими проростками, а на 12-ту добу інфікування – в 2,2 рази (рис. 2).

Одержані результати свідчать, що реакція проростків *P. sylvestris* з темного насіння на інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum* є чутливішою порівняно з проростками зі світлого

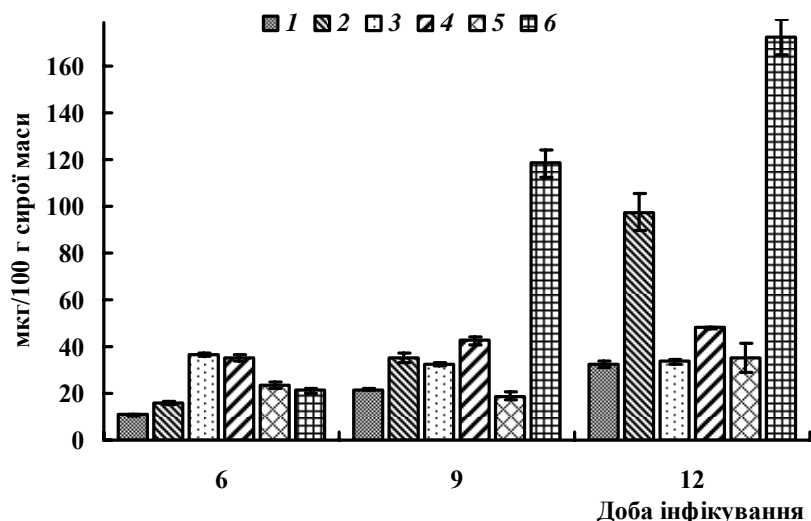


Рис. 1. Вміст проліну (мкг/100 г сирової маси) в проростках *Pinus sylvestris* та *Pinus pallasiana*, інфікованих штамом НА-6-96 *Heterobasidion annosum*.

Тут і на рис 2: 1 – здорові проростки *P. sylvestris* з насіння темного забарвлення, 2 – інфіковані проростки *P. sylvestris* з насіння темного забарвлення, 3 – здорові проростки *P. sylvestris* з насіння світлого забарвлення, 4 – інфіковані проростки *P. sylvestris* з насіння світлого забарвлення, 5 – здорові проростки *P. pallasiana*, 6 – інфіковані проростки *P. pallasiana*.

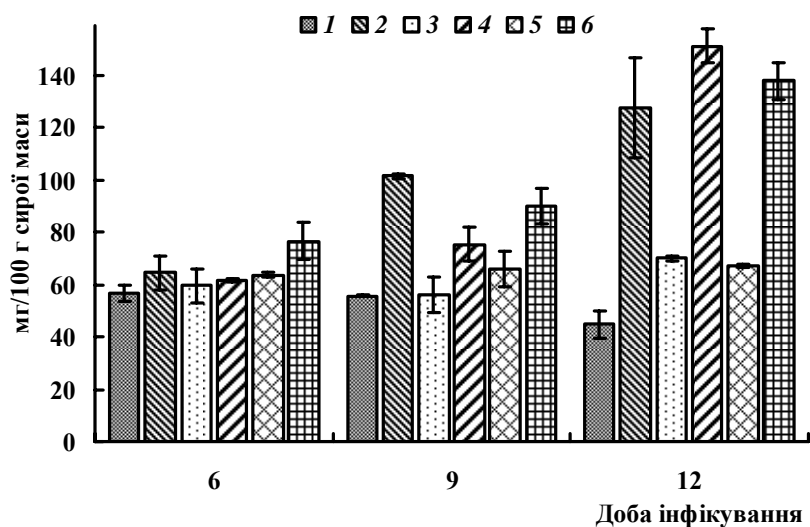


Рис. 2. Вміст триптофану (мг/100 г сирової маси) в проростках *Pinus sylvestris* та *Pinus pallasiana*, інфікованих штамом НА-6-96 *Heterobasidion annosum*.

Позначення як на рис. 1.

насіння, що виявляється у збільшенні вмісту проліну та триптофану.

На 6-ту добу інфікування штамом НА-6-96 *H. annosum* у проростках *P. pallasiana* не спостерігалось підвищення вмісту проліну порівняно з контролем (див. рис. 1). На 9-ту добу після інокуляції штамом гриба *H. annosum* вміст проліну в інфікованих проростках збільшувався в 6,3 раза, а на 12-ту добу – в 4,8 раза порівняно з контрольними проростками *P. pallasiana*.

На 6-ту добу інфікування штамом НА-6-96 проростків *P. pallasiana* достовірних відмінностей за вмістом триптофану між інфікованими та здоровими проростками не спостерігалось. На 9-ту добу інфікування відбувалось збільшення вмісту амінокислоти в 1,4 раза, а на 12-ту добу – в 2 рази порівняно з контролем (див. рис. 2).

На початковому етапі інфікування проростків *P. sylvestris* та *P. pallasiana* штамом НА-6-

ВМІСТ ПРОЛІНУ І ТРИПТОФАНУ

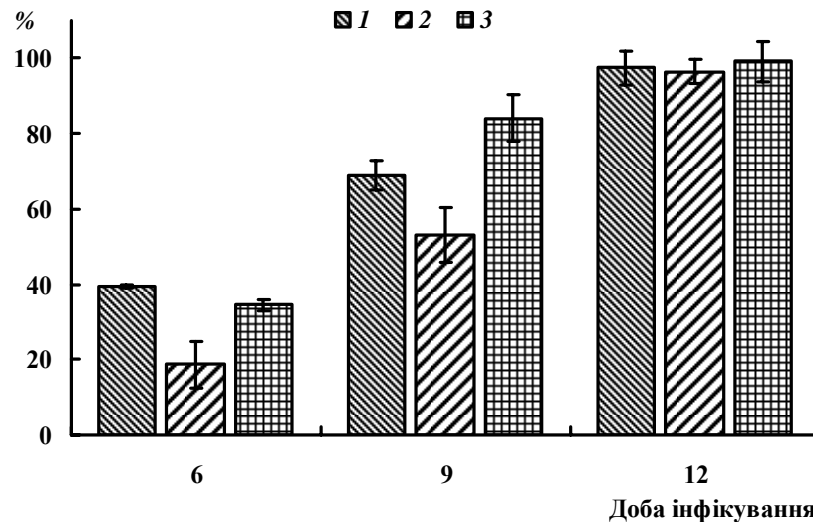


Рис. 3. Кількість (%) інфікованих проростків *Pinus sylvestris* та *Pinus pallasiana* штамом НА-6-96 *Heterobasidion annosum*.

1 – проростки *P. sylvestris* з насіння темного забарвлення, 2 – проростки *P. sylvestris* з насіння світлого забарвлення, 3 – проростки *P. pallasiana*.

96 візуальних відмінностей між хворими і здоровими проростками не було виявлено. Інфіковані проростки були міцні, яскраво-зеленого кольору. З часом уражені проростки *P. sylvestris* та *P. pallasiana* ставали жовтими, пожухлими, стебельця на рівні кореневої шийки підгнивали. Найменший ступінь ураження на 6-ту та 9-ту добу інфікування мали проростки *P. sylvestris* з насіння світлого забарвлення (рис. 3).

Отже, інфікування проростків *P. sylvestris* та *P. pallasiana* штамом НА-6-96 *H. annosum* викликало зростання вмісту проліну та триптофану. Підвищення вмісту амінокислот може свідчити про активне розщеплення білків рослини-хазяїна протеазами патогена. Проростки *P. sylvestris*, одержані з темного насіння, є більш чутливими і менш стійкими до ураження їх грибом *H. annosum*, ніж проростки зі світлого насіння. Це, можливо, пов'язано з більшим нагромадженням триптофану та, певною мірою, проліну, які мають антиоксидантні властивості, і, зв'язуючи активні форми кисню, пригнічують розвиток реакції опірності до інфікування грибом *H. annosum* (Аверьянов, 1991).

ЛІТЕРАТУРА

Аверьянов А.А. Активные формы кислорода и иммунитет растений // Успехи соврем. биологии. – 1991. – Т. 111, вып. 5. – С. 722-737.

Акініна Г.С., Криворученко Р.В. Зміни вмісту проліну в проростках пшениці у зв'язку з їх ростовою реакцією на осмотичний стрес // Вісн. Харків.

націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 2 (9). – С. 36-42.

Бойко М.І. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дереворуйнівних грибів: Дис. ... докт. біол. наук. – К., 1996. – 461 с.

Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений – Киев: Наукова думка, 1973. – 592 с.

Колупаев Ю.С. Низкомолекулярні сполуки азоту в рослинах за умов стресів: особливості метаболізму та можливе фізіологічне значення // Физиология и биохимия культ. растений. – 1995. – Т. 27, № 5-6. – С. 324-335.

Кудинова О.В. Фізіологічні реакції проростків *Pinus sylvestris* L. на інфекцію *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2004. – 18 с.

Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролін при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.

Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.

Мищенко П.И. Шкала цветов. Пособие для ботаников и зоологов при научных и научно-прикладных работах. – Петроград, 1915. – 14 с.

Негруцкий С.Ф. Корневая губка. – М.: Агропромиздат, 1986. – 196 с.

ЧЕМЕРИС, БОЙКО

Правдин Л.Ф. Основные закономерности географической изменчивости сосны (*Pinus sylvestris* L.) // Вопросы лесоведения и лесоводства. – М.: Изд-во АН СССР, 1960. – С. 245-250.

Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. – М.: Наука, 1964. – 192 с.

Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Каснопея, 1999. – 210 с.

Федоров Н.И. Корневые гнили хвойных пород. – М.: Лесн. пром-ть, 1984 – 161 с.

Чемерис О.В., Бойко М.И. Вміст триптофану в паростках *Pinus pallasiana* D.Don, інфікованих *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Сучасний стан і пріоритети розвитку фізіології рослин, генетики та біотехнології: Мат-ли X конф. молодих вчених (Київ, 25-26 жовтня 2007 року). – К., 2007. – С. 30-31.

Чемерис О.В., Гладішева Я.О. Зміна вмісту проліну в проростках *Pinus pallasiana* D.Don при інфікуванні грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Охорона навколишнього середовища та раціональне використання природних ресурсів / Зб. доп. VII Міжнар. наук. конф. асп. та студ. – Донецьк: ДонНТУ, ДонНУ, 2008. – Т. 1. – С. 293-294.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – V. 39. – P. 205-207.

Larson R.A. The antioxidants of higher plants // Phytochemistry. – 1988. – V. 27, № 4. – P. 969-978.

Taylor C.B. Proline and water deficit: Ups, Down, Ins and Outs // Plant cell. – 1996. – V. 8. – P. 1221-1224.

Надійшла до редакції
14.01.2009 р.

THE CONTENT OF PROLINE AND TRYPTOPHAN IN *PINUS SYLVESTRIS* L. AND *PINUS PALLASIANA* D.DON SEEDLINGS DURING THE INFECTION BY FUNGUS *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

O. V. Chemeris, M. I. Boyko

Donetsk National University
(Donetsk, Ukraine)

The changes of proline and tryptophan content in seedlings of *Pinus sylvestris*, received from varicoloured seeds, and *Pinus pallasiana* under the infection by *Heterobasidion annosum* strain HA-6-96 has been studied. The content of amino acids in infected seedlings increased. Thus the dynamics of proline and tryptophan content differed depending on resistance of objects to the infection by pathogen.

Key words: *Pinus sylvestris* L., *Pinus pallasiana* D.Don, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., tryptophan, proline

СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА И ТРИПТОФАНА В ПРОРОСТКАХ *PINUS SYLVESTRIS* L. И *PINUS PALLASIANA* D. DON ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБОМ *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.

О. В. Чемерис, М. И. Бойко

Донецкий национальный университет
(Донецк, Украина)

Изучали изменения содержания пролина и триптофана в проростках *Pinus sylvestris* из семян разной окраски и *Pinus pallasiana* при действии штамма HA-6-96 *Heterobasidion annosum*. Содержание аминокислот в инфицированных проростках достоверно повышалось. При этом динамика содержания пролина и триптофана отличалась в зависимости от устойчивости объектов к заражению патогеном.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., *Pinus pallasiana* D.Don, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., триптофан, пролин