

УДК 581.1

ИНДУЦИРОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ДЕЙСТВИЕМ ДОНОРА NO НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ.

1. ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНФЕКЦИОННОМУ ПОЛЕГАНИЮ

© 2018 г. Ю. В. Карпец, М. А. Шкляревский, А. А. Луговая

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)

Исследовали влияние донора оксида азота (NO) нитропрусида натрия (НПН) на устойчивость растений сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на раннем этапе развития к инфекционному полеганию. Четырехкратное опрыскивание сеянцев растворами НПН, которое проводили каждые 10 дней, начиная с 20-го дня от посева в почву, существенно повышало устойчивость растений к инфекционному полеганию. Наиболее заметный положительный эффект оказывала обработка растений растворами НПН в концентрациях 0,2 и 0,5 мМ, при использовании которых количество непораженных сеянцев было в 5-6 раз большим по сравнению с контролем. В этих же концентрациях проявлялось ростстимулирующее влияние НПН на здоровые растения сосны. Под влиянием опрыскивания сеянцев растворами НПН в концентрациях 0,2, 0,5 и 2 мМ отмечалось повышение содержания хлорофиллов и антоцианов, а также тенденция к увеличению количества каротиноидов. Сделано заключение о перспективности использования обработки сеянцев сосны НПН для повышения их устойчивости к инфекционному полеганию и усиления роста на ранних фазах развития.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, инфекционное полегание, оксид азота, нитропруссид натрия, устойчивость, рост

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – главная лесообразующая порода в Украине. Выращивание сеянцев и саженцев древесных пород для целей лесовосстановления и лесоразведения входит в число основных задач лесного хозяйства страны. Ежегодно на лесокультурных объектах из-за инфекционных болезней и влияния неблагоприятных климатических факторов гибнут миллионы молодых растений, что приводит к значительным убыткам.

К наиболее распространенным и опасным болезням хвойных пород в питомниках Украины относится инфекционное полегание, вызываемое грибами родов *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp., *Botrytis* spp. и др. При значительном поражении может выпасть 30-45%, а в отдельных случаях 85-

100% растений (Кузьмичев, 2004; Соколова, Галасьева, 2005).

Полегание характерно для молодых сеянцев сосны в возрасте до двух месяцев. Чаще всего в корневой шейке погибших сеянцев обнаруживаются виды рода *Fusarium*. В большинстве случаев это *F. avenaceum* var. *herbarum*, *F. sporotrichiella* var. *Sporotrichioides* и *F. oxysporum* var. *orthoceras* (Якименко, Городничкая, 1996; Городничкая, Кузнецова, 2012).

В производственной практике для борьбы с грибными инфекциями сосны на ранних фазах развития используются преимущественно различные протравители фунгицидного действия, что не относится к экологически безопасным приемам.

Для повышения устойчивости к грибным болезням в растениеводстве как альтернативу протравителям используют соединения, способные индуцировать собственные защитные реакции растений, в частности, салициловую кислоту (Васюкова, Озерецковская, 2007) и до-

Адрес для корреспонденции: Карпец Юрий Викторович, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, Харьков, 62483, Украина;
e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

норы сигнальной молекулы оксида азота (Жук та ін., 2017). В то же время влияние таких соединений на устойчивость сосны к патогенам остается малоисследованным. Так, лишь в единичных работах показано положительное влияние салициловой кислоты на устойчивость сосны обыкновенной к корневой губке (Чемеріс, Бойко, 2010) и возбудителям инфекционного полегания (Карпец та ін., 2014). В то же время влияние оксида азота на устойчивость сосны к таким инфекциям остается вообще не исследованными, несмотря на давно доказанное участие NO в формировании защитных реакций растений против патогенов, которое происходит при его тесном функциональном взаимодействии с активными формами кислорода и салициловой кислотой (Delledonne et al., 2001; Zaninotto et al., 2006). Важной особенностью оксида азота как сигнальной молекулы является его роль в формировании устойчивости растений не только к патогенам, но и ко многим абиотическим стрессорам (Song et al., 2006; Zhang et al., 2009; Карпец и др., 2015; Oz et al., 2015). Это создает возможности для индуцирования устойчивости растений сразу к нескольким неблагоприятным факторам различной природы. Для практических целей эффективнее использовать не газообразный оксид азота, а его стабильные доноры (Wang et al., 2002). Одним из наиболее распространенных и доступных из них является нитропруссид натрия (НПН).

Целью первого этапа работы было исследование влияния опрыскивания семян сосны обыкновенной донором NO НПН на их устойчивость к инфекционному полеганию и ростовые процессы.

МЕТОДИКА

Влияние обработки семян и опрыскивания семян сосны НПН на их устойчивость к инфекционному полеганию исследовали в условиях лабораторной почвенной культуры на естественном инфекционном фоне.

Семена сосны обыкновенной высевали по 300 шт. в пластиковые кюветы с супесчаной лесной почвой (условия В₂дС). Сеянцы выращивали при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха $60 \pm 10\%$, освещенности 6 клк (фотопериод 14 ч) с умеренным ежедневным поливом (Карпец та ін., 2014).

Опрыскивание семян сосны соответствующих вариантов растворами НПН в концентрациях 0,2, 0,5, 2,0 и 5,0 мМ проводили через каждые 10 дней, начиная с 20-х суток после

посева в почву. Контрольные растения опрыскивали дистиллированной водой.

Количество непораженных инфекциями сеянцев находили путем сплошного учета в каждой биологической повторности. Высоту надземной части растений вычисляли как среднюю арифметическую измерений 30 сеянцев или же, при остатке меньшего количества, всех сеянцев биологической повторности. Указанные показатели определяли, начиная с 20 суток после посева семян в почву с интервалом в 10 дней до 60 суток наблюдений. Фактически это период от появления признаков инфекционного полегания до полного прекращения болезни. Перед каждым определением все пораженные сеянцы удалялись из кювет.

Выделение грибов из почвы и семян осуществляли стандартными микологическими методами (Методы ..., 1982).

В определенные временные точки после опрыскивания растений НПН определяли спектрофотометрическим методом содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов), которые экстрагировали из надземной части сеянцев этанолом (Шлык, 1971). Содержание пигментов выражали в мг/г сухой массы.

В отдельных навесках в это же время определяли содержание флавоноидов с максимумом поглощения в УФ-В области и антоцианов. Надземную часть сеянцев гомогенизировали в 1% растворе HCl в метаноле, гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g и измеряли значения оптической плотности супернатанта при 300, 530 и 657 нм (Pietrini, Massacci, 1998; Nogues, Baker, 2000).

Эксперименты проводили независимо дважды в 4-кратной биологической повторности. Приведены средние величины и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Положительное влияние обработки НПН в концентрациях 0,2, 0,5 и 2 мМ на рост проростков сосны обыкновенной проявлялось на 30-е сутки после посева, то есть уже через 10 дней после первого опрыскивания (рис. 1). Наиболее заметные ростовые эффекты НПН наблюдались на 40-60-е сутки. Донор оксида азота в концентрациях 0,2, 0,5 и 2,0 мМ способствовал повышению накопления сырой и сухой массы надземной части сеянцев, которую определяли в конце эксперимента (на 60-е сутки)

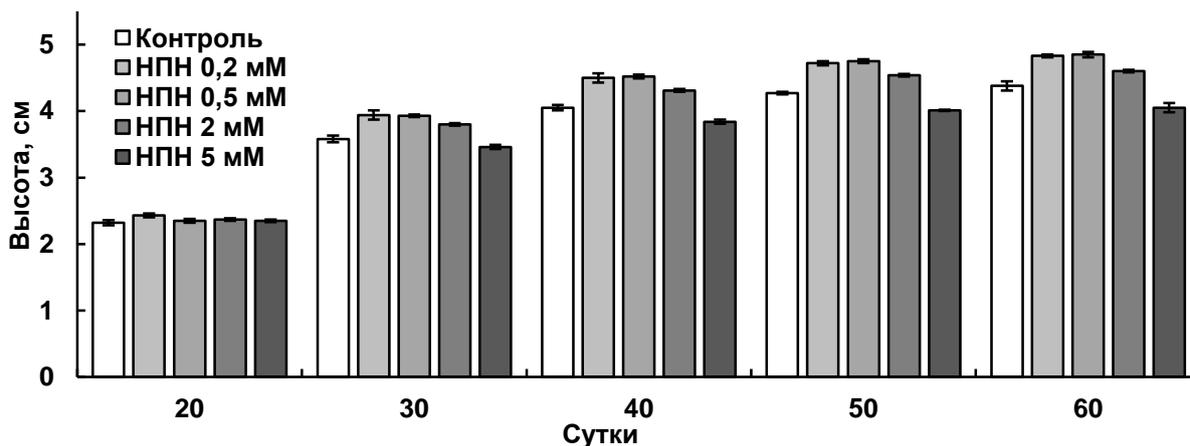


Рис. 1. Влияние НПН на линейный рост сеянцев сосны обыкновенной.

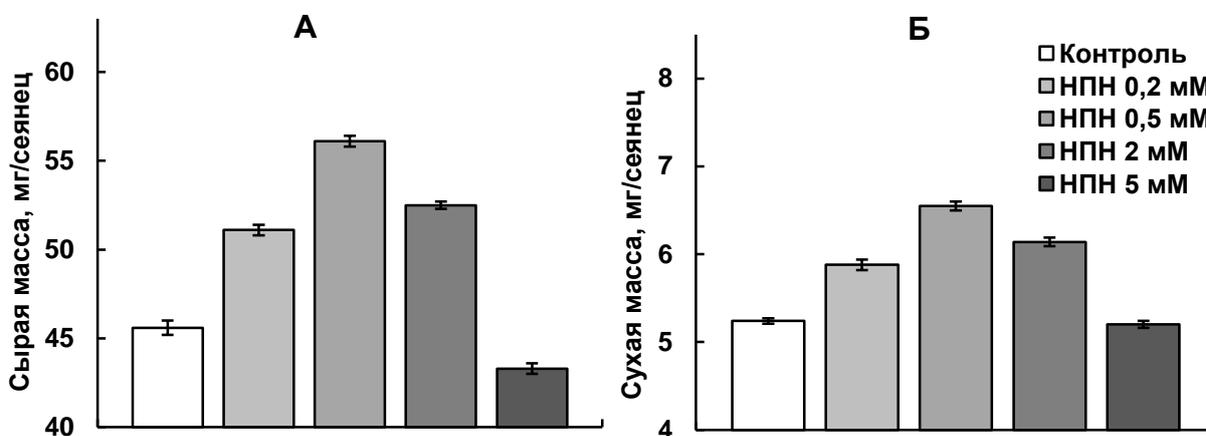


Рис. 2. Влияние НПН на накопление сырой (А) и сухой (Б) биомассы сеянцами сосны обыкновенной.

(рис. 2). Максимальный эффект проявлялся при использовании концентрации НПН 0,5 мМ.

Самая высокая концентрация донора NO (5 мМ) оказывала ингибирующее влияние на рост, при этом проявлялись внешние признаки токсического эффекта – пожелтение кончиков хвоинок.

Подавляющее большинство патогенов, выделяемых из корневых шеек полагающих растений, составляли грибы рода *Fusarium*, также встречались грибы родов *Botrytis* и *Alternaria*. Опрыскивание НПН в оптимальных (ростстимулирующих) концентрациях (0,2, 0,5 и 2 мМ) оказало значительное положительное влияние на устойчивость растений к инфекционному полеганию (рис. 3). Уже после первой обработки НПН (30-е сутки после посева) была заметна тенденция к уменьшению количества поражения сеянцев в вариантах с НПН в кон-

центрациях 0,2, 0,5 и 2,0 мМ. Достоверное положительное влияние НПН на устойчивость сеянцев проявлялось на 40-е, 50-е и 60-е сутки наблюдений. Наиболее заметный эффект в конце наблюдений (на 60-е сутки) наблюдался при использовании НПН в концентрациях 0,2 и 0,5 мМ. В этих вариантах количество непораженных сеянцев было в 5-6 раз большим по сравнению с контролем (рис. 3, 4).

Известно, что одним из интегральных маркеров физиологического состояния растений является содержание фотосинтетических пигментов в их надземной части (Santos, 2004). В связи с этим через 5 суток после каждой обработки НПН определяли содержание хлорофиллов и каротиноидов. С увеличением возраста растений во всех вариантах опыта отмечалось снижение содержания хлорофилла *a* и увеличение количества хлорофилла *b* (рис. 5).

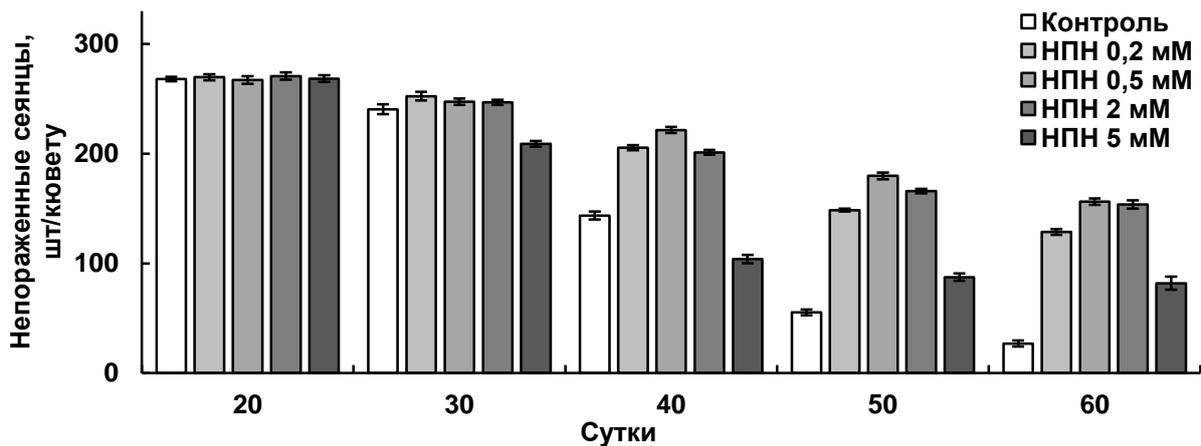


Рис. 3. Влияние НПН на динамику поражения сеянцев сосны обыкновенной инфекционным полеганием.



Контроль НПН0,2мМ НПН0,5мМ НПН2мМ НПН5мМ

Рис. 4. Внешний вид сеянцев сосны обыкновенной при влиянии НПН на 60-е сутки эксперимента.

Суммарное содержание хлорофиллов в контроле существенно не изменялось. В оптимальных концентрациях (0,2, 0,5 и 2 мМ) НПН способствовал повышению содержания хлорофиллов, особенно заметно увеличивалось количество хлорофилла *a*. Положительные эффекты проявились на всех точках наблюдений, особенно

заметными они были на 35-й и 45-й дни эксперимента (рис. 5). В то же время при использовании высокой концентрации НПН (5 мМ) на 25-й и 55-й дни эксперимента содержание хлорофиллов было ниже, чем в контроле.

Обработка НПН не оказывала достоверного влияния на содержание каротиноидов в

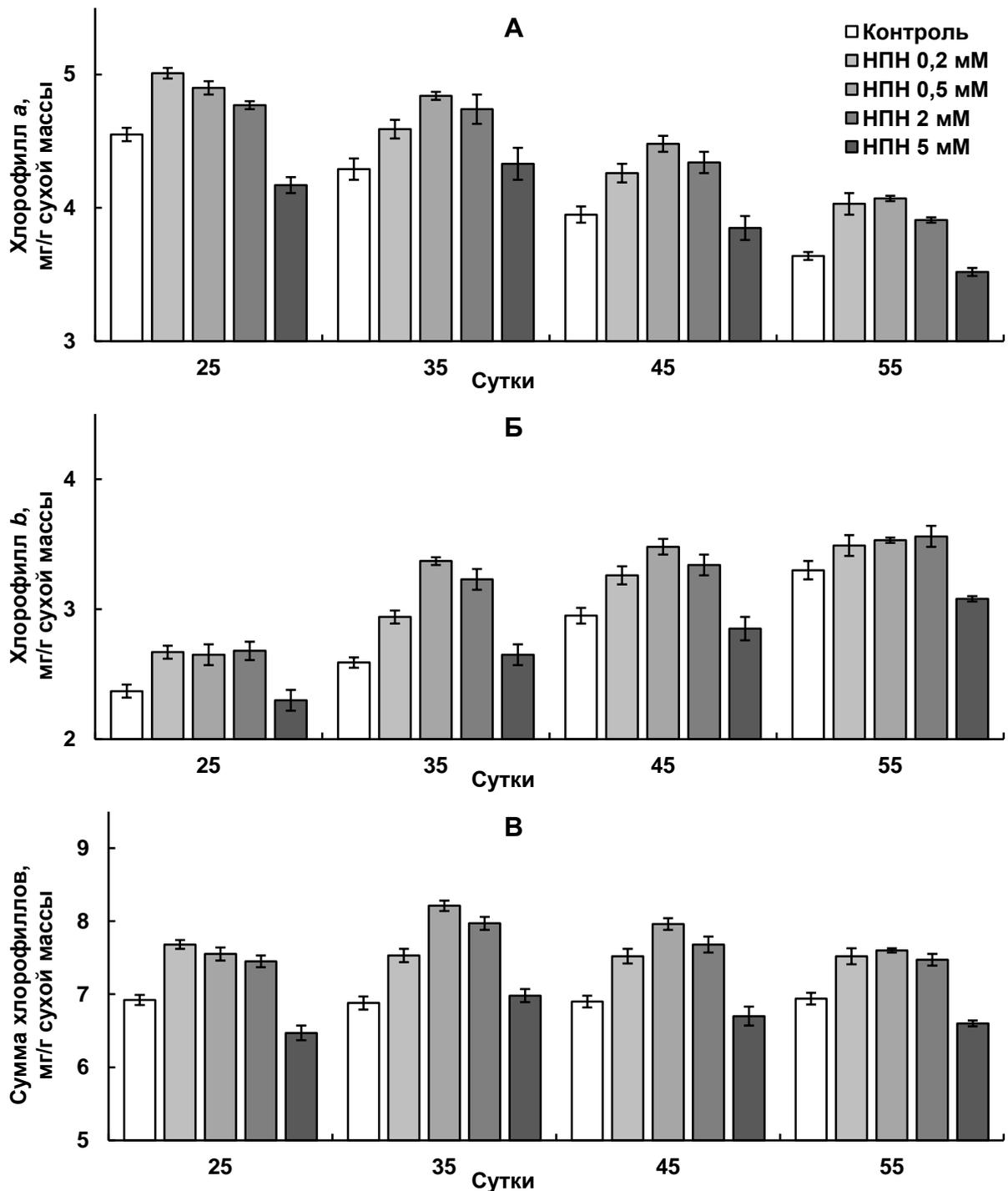


Рис. 5. Влияние НПН на содержание хлорофиллов в сеянцах сосны обыкновенной. А, Б, В – содержание хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и суммарное содержание хлорофиллов, соответственно.

течение всего периода наблюдений (рис. 6). Хотя после первой обработки донором NO наблюдалась тенденция к повышению этого показателя в вариантах с обработкой 0,2, 0,5 и 2 мМ растворами. В последней временной точке (на 55-е сутки) проявлялась тенденция к небольшому увеличению содержания каротиноидов в сеянцах всех вариантов с обработкой НПН (рис. 6).

Также изучали динамику содержания флавоноидных соединений, которые могут играть протекторную роль у растений при поражении патогенами (Макаренко, Левицкий, 2013) и синтез которых может усиливаться под влиянием оксида азота (Palmieri et al., 2008).

В первых двух временных точках (25 и 35 сутки) существенных отличий содержания антоцианов в тканях сеянцев сосны по сравнению

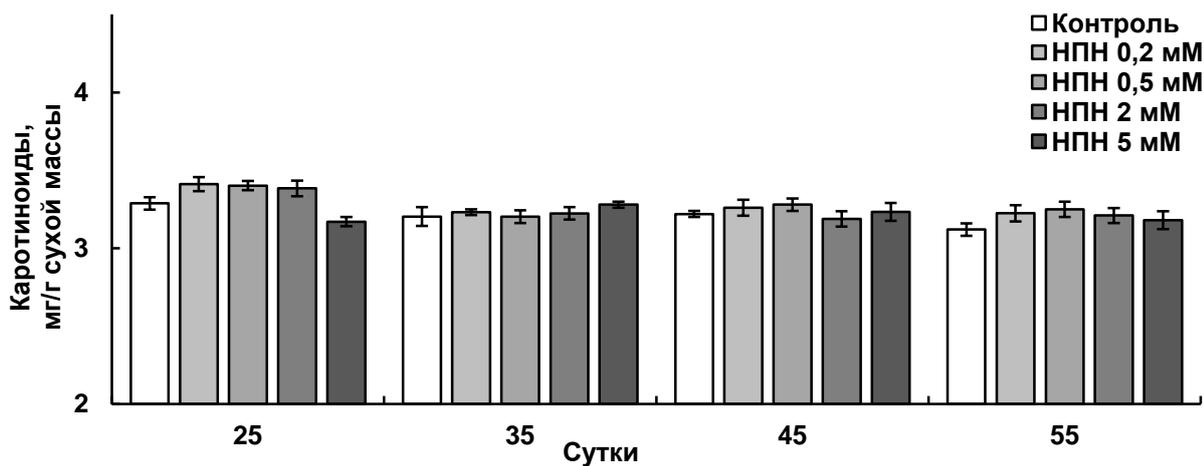


Рис. 6. Влияние НПН на содержание каротиноидов в сеянцах сосны обыкновенной.

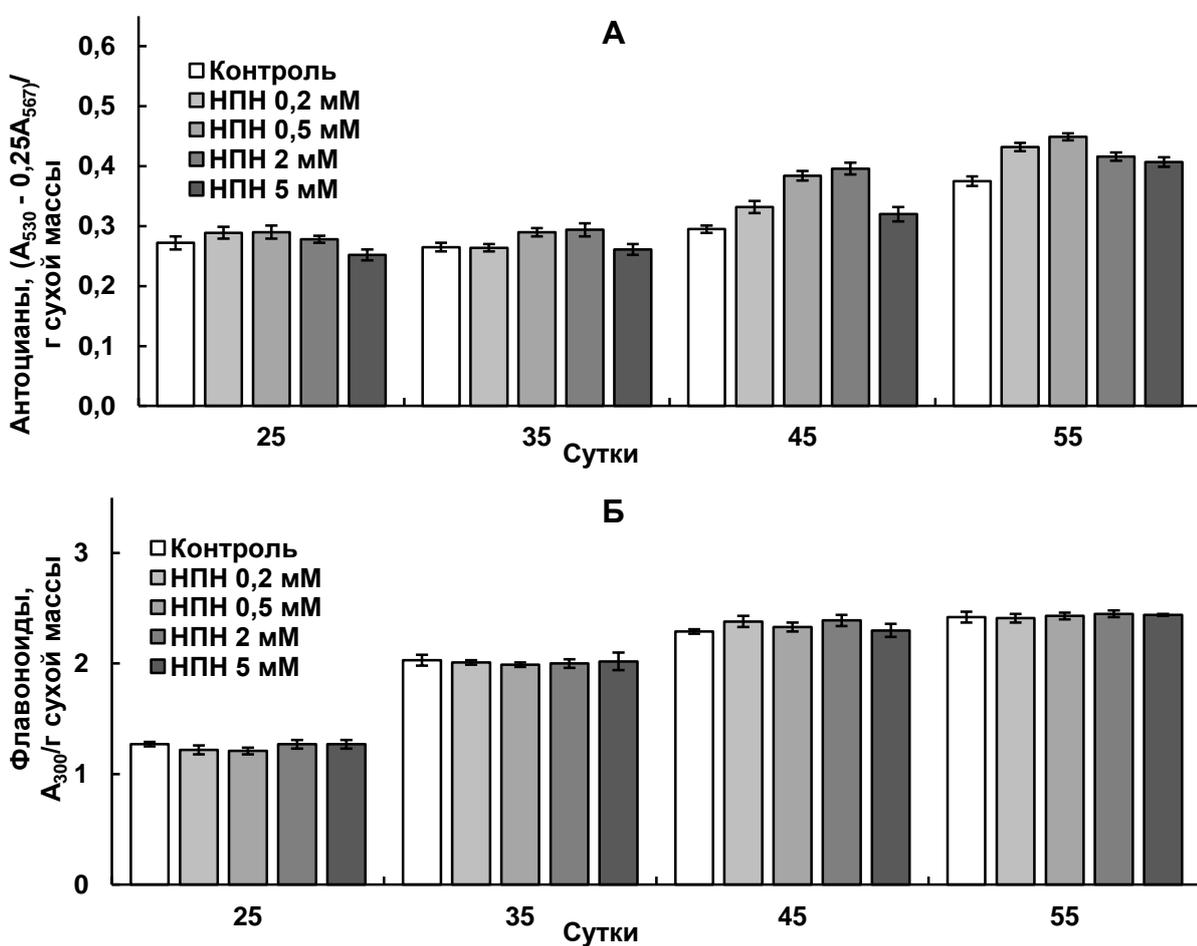


Рис. 7. Влияние НПН на содержание флавоноидных соединений в сеянцах сосны обыкновенной. А, Б – содержание антоцианов и флавоноидов с максимумом поглощения в УФ-В области, соответственно.

с контролем не было, хотя на 25-е сутки проявлялась тенденция к увеличению их содержания в вариантах с 0,2 и 0,5 мМ НПН, а на 35 сутки – с 0,5 и 2,0 мМ (рис. 7). Достоверное повышение количества антоцианов было зафиксировано на 45 и 55-е сутки при обработке НПН в концентрациях 0,2, 0,5 и 2,0 мМ. При этом обработка донором NO практически не влияла на содержание «бесцветных» флавоноидов в тканях семян на протяжении всего эксперимента (рис. 7).

Таким образом, в целом обработка НПН проявляла ростактивирующее влияние на семена и повышала содержание в них фотосинтетических пигментов и антоцианов. При этом под влиянием НПН значительно повышалась устойчивость семян к инфекционному полеганию. Показано, что оксид азота как сигнальная молекула, оказывает влияние на многие защитные реакции растений против патогенов, в частности способствует формированию барьеров, уменьшающих их проникновение в органы и клетки (Pieterse et al, 1998; Mittler et al, 2002). Однако для выяснения конкретных механизмов влияния НПН на устойчивость сосны обыкновенной к инфекционному полеганию необходимы специальные исследования.

В целом, положительное влияние НПН на устойчивость сосны к грибным инфекциям, вызывающим полегание, сопоставимо с показанными ранее эффектами салициловой кислоты (Карпец та ін., 2014). Однако донор оксида азота способствовал не только повышению относительного количества сохраненных семян, но и усиливал их рост. В связи этим обработку семян сосны обыкновенной донором оксида азота НПН можно рассматривать как прием, перспективный для практики лесного хозяйства. При этом целесообразно изучение влияния донора NO на устойчивость сосны обыкновенной к абиотическим стрессорам. Результаты наших исследований влияния НПН на устойчивость сосны к засухе приводятся в следующем сообщении этой серии.

ЛИТЕРАТУРА

Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 405-411.

Гродницкая И.Д., Кузнецова Г.В. Заболевания *Pinus sylvestris* L. и *Pinus sibirica* Du Tour в географических культурах и лесных питомниках Красноярского края и Хакасии // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. 27, № 3-4, С. 55-60.

Жук І.В., Лісова Г.М., Дмитрієв О.П. Вплив щавлевої кислоти та нітропрусиду натрію на продуктивність і стійкість озимої пшениці до збудників септоріозу та бурої іржі // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2017. – Вип. 2 (41). – С. 68-77.

Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Ястреб Т.О. Влияние нитропрусида натрия на пигментный комплекс листьев и продуктивность проса в неблагоприятных условиях // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 3 (36). – С. 38-44.

Карпец Ю.В., Вайнер А.О., Обозний О.І., Ястреб Т.О. Індукування стійкості сянців сосни звичайної до інфекційного вилягання дією екзогенної саліцилової кислоти // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2014. – Вип. 2 (32). – С. 63-69.

Кузьмичев Е.П., Соколова Э.С., Мозолевкая Е.Г. Болезни древесных растений: Справочник. – М.: ВНИИМ, 2004. – 120 с.

Макаренко О.А., Левицкий А.П. Физиологические функции флавоноидов в растениях // Физиология и биохимия культурных растений. – 2013. – Т. 45, № 2. – С. 100-112.

Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.

Соколова Э.С., Галасьева Т.В. Грибные болезни хвойных пород в питомниках и молодняках. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2005. – 43 с.

Чемеріс О.В., Бойко М.І. Активність пероксидази в інфікованих грибом *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. проростках *Pinus sylvestris* L. та *Pinus palasiiana* D. Дон за попередньої обробки насіння саліциловою кислотою // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42, № 4. – С. 348-355.

Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой. – М.: Наука, 1971. С. 154–170.

Якименко Е.Е., Гродницкая И.Д. Инфекционное полегание семян хвойных в лесных питомниках Красноярского края // Микология и фитопатология. – 1996. – Т. 30, вып. 2. – С. 56.

Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 13454-13459.

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P.405-410.

Оз М.Т., Ейдогоан Ф., Юцел М., Октем Н.А. Functional role of nitric oxide under abiotic stress conditions // Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in

ИНДУЦИРОВАНИЕ... 1. ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНФЕКЦИОННОМУ ПОЛЕГАНИЮ

- Plants / Eds. M.N. Khan et al. – Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015. – P. 21-42.
- Nogues S., Baker N.R. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under UV-B radiation // J. Exp. Bot. – 2000. – V. 51. – P. 1309-1317.
- Pieterse C.M., van Wees S.C., van Pelt J.A., Koesler M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P.J., van Loon L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis* // The Plant Cell. – 1998. – V. 10. – P. 1571-1580.
- Pietrini F., Massacci A. Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: Significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation // Photosynthesis Res. – 1998. – V. 58. – P. 213–219.
- Santos C.V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves // Sci. Horticult. – 2004. – V. 103. – P. 93-99.
- Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed // Plant Sci. – 2006. – V. 171. – P. 449-458.
- Wang P.G., Xian M., Tang X., Wu X., Wen Z., Cai T., Janczuk A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications // Chem. Rev. – 2002. – V. 102. – P. 1091-1134.
- Zaninotto F., Camera S.L., Polverari A., Delledonne M. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response // Plant Physiol. – 2006. – V. 141. – P. 379-383.
- Zhang L., Zhou S., Xuan Y., Sun M., Zhao L. Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation // J. Plant Biol. – 2009. – V. 52. – P. 135-140.

Поступила в редакцию
12.01.2018 г.

INDUCTION OF NONSPECIFIC RESISTANCE OF SCOTCH PINE SEEDLINGS UNDER INFLUENCE OF NO DONOR SODIUM NITROPRUSSIDE. 1. INCREASE OF RESISTANCE AGAINST ROOT ROT DISEASE

Yu. V. Karpets, M. A. Shklyarevskiy, G. A. Lugova

*Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)*

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

The influence of donor of nitric oxide (NO) sodium nitroprusside (SNP) on resistance of plants of Scotch pine (*Pinus silvestris* L.) at the early stage of development against coniferous root rot disease have been investigated. Four-time spraying of seedlings with SNP solutions, which was carried out by each 10 days since 20th day from crops to the soil, significantly increased resistance of plants against root rot. The most noticeable positive effect was rendered by treatment of plants with SNP solutions in concentration of 0,2 and 0,5 mM, at which the quantity of not affected seedlings was by 5-6 times larger in comparison with control. In the same concentration the growth stimulating influence of SNP on healthy plants of pine was shown. Under the influence of spraying of seedlings with SNP solutions in concentration of 0,2, 0,5 and 2 mM the increase in content of chlorophyll and anthocyanins, and also the tendency to increase of carotenoids amount were noted. The conclusion about prospects of use of treatment of pine seedlings with SNP for the increase in their resistance to root rot and intensifying of growth on early phases of development is made.

Key words: *Pinus silvestris, coniferous root rot disease, nitric oxide, sodium nitroprusside, resistance, growth*

**ІНДУКУВАННЯ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ СТІЙКОСТІ
СІЯНЦІВ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ДІЄЮ ДОНОРА NO НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ.
1. ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ІНФЕКЦІЙНОГО ВИЛЯГАННЯ**

Ю. В. Карпець, М. А. Шкляревський, Г. А. Лугова

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)*

E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Досліджували вплив донора оксиду азоту (NO) нітропрусида натрію (НПН) на стійкість рослин сосни звичайної (*Pinus silvestris* L.) на ранньому етапі розвитку до інфекційного вилягання. Чотириразове обприскування сіянців розчинами НПН, яке проводили кожні 10 днів, починаючи з 20-го дня від висіву у ґрунт, істотно підвищувало стійкість рослин до інфекційного вилягання. Найбільш помітний позитивний ефект чинила обробка рослин розчинами НПН у концентраціях 0,2 і 0,5 мМ, при використанні яких кількість неуражених сіянців була у 5-6 разів більшою порівняно з контролем. У цих же концентраціях виявлявся рістстимулюючий вплив НПН на здорові рослини сосни. Під впливом обприскування сіянців розчинами НПН у концентраціях 0,2, 0,5 і 2 мМ спостерігалось підвищення вмісту хлорофілів і антоціанів, а також тенденція до збільшення кількості каротиноїдів. Зроблено висновок про перспективність використання обробки сіянців сосни НПН для підвищення їх стійкості до інфекційного вилягання і посилення росту на ранніх фазах розвитку.

Ключові слова: *Pinus silvestris*, інфекційне вилягання, оксид азоту, нітропрусид натрію, стійкість, ріст