

УДК 581.2.07

**ВЛИЯНИЕ РЖАВЧИННОГО ГРИБА *UROMYCES GERANII* (DC.) LEV.
НА ФЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФЕНОЛЬНЫЙ СОСТАВ
GERANIUM SANGUINEUM L. (GERANIACEAE)**

Присянникова И.Б., Гришкова В.И., Федотова А.Ю.

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: arhanisomenon@mail.ru*

Приведены данные по влиянию ржавчинного гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на состояние ценопопуляции *Geranium sanguineum* L. Изучено влияние гриба на распространенность и интенсивность поражения *G. sanguineum*. Выявлена зависимость феноспектра растения-хозяина от стадии развития *U. geranii*. Изучено влияние *U. geranii* на содержание фенольных соединений в растениях *G. sanguineum*.

Ключевые слова. ржавчинный гриб *Uromyces geranii*, питающее растение *Geranium sanguineum*, распространенность и интенсивность поражения, феноспектры, фенольные соединения.

ВВЕДЕНИЕ

Климат Крымского полуострова в целом благоприятен для развития как сосудистых растений, так и для трофически связанных с ними грибов-паразитов и сапрофитов. Ржавчинные грибы (порядок Uredinales, класс Teliomycetes, отдел Basidiomycota) являются облигатными паразитами высших растений и насчитывают 7798 видов [1]. В настоящее время для Горного Крыма приводится 116 видов ржавчинных грибов [2]. Сведения об уредофлоре Крыма постоянно пополняются новыми данными. Изучение взаимодействия гриба-паразита и растения-хозяина, а также уточнение биологических особенностей жизненного цикла паразитического организма является актуальной научной проблемой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью нашей работы явилось изучение влияния ржавчинного гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на состояние ценопопуляции *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae). Исследования проводили в окрестностях пгт. Научный Бахчисарайского района АР Крым на вершине одного из отрогов горы Сель-Бухра (658,2 м н.у.м.) в течение 2011–2013 гг. на двух однородных пробных площадях по 100 м² каждая. Нами были случайным образом выделены по 20 учетных площадок площадью 1 м². Природная растительность известняковой горы Сель-Бухра представлена дубовопушистым-можжевельным редколесьем [3], где *G. sanguineum* образует довольно крупные многочисленные куртины.

Согласно картосхеме географического районирования Крыма пгт. Научный расположен в Горном Крыму [4]. Общий ареал *G. sanguineum* – европейско-

средиземноморский, вид распространен преимущественно в Горном Крыму. Биоморфа: аэропедофит, литофит; поликарпическая летне-зимнезеленая полурозеточная трава с симподиальным ветвлением побегов, кистекорневая, среднекорневищная, ранне-среднелетняя. Экоморфа: ксеромезофит; сциогелиофит; гликофит; медоносное, витаминоносное, техническое, довольно часто встречаемое в Горном Крыму растение [5].

Идентификацию образцов *U. geranii* на листьях *G. sanguineum* проводили стандартным методом с помощью определителя [6], а название растения-хозяина представлено по литературе [7]. Объект изучения – растения *G. sanguineum*, пораженные ржавчинным грибом *U. geranii*. Варианты опыта: контроль – здоровое растение, опыт – пораженное грибом *U. geranii*. Распространение и развитие болезни рассчитывали с использованием общепринятых в фитопатологии методов [8].

С целью выявления возможных фунгицидных свойств нового препарата (нанобиокомпозита на основе серебра и природных биополимеров), разработанного на базе Биотехнологического центра Таврического национального университета им. В.И. Вернадского [9], на протяжении двух вегетационных сезонов 2011–2012 гг. нами была проведена трехкратная (с интервалом в 10 дней) обработка заложенных учетных площадок указанным веществом в течение мая–июня путем опрыскивания надземной массы растений.

Определение фенольных соединений. Растительный материал высушивали в хорошо проветриваемом помещении при комнатной температуре до состояния ломкости. Растения были разделены на листья и стебли, каждый образец был тщательно размельчен, а затем перетерт с песком до порошкообразного состояния для максимального извлечения экстрагируемых веществ. Экстракцию проводили 70% водным раствором изопропилового спирта в соотношении 1:10 при температуре 100 °С. Далее экстракт был охлажден и настоян в течение суток.

Хроматографические методики. Одномерная хроматография. ТСХ-анализ выполняли на пластинках «Silufol» (Чехословакия). Экстракты органов растения двух образцов нанесли на хроматографическую пластину. Одномерный ТСХ-анализ проводили параллельно в двух системах: хлороформ-метанол-вода (7:3:0,5) и хлороформ-метанол-аммиак (7:3:1).

Двумерная хроматография. Двумерный ТСХ-анализ экстрактов проводился на пластинках «Silufol», разделение веществ в направлении «1» осуществлялось в нейтральной хроматографической системе растворителей, а разделение в перпендикулярном направлении «2» – осуществлялось в щелочной системе растворителей. В качестве нейтральной системы использовали смесь хлороформ-метанол-вода (7:3:0,5); в качестве щелочной хлороформ-метанол-25%-ный водный аммиак (6:4:1). Детектировали флюоресценцию и разделение фенольных соединений излучением УФ-лампы со светофильтром, выделяющим длинноволновое УФ-излучение (365 нм) [10, 11]. Полученные данные обрабатывались общепринятыми методами математической статистики при уровне достоверности $P=0,05$ [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотрофный ржавчинный гриб *U. geranii* на *G. sanguineum* относится к семейству Русциниaceae. Спермогонии развиваются на обеих сторонах листьев, в небольших группах среди эциев на желтых пятнах, шаровидные, мелкие, 135–150 мкм шириной, оранжевые или коричневые (рис. 1).

Эции развиваются на нижней стороне листьев, на жилках и черешках, в округлых или продолговатых неплотных группах на небольших округлых или удлинённых, утолщённых, желтых или коричневых пятнах, иногда расположенные по кругу, округлые, 0,2–0,3 мм в диаметре, желтые. Эциоспоры – эллипсоидные или яйцевидные, 22–38 x 18–25 мкм, оранжевые; оболочка около 2 мкм толщиной, бесцветная, густо- и мелкобугорчатая. Урединии на нижней стороне листьев, реже на черешках, стеблях и цветоножках, редко рассеянные или в небольших группах, иногда расположенные по кругу, на желтовато-красноватых, или коричневых пятнах, округлые или продолговатые, 1–2 мм длиной, порошачие, коричневые. Телии подобны урединиям, но только более темноокрашенные. Телиоспоры эллипсоидные или округлые, 26–40 x 21–25 мкм; оболочка около 2–3 мкм толщиной, каштаново-бурая, гладкая, с проростковой порой на вершине, прикрытой бесцветным полушаровидным сосочком 6–9 мкм шириной и 5–9 мкм высотой, ножка короткая, бесцветная, ломкая. Нами отмечено наличие деформаций в виде искривлений и уплотнений на пораженных грибом *U. geranii* органах растения-хозяина (рис. 1).



Рис. 1. Ржавчинный гриб *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на листьях *Geranium sanguineum* L. (фото ориг.): спермогонии на верхней стороне листа; эции на нижней стороне листа.

Как видно из данных таблицы 1, средний показатель распространения болезни (Р) в 2011 году в популяции *G. sanguineum* на всех пробных площадях составил 99,2%; в 2012 году мы наблюдали снижение этого показателя до 26,8%. Интенсивность поражения растений (R) также снизилась с 27,2% в 2011 году до 3,2% в следующем году, соответственно.

Таблица 1
Характеристика распространенности и степени поражения *Geranium sanguineum* L. ржавчинным грибом *Uromyces geranii* (DC.) Lév.

Год	Среднее количество растений, шт/м ²	Распространённость заболевания (Р), %	Интенсивность поражения (R), %
2011	70,8±2,1	99,2±2,6	27,2±0,9
2012	50,1±1,6	26,8±0,7	3,2±0,1
2013	58,2±1,2	31,2±0,6	6,1±0,3

В 2013 году мы наблюдали незначительное увеличение распространенности и интенсивности поражения растений по сравнению с предыдущим годом.

Снижение численности заболевших растений и показателей распространения и интенсивности их поражения в 2012–2013 гг. по сравнению с вегетационным сезоном 2011 года мы связываем с естественными ежегодными флюктуациями инфекционного природного фона, который зависят от ряда факторов: погодных условий, количества инфекционного начала, численности восприимчивых растений на единицу площади. На протяжении трех лет исследования показатель густоты стояния растений-хозяина на пробной площади имел тенденцию к снижению в 2012–2013 гг. на 16,7 шт/м² по сравнению с первым годом наблюдения, что на 23,6 % меньше, чем в 2011 году. В первую очередь, снижение плотности растений на единицу площади могло стать решающим фактором при уменьшении распространенности и степени поражения растений в последующие два года наблюдений. На протяжении трех лет исследования было установлено, что гриб и растение ежегодно образуют ассоциированную пару. Трехкратная обработка (с интервалом в 10 дней) путем опрыскивания бионанопрепаратом надземной массы растений в течение мая–июня на протяжении двух вегетационных сезонов 2011–2012 гг. не вызвала достоверных изменений распространенности и интенсивности заболевания по сравнению с контрольным вариантом.

Сопоставление фенологического спектра *G. sanguineum* с фазами спороношений гриба *U. geranii*, показало, что спорогонии гриба закладываются в фазу бутонизации питающего растения, эции развиваются в фазу цветения *G. sanguineum*, а урединии и телии формируются в период созревания плодов. Максимум пораженности *G. sanguineum* при этом приходится на май (за три года наблюдений), что совпадает с периодом массового цветения *G. sanguineum* (рис. 2 и 3).

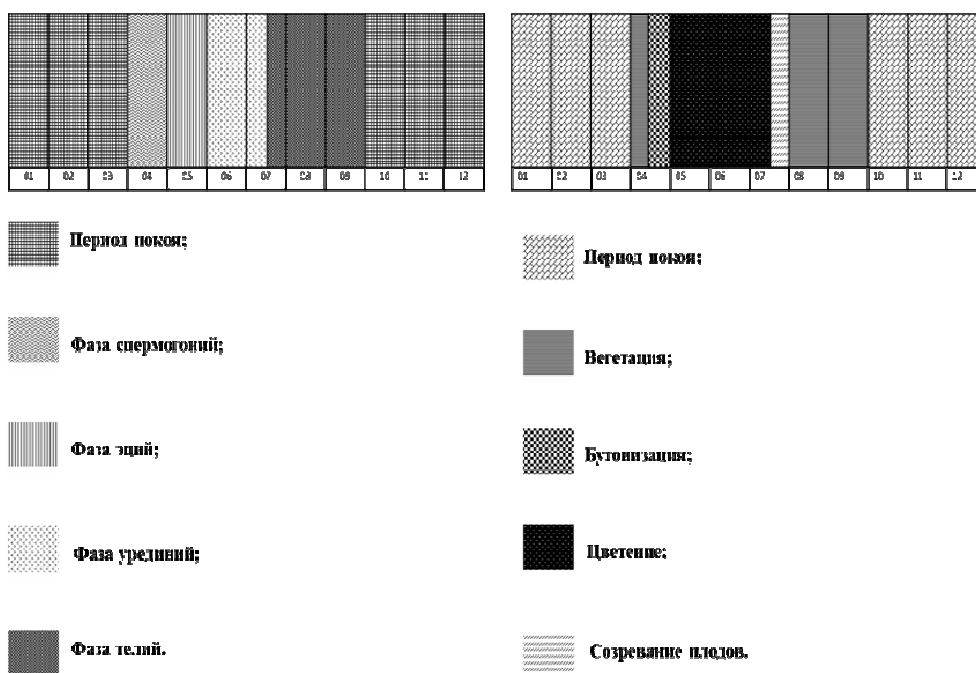


Рис.2.Фенологический спектр спороношений *Uromyces geranii* (DC.) Lev.

Рис.3.Фенологический спектр спороношений *Geranium sanguineum* L.

В последнее время большое внимание исследователи уделяют изучению связи между химическим строением и фунгитоксичной активностью фенольных соединений растений. Это необходимо для более глубокого понимания роли фенолов как факторов устойчивости растений к грибным заболеваниям, а также для использования активных форм этих соединений для защиты растений, человека и животных [13].

В ходе исследований нами был проведен хроматографический анализ экстрактов листьев и стеблей, отражающих состав фенольных соединений контрольных и опытных вариантов.

Анализ одномерных хроматограмм экстрактов стеблей, показал отсутствие существенных различий между контрольными и опытными вариантами в составе фенольных соединений *G. sanguineum* (рис. 4). При сравнительном анализе экстрактов листьев контрольного и опытных вариантов, в опыте было обнаружено полярное соединение с сине-голубым цветом флюоресценции (предположительно производное бензойной или коричной кислоты), которое отсутствовало в контроле и в экстрактах стеблей всех вариантов. Обработка надземной части растений-хозяев бионанопрепаратом серебра не выявила различий в составе фенольных соединений между вариантами опытов 1 и 2 (рис. 4).

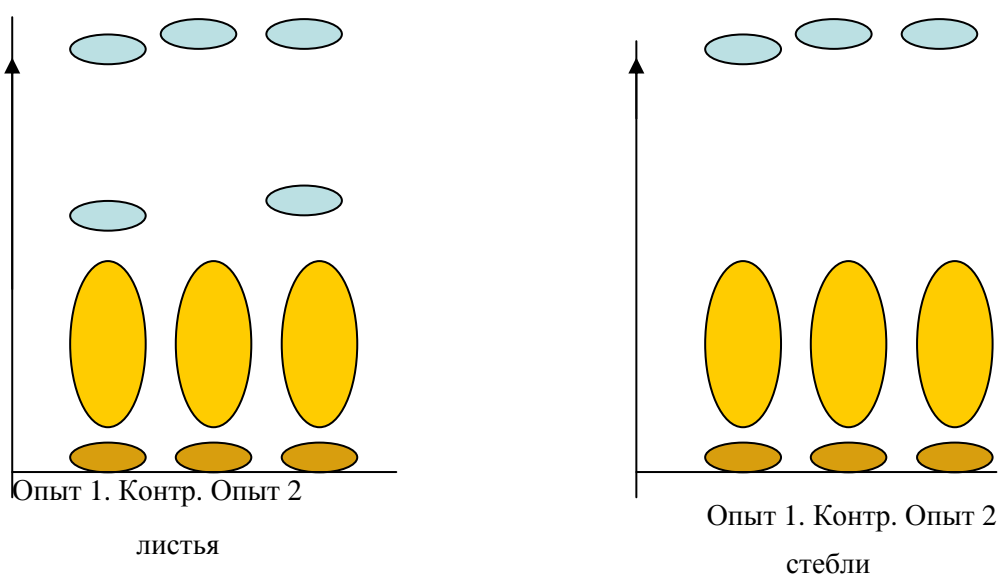


Рис. 4. Хроматограммы листьев и стеблей *Geranium sanguineum*: контроль – здоровые растения; опыт 1 – растения, пораженные *Uromyces geranii*; опыт 2 – растения, пораженные *U. geranii* и обработанные бионанопрепаратом серебра.

Для более тщательного исследования экстрактов пораженных листьев, мы воспользовались методом двумерной тонкослойной хроматографии, который позволяет проводить разделение перекрывающихся хроматографических зон в различных направлениях, с целью более достоверного определения класса веществ, которыми отличались растительные образцы эксперимента. Во втором направлении разделение экстракта проводили в щелочной системе хлороформ-метанол-аммиак в соотношении (7:3:1). Двумерная хроматограмма показала наличие в пораженных ржавчинным грибом *U. geranii* листьях сильно полярных фенольных соединений сложного строения, которые предположительно можно отнести к гликозидам флавонолов и халконов. При УФ-облучении эти вещества флуоресцировали оранжевым и ярко-желтым цветами.

Для более детальной идентификации обнаруженных фенольных соединений на фоне инфекции в данной работе был проведен более тщательный эксперимент по выявлению состава фенольных соединений в различных органах растений, таких как листовые пластинки, черешки, стебли. Нами были выделены фрагменты растений, имеющие явные признаки поражения ржавчинным грибом *U. geranii*. Были проанализированы одномерные хроматограммы листьев (листьевых пластинок и черешков) и стеблей питающего растения.

При рассмотрении фенольного состава экстракта пораженных листьев *Geranium sanguineum* были отмечены окрашенные зоны с коричневой и желтой флуоресценцией (предположительно халконы и ауроны). Кроме того, было зафиксировано соединение с сине-голубым цветом флуоресценции (предположительно производное бензойной или оксикоричной кислоты), которое

отсутствовало в контрольном образце. Это отличие было замечено как для проб за 2011 год, так и за 2012 год; следует также отметить, что данная хроматографическая зона за 2012 год менее четко выражена, по сравнению с предыдущим годом. Вариант опыта с обработкой препаратом бионаносеребра не отличалась от опыта 1 (зараженные ржавчиной растения без обработки нанопрепаратом).

На хроматограмме экстрактов черешков листьев за 2011–2012 гг. также было выявлено качественное различие в содержании компонента с голубой флюоресценцией у зараженных и отсутствие его у здоровых растений.

При анализе одномерных хроматограмм экстрактов стеблей за 2011–2012 годы, нами были отмечены хроматографические зоны с коричневой и желтой окраской (предположительно халконы и ауроны). Но качественных различий между контрольными образцами и пораженными грибом-паразитом не наблюдалось, голубая флюоресценция, обнаруженная в листьях пораженных растений, в стеблях отмечена не была.

В целом, ржавчинный гриб *U. geranii* проявил органотропную специализацию, поражая, преимущественно, листья растения-хозяина, нежели стебли, на которых нами были отмечены лишь единичные симптомы заболевания. В составе фенольных соединений стеблей растений не выявлено существенных отличий между контрольным и опытным вариантом. Обработка растений *G. sanguineum* препаратом нанобиосеребра не оказала влияния на химический состав фенольных соединений стеблей и листьев в сравнении с пораженными растениями без обработки данным препаратом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены распространенность и интенсивность поражения ценопопуляции *G. sanguineum* ржавчинным грибом *U. geranii* вершине горы Сель-Бухра (Горный Крым) и установлено, что ассоциированная пара: гриб-растение образуется ежегодно.
2. Сопоставление фенологического спектра *G. sanguineum* с фазами спороношений гриба *U. geranii*, показало, что спермогонии закладываются в фазу бутонизации, эции развиваются в фазу цветения растения, а урединии и телии формируются в период созревания плодов. За три года наблюдений (2011–2013 гг.) выявлено, что максимум пораженности *G. sanguineum* приходится на май, что совпадает с периодом массового цветения растения-хозяина.
3. Анализ фенольных соединений *G. sanguineum* с помощью тонкослойной хроматографии показал, что под влиянием ржавчинного гриба *U. geranii* образуется компонент с голубой флюоресценцией (предположительно производное бензойной или оксикоричной кислоты), который отсутствует в здоровых листьях. Такие же закономерности, но менее четко прослеживаются и для черешков листьев растения-хозяина. В составе экстракта листьев растения-хозяина, пораженных *U. geranii*, были обнаружены окрашенные зоны фенольных соединений с коричневой и желтой флюоресценцией (предположительно гликозиды халконов и ауранов), которые отсутствовали в контрольном варианте.

4. Обработка растений *G. sanguineum* препаратом бионаносеребра не выявила каких-либо отличий в химическом составе фенольных соединений стеблей и листьев в сравнении с пораженными *U. geranii* растениями без обработки препаратом.

Список литературы

1. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. — Wallingford: CAB International, 2008. — 784 p.
2. Гриби природних зон Криму / [Дудка І. О., Гелюта В. П., Тихоненко Ю. А. та інш.]; під ред. І. О. Дудки. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 452 с. (Інститут ботаніки ім М.Г. Холодного НАНУ).
3. Григора І.М. Рослинність України (еколого-ценотичний, флористичний та географічний нарис) / Григора І.М., Соломаха В.А. □ К.: Фітосоціоцентр, 2005. — 452 с.
4. Дидух Я.П. / Растительный покров Горного Крыма (структура, динамика, эволюция и охрана.). — Киев: Наукова думка, 1992. □ 256 с.
5. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма / Голубев В.Н.—Ялта: ГНБС, 1996 — 300 с.
6. Купревич В.Ф. Определитель ржавчинных грибов СССР / Купревич В.Ф., Ульянищев В.И.— Минск: «Наука и техника», 1975.— 485 с.
7. Ена А.В. Природная флора Крымского полуострова / Ена А.В. □ Симферополь: Ореанда, 2012 — 232 с.
8. Семенкова И. Г. Фитопатология / И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова. □ Москва: Академия, 2003 — 480 с.
9. Юркова И.Н. Нанобиокompозиты на основе серебра и природных биополимеров / И.Н. Юркова, И.А. Бугара, Э.П. Панова // Міжнародний науково-практичний форум "Наука і бізнес – основа економічного розвитку [Збірник тез доповідей, 11-12 жовтня 2012 р.]. — Дніпропетровськ (Україна). — 2012. — С. 152–154.
10. Набиванець Б. И. Хроматографический анализ./ Б.И. Набиванець, Е.А. Мазуренко [Пособие для вузов] — Киев. Вища школа, 1979 — 264 с.
11. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография /Ю. Кирхнер; [Пер. с англ. Д. Н. Соколова и М. И. Яновского, под ред. В. Г. Берёзкина.]. □ М.: Мир, 1981. — 616 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин — М.: Высшая школа, 1983 — 293 с.
13. Movlyanov S.M. Phenolic compounds of *Geranium sanguineum* / S.M. Movlyanov, Sh.Yu. Islambekov, F.G. Kamaev, A.I. Ismailov // Chemistry of Natural Compounds. — 1994. — Vol. 30, № 1. — P. 33-38.

Присянникова І.Б. Вплив іржастого гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lev. на фенологічні показники і фенольний складу *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae) / І.Б. Присянникова, В.І. Гришковець, О.Ю. Федотова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. — 2014. — Т. 27 (66), № 1. — С. 299-308.

Наведено дані щодо впливу іржастого гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на стан ценопопуляції *Geranium sanguineum* L. Вивчено вплив гриба на поширеність і інтенсивність ураження *G. sanguineum*. Виявлено залежність феноспектру рослини-хазяїна від стадії розвитку *U. geranii*. Досліджено вплив *U. geranii* на вміст фенольних сполук у рослинах *G. sanguineum*.

Ключові слова. іржастий гриб *Uromyces geranii*, живильна рослина *Geranium sanguineum*, поширеність і інтенсивність ураження, феноспектри, фенольні сполуки.

INFLUENCE OF THE RUST FUNGUS *UROMYCES GERANII* (DC.) LEV. ON INDICATORS OF THE PHENOLOGICAL AND PHENOLIC COMPOSITION OF *GERANIUM SANGUINEUM* L. (GERANIACEAE)

Prosyannikova I.B., Grishkovets V.I., Fedotova A.Y.

National V.I. Vernadsky Taurida University, Simferopol, Ukraine
E-mail: aphanisomenon@mail.ru, vladgri@ukr.net

The investigation was carried out in the vicinity of Nautsniy in Bakhchisaray region of Crimea on the top of one of the spurs on Sel-Buhra mountain top (658.2 m above the sea level, the Crimean Mountains) on two homogeneous test areas, 100 m² each. The natural vegetation of the limestone Mountains of Sel-Buhra is represented with pubescent oak and juniper sparse wood, where *G. sanguineum* forms rather large and multiple curtains. The spread and the intensity of lesions of *G. sanguineum* coenopopulations by the rust fungus *U. geranii* was studied, as well as the associated pair of fungus-plant, which is annually produced, was found. The comparative analysis of phenological spectrum of *G. sanguineum* with phases of sporophores *U. geranii*, showed that spermogonia are formed in the budding stage and aecia develop on the plants in the flowering stage, while uredinia and telia are formed during the ripening season. For more than three years of research (from 2011 to 2013), it was revealed that the largest lesion of *G. sanguineum* takes place in May, which coincides with the period of mass flowering of the host plant.

The analysis of phenolic compounds of *G. sanguineum* by TLC revealed that a component with a blue fluorescence is formed (hypothetically, it is a derivative of benzoic or hydroxycinnamic acid) under the influence of *U. geranii* rust fungus. This component is absent from healthy leaves. The same less clearly traced consequences are traced in petioles of the host plant. Inside the leaf extract of the host plant affected by *U. Geranii* there were found the colored zones of phenolic compounds with brown and yellow fluorescence (presumably chalcone glycosides and auronones) which were absent in the control variant.

The treatment of the plants *G. sanguineum* by bionanosilver drug revealed no differences in the chemical composition of phenolic compounds in stems and leaves in comparison to the infected plants *U. geranii* left without drug treatment.

Keywords: *Uromyces geranii* rust fungus, *Geranium sanguineum* host plant, the spread and intensity of lesions, phenological spectrum, phenolic compounds.

References

1. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th ed., 784 p. (CAB International, Wallingford, 2008).
2. Dudka I. O., Geluta V.P., Tichonenko Y.A. that insh. ed. I.O. Dudka. *Fungi natural areas Crimea (Institute of botany named after M.G. Cholododny)*, 452 p. (Phytosotsiotsentr, Kiev, 2004) (in Ukrainian).
3. Grigora I.M., Solomaha V.A. *Vegetation Ukraine (Eco-tsenotichny, floristichny that geografichny Naris)*, 452 p. (Phytosotsiotsentr, Kiev, 2005). (in Ukrainian).
4. Didukh Y.P. *Vegetation cover of the Crimean Mountains (structure, dynamics, and evolution of security.)*, 256 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1992). (in Russ.).

5. Golubev V.N. *Biological flora of Crimea*, 300 p. (GNBS, Yalta, 1996). (in Russ.).
6. Kuprevich V.F., Ulyanischev V.I. *Determinant of rust fungi of the USSR*, 485 p. (Science and Technology, Minsk, 1975). (in Russ.).
7. Yena A.V. *Natural flora of the Crimean Peninsula*, 232 p. (N. Oreanda, Simferopol, 2012). (in Russ.).
8. Semenkova I.G., Sokolova E.S. *Phytopathology*, 480 p. (Academy, Moscow, 2003). (in Russ.).
9. Jurkova I.N., Bugara I.A., Panova E.P. Nanobiocomposites based on silver and natural biopolymers. International scientific and practical forum of Science and Business - the basis of economic development (A book of abstracts, 11-12 October 2012), Dnipropetrovs'k (Ukraine). P. 152-154 (2012). (in Russ.).
10. Nabivanets B.I., Mazurenko E.A. *Chromatographic analysis*. Handbook for universities, 264 p. (Visha School, Kiev, 1979). (in Russ.).
11. Kirchner Y., Sokolov D., Janowski M., ed. V.G. Berezkina. *TLC*, 616 p. (Mir, Moscow, 1981). (in Russ.).
12. Lakin G.F. *Biometrics*, 293 p. (Higher School, Moscow, 1983) (in Russ.).
13. Movlyanov S.M., Islambekov Sh.Yu., Kamaev F.G., Ismailov A.I. Phenolic compounds of *Geranium sanguineum*. *Chemistry of Natural Compounds*, **30** (1), 33 (1994).

Поступила в редакцию 20.01.2014 г.