

ЗАЩИТНАЯ РЕАКЦИЯ ФЛОЭМЫ СТВОЛА ЛИСТВЕННИЦЫ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ХВОИ ЧЕХЛИКОВОЙ МОЛЮ

Снижение устойчивости деревьев к стволовым вредителям зачастую обусловлено воздействием неблагоприятных факторов среды (Исаев, Гирс, 1975). Так, в лесах Сибири основная причина ослабления древостоев - лесные пожары и вспышки массового размножения хвоегрызущих насекомых, главным образом сибирского шелкопряда (*Dendrolimus superans sibiricus* Tschetvr). Повреждение пихт при вспышках численности сибирского шелкопряда приводит к снижению устойчивости дефолиированных деревьев к стволовым вредителям (Ветрова и др., 1998). Минирование хвои лиственниц гусеницами лиственничной чехлоноски *Coleophora sibiricella* Falk., (Lepidoptera; Coleophoridae) снижает прирост древесины стволов лиственниц, однако, устойчивость деревьев к стволовым вредителям остается на прежнем уровне (Плешанов, 1982, с. 58). Сохранение резистентности в этом случае, по-видимому, связано с повышением антибиотической активности деревьев, отмеченным у лиственницы при хроническом повреждении хвои насекомыми-филофагами (Баранчиков и др., 1991).

Для изучения защитных реакций тканей ствола хвойных в последние десятилетия применяют метод искусственной инокуляции флоэмы ствола патогенами, в том числе деревоокрашивающими грибами, переносимыми насекомыми-ксилофагами (Reid et al., 1967, Miller et al., 1986, Paine et al., 1997). При этом наблюдается, так называемая сверхчувствительная реакция (СВЧ-реакция), сопровождающаяся быстрым некрозом инфицированных и соседних с ними клеток и образованием изолирующей перидермы (Wong, Berryman, 1977; Vetrova et al., 1999; Primož, 1999). Через 3-4 недели после инокуляции гриба во флоэму ствола хвойных отмечается практически полное прекращение распространения некротической зоны (Wong, Berryman, 1977; Полякова и др., 1995). Предварительные эксперименты на лист-

веннице показали стабилизацию размеров некроза уже через 2 недели. Совпадение границы некроза и зоны инфицирования является характерной чертой сверхчувствительной реакции растения-хозяина к патогену (Klement, Goodman, 1969). Поэтому размер некроза, измеренный на фазе стабилизации, может характеризовать степень распространения патогена в тканях растения-хозяина и по этому параметру, по видимому, можно судить о степени устойчивости растения к патогену (Vetrova et al., 1999; Polyakova et al., 2000).

Некротическая реакция флоэмы ствола хвойных на патогенные грибы характеризуется активацией терпеноидного и фенольного метаболизма (Wong, Bergman, 1977; Paine et al., 1997). Скорость накопления в зоне некроза полимерных фенольных соединений, лигнина и конденсированных дубильных веществ (проантоцианидинов), характеризует устойчивость деревьев пихты к черному пихтовому усачу, а также к деревоокрашивающим грибам, переносимым этим ксилофагом (Ветрова и др., 1995б).

Для индуцирования защитной реакции хвойных применяют не только грибы, но и экстрактивные вещества, выделенные из этих грибов (Ветрова и др., 1995а; Bach, Seits, 1997). Применение препаратов, выделенных из грибного мицелия, позволяет полностью исключить риск распространения грибной инфекции в лесном массиве при исследовании устойчивости деревьев методом инокуляции флоэмы ствола.

Целью работы являлось определение характеристик защитной реакции флоэмы ствола на действие патогенных грибов у здоровых и поврежденных деревьев, а также поиск возможных механизмов сохранения устойчивости лиственницы к стволовым вредителям при повреждении хвои чехлоноской. Определяли размеры некроза и изменение содержания лигнина и проантоцианидинов в зоне защитной реакции флоэмы ствола на гриб *Ceratocystis laricicola*, переносимый большим лиственничным короедом (*Ips cembrae* Heer.). В опыте использовали также мицелиальные препараты *C. laricicola*. Для оценки защитной реакции по величине некроза применяли и другие деревоокрашивающие грибы, ассоциированные с лиственничным короедом.

Материал и методика

Исследования проводили на деревьях лиственницы 100-120 лет диаметром 24 см в спелом разнотравном среднеполнотном лиственничнике III класса бонитета состава 10Л в лесостепной зоне Хакасии.

В качестве индукторов защитной реакции флоэмы ствола использовали двухнедельные культуры грибов *Ceratocystis laricicola* Redf.&Minter, *Ophiostoma bicolor* Davis&Wells и *O. ips* (Rumb.)Nannf.,

переносимые большим листовничным короедом. Грибы были предварительно выделены из деревьев листовницы, заселенных этим ксилофагом.

Биохимические параметры реакции исследовали в опыте с инокуляцией ствола мицелием *C. laricicola* и экстрактом из разрушенного мицелия этого гриба. Препараты готовили из мицелия, гомогенизированного с помощью ультразвука и экстрагированного 70% этанолом (Ветрова и др., 1995 а).

Инокуляцию грибом *C. laricicola* и препаратом из мицелия проводили в середине июля на 14 деревьях, из которых 7 были дефолированы гусеницами листовничной чехлоносской более чем на 50%. В коре ствола с помощью цилиндрического пробойника диаметром 7 мм проделывали отверстия до глубины заболони на высоте 1.4 и 1.2 м. В нижние отверстия вносили мицелий, в верхние - экстракты из мицелия. Отверстия закрывали высечками коры.

Отбор образцов флоэмы для химического анализа проводили в день инокуляции (контроль) и через 14 суток после начала опыта. При этом счищали внешнюю кору, затем вырезали прямоугольный образец луба (2 на 4 см) с отверстием в центре. Образец фиксировали в 96% этаноле.

Исследование реакции листовницы на грибы *C.laricicola*, *O.bicolor* и *O.ips* по величине некроза проводили на 6 деревьях, из которых 3 были дефолированы чехлоносской на 60-70%. Вертикальные размеры некроза измеряли через 14 суток после инфицирования.

Содержание проантоцианидинов в образцах флоэмы определяли по методике, основанной на способности этих фенольных соединений окрашиваться при нагревании их со смесью бутанол-НСl (Porter et al., 1986). Проводили исчерпывающую экстракцию размолотых образцов 80% этанолом. Объединенные экстракты упаривали досуха, вновь экстрагировали водой. В водном экстракте и неэкстрагируемом остатке определяли содержание свободных и связанных проантоцианидинов соответственно. Содержание общих проантоцианидинов, приведенное в таблице, равно сумме свободных и связанных проантоцианидинов. В неэкстрагируемом остатке определяли содержание лигнина с помощью тиогликолевой кислоты (Venverloo, 1969). Все анализы проводили в 3- или 7- кратной биологической и 2-кратной аналитической повторностях. В таблице приведены средние аналитических повторностей, а также средние и ошибки, рассчитанные для биологических повторностей. Достоверность различий средних определяли по t-критерию Стьюдента для малых выборок (Плохинский, 1970, с.134).

Результаты и обсуждение

Инокуляция гриба *O. ips* во флоэму ствола деревьев, поврежденных чехлоноской, вызывала СВЧ - некрозы флоэмы, достоверно ($P < 0.05$) превышающие по размерам некрозы на здоровых деревьях.

Таблица

Характеристики некрозов флоэмы здоровых и дефолированных гусеницами чехлоноски лиственниц после инфицирования ствола грибом *Ceratocystis laricicola*

Вариант опыта и измеряемые параметры	Время после инокуляции, сутки	Состояние хвои	
		здоровая	поврежденная
Величина некроза, мм			
<i>Ceratocystis laricicola</i>	14	37,3±3,4aA	43,7±3,0aA
<i>Ophiostoma bicolor</i>	14	38,3±3,8aA	49,0±1,5a
<i>Ophiostoma ips</i>	14	24,0±1,2aA	34,6±2,9aB
Конденсированные дубильные вещества, мг г ⁻¹			
Контроль	0	227±18 aA	294±10 aB
<i>Ceratocystis laricicola</i>	14	293±16 bA	334±23 aA
Экстракт <i>Ceratocystis laricicola</i>	14	311±44 bA	300±20 aA
Лигнин, мг г ⁻¹			
Контроль	0	133±6 aA	117±9 aA
<i>Ceratocystis laricicola</i>	14	142±8 aA	140±6 aA
Экстракт <i>Ceratocystis laricicola</i>	14	147±11 aA	135±5 aA
Масса инфицированной флоэмы, мг см ⁻² камбия			
Контроль	0	74±8 aA	96±10 aA
<i>Ceratocystis laricicola</i>	14	74±3 aA	52±5 bB
Экстракт <i>Ceratocystis laricicola</i>	14	87±8 aA	64±5 bB

Примечание. Внутри каждого параметра одинаковыми буквами отмечены средние значения, достоверно не отличающиеся друг от друга ($P > 0.05$) внутри столбцов (строчные буквы) и внутри строк (заглавные буквы). В остальных случаях $P < 0.05$.

В случае действия грибов *C. laricicola* и *C. bicolor* различия длины nekрозoв у здоровых и поврежденных деревьев не достоверны.

Исходная концентрация общих проантоцианидинов во флоэме ствола дефолиированных лиственниц был выше ($P < 0,05$) по сравнению с неповрежденными деревьями (таблица). Внесение гриба *C. laricicola*, либо его экстракта во флоэму ствола здоровых деревьев вызвало через 14 суток существенное накопление общих проантоцианидинов в зоне реакции флоэмы (таблица). На поврежденных чехлоноской деревьев не отмечено достоверного изменения содержания общих проантоцианидинов в зоне реакции флоэмы ствола на действие гриба *C. laricicola*, либо его экстракта.

Содержание лигнина в зоне реакции через 14 дней после инокуляции достоверно не различаются у обеих групп деревьев. При этом тенденция к накоплению лигнина в зоне реакции флоэмы на грибок либо его препарат отмечена как у здоровых, так и у поврежденных чехлоноской деревьев (таблица).

У частично дефолиированных лиственниц через 14 суток после инокуляции гриба либо его препарата почти в 2 раза уменьшалась масса образцов флоэмы, извлеченных из зоны защитной реакции, по сравнению с массой образца, отобранного в начале опыта (таблица).

Параметры защитной реакции флоэмы ствола лиственницы на инфицирование грибом *C. laricicola* у деревьев, хвоя которых повреждена чехлоноской, отличаются от параметров реакции у контрольных деревьев. У деревьев с неповрежденной хвоей достоверно повышается содержание проантоцианидинов в зоне реакции флоэмы на грибок *C. laricicola* или экстракт гриба по сравнению с исходным уровнем этих полифенолов (таблица). Такого изменения уровня проантоцианидинов в зоне реакции у деревьев с поврежденной хвоей не отмечено. Масса образца флоэмы, извлеченного из зоны реакции у деревьев с поврежденной кроной, снижается почти в два раза за 14 суток после заражения. Такой эффект у контрольных деревьев не отмечен.

Разный характер СВЧ-реакции проводящих тканей ствола на инфицирование у лиственниц с поврежденной и неповрежденной хвоей обусловлен, очевидно, различием физиологического состояния этих групп деревьев. Так, при повреждении хвои чехлоноской гусеницы выедают внутренние части хвоинок преимущественно в их верхней трети. При этом базальная часть хвоинок продолжает функционировать. Нарушения метаболизма лиственницы, подвергающейся многократной частичной дефолиации чехлоноской, вызывают снижение образования первичных продуктов фотосинтеза (Плешанов, 1982). У лиственниц с поврежденной чехлоноской хвоей происходят процессы, направленные на регенерацию кроны и компенсацию повреждения фотоассимилирующего аппарата. Повышение активности ростовых

процессов, направленных на компенсацию повреждения хвои чехлоносной, предполагает повышение расходования фотоассимилятов. На это указывает снижение их концентрации, отмеченное в хвое поврежденных лиственниц (Ермолаев, Ермолаева, 1998), несмотря на повышение интенсивности фотосинтеза (Плешанов, 1983). Падение прироста древесины у деревьев, поврежденных чехлоносной, может свидетельствовать о снижении транспорта ассимилятов в проводящие ткани ствола.

Некроз флоэмы ствола хвойных обуславливает прекращение распространения мицелия в пределах образующейся изолирующей перидермы (Vetrova et al., 1999; Primož, 1999; Polyakova et al, 2000). При этом в зоне СВЧ-реакции происходит быстрая некротизация растительных клеток, погибающих вместе с проникшим паразитом (Klement, Goodman, 1969), накапливаются смолистые и фенольные вещества (Reid et al., 1967; Wong, Berryman, 1977). Возможность протекания процессов, направленных на остановку гриба в пределах СВЧ-некроза, очевидно, обусловлена активацией катаболизма ассимилятов в зоне защитной реакции растения, о чем косвенно свидетельствует снижение крахмала и низкомолекулярных сахаров в этой зоне (Полякова и др., 2000; Wright et al., 1979).

Поскольку в июле, когда проводилась инокуляция, уровень крахмала в лубе ствола дефолиированных деревьев снижен в сравнении с контролем (Гирс, 1982), нельзя исключать возможность катаболизма в зоне реакции такого структурного полисахарида как геммицеллюлоза. Гистологические исследования показали изменение содержания полисахаридов клеточной стенки во флоэме, происходящее при инфицировании (Biggs, 1984). Снижение содержания полисахаридов клеточной стенки отмечено в каллусных культурах лиственницы после обработки их экстрактами гриба *C.laricicola* (неопубликованные данные). Таким образом, снижение массы флоэмы в зоне защитной реакции на инфекцию у дефолиированных чехлоносной деревьев можно объяснить дефицитом ассимилятов во флоэме и повышением расхода запасных и, возможно, структурных полисахаридов.

Увеличение размеров СВЧ-некрозов у дефолиированных чехлоносной деревьев, по-видимому, связано с дефицитом углеводов в проводящих тканях ствола. Это увеличение крайне незначительно. При полной дефолиации пихты сибирским шелкопрядом размеры СВЧ-некрозов флоэмы ствола, возникающих после инокуляции патогенных грибов, в несколько раз превышают размеры некрозов у неповрежденных деревьев (Vetrova et al., 1999). Резкое падение устойчивости дефолиированных деревьев пихты, обусловлено, очевидно, дефицитом энергетических и пластических ресурсов в растении. Полная де-

фолиация вызывает значительное снижение уровня крахмала и низкомолекулярных сахаров во флоэме и ксилеме хвойных (Гирс, 1982).

Повреждение насекомыми-вредителями или инфицирование тканей хвойных патогенами вызывают увеличение содержания в них лигнина (Benz, 1974; Polyakova et al., 2000), одного из компонентов клеточной стенки. При этом достоверное увеличение содержания этого полифенольного соединения отмечено только в инфицированной и пограничной зонах (Полякова и др., 1995). Гистологическими методами показано снижение концентрации «защитного» лигнина во флоэме ствола по мере удаления от места поранения (неопубликованные данные). Несмотря на повышение уровня лигнина в хвое лиственницы, поврежденной чехлоносой (Benz, 1974), накопления лигнина во флоэме ствола у таких деревьев не происходит (таблица).

Полученные результаты указывают на то, что накопление проантоцианидинов, вызванное фитопатогенами, отмечается не только в поврежденных тканях, но распространяется далеко за пределы зоны повреждения. Косвенным свидетельством этого служит более высокое содержание общих проантоцианидинов в стволовой флоэме у дефолиированной чехлоносой лиственницы по сравнению с неповрежденными деревьями (таблица). Участие проантоцианидинов в защитной реакции хвойных на патогенные грибы показано в модельных опытах на каллусных культурах и на деревьях (Polyakova et al., 2000). Установлено, что не только патогенные грибы, но и нематоды вызывают накопление проантоцианидинов в зоне реакции у лиственницы, сосны и ели (Futai, Sutherland, 1989). При этом характер изменения содержания проантоцианидинов аналогичен их изменению в случае действия грибов, что свидетельствует о неспецифичности защитного ответа хвойных на заражение. Сходство защитного ответа проводящих тканей ствола на грибы и насекомые показано на сосне скрученной (Miller et al., 1986). Инокуляция во флоэму жуков *Dendroctonus ponderosae* и переносимого им гриба синевы древесины *Ceratocystis clavigerum*, вызывала в обоих случаях накопление смолы и снижение сахаров.

Более высокое содержание проантоцианидинов во флоэме частично дефолиированных чехлоносой лиственниц по сравнению с флоэмой неповрежденных деревьев может свидетельствовать о системности защитного ответа деревьев на повреждение хвои насекомыми и установлении системной индуцированной устойчивости (SAR в английской литературе), показанной на травянистых растениях (Ryals et al., 1996). Для этого типа устойчивости характерна активизация защитных механизмов в неинфицированных частях растения. На возможность реализации системной индуцированной устойчивости у хвойных указывают данные, полученные в опытах с инфицированием

ствола ели грибом *Leptographium abietinum* Peck, переносимым еловым короедом *Dendroctonus rufipennis* Kirby (Werner, Illman, 1994). Предварительная инокуляция флоэмы ствола ели этими грибами сдерживает распространение питающихся личинок короеда по флоэме, находящейся вне зоны распространения грибной инфекции. При этом длина ходов и площадь флоэмы, съеденной личинками, были меньше у инокулированных грибом деревьев. Наличие индуцированной устойчивости у хвойных подтверждено также в опытах с предварительной инокуляцией сосен грибом *S. polonica*, проводимой перед массовым заражением деревьев этим грибом (Krokene et al., 1999). Предварительное заражение уменьшало развитие болезни на 76-97%.

Таким образом, с одной стороны, повреждение хвои лиственницы чехликовой молью, может активизировать защитные механизмы в неповрежденных тканях (индуцировать системную устойчивость), о чем свидетельствует накопление дубильных веществ, отмеченное в тканях флоэмы ствола, и сохранение устойчивости дефолиированных лиственниц стволовым вредителям. С другой стороны, активность защиты лимитируется ресурсами дерева, которые снижаются у деревьев после повреждения фотоассимилирующего аппарата.

Выводы

1. Размеры некрозов флоэмы ствола лиственниц, возникающих при инокуляции гриба *O. ips*, у поврежденных чехликовой молью деревьев больше по сравнению с размерами некрозов у неповрежденных деревьев. Это указывает на снижение устойчивости поврежденной лиственницы к патогенному грибу.

2. Инфицирование тканей флоэмы ствола лиственницы грибом *S. laricicola*, как и действие на них экстракта мицелия данного гриба, вызывает накопление конденсированных дубильных веществ во флоэме деревьев с неповрежденной хвоей. У поврежденных чехлоноской деревьев не отмечено накопления этих полифенольных соединений в зоне реакции на гриб флоэмы ствола. .

3. У деревьев лиственницы с поврежденной хвоей отмечено более высокое исходное содержание конденсированных дубильных веществ во флоэме ствола, что может свидетельствовать об активации защитных механизмов в неповрежденных органах растения.

4. Снижение массы флоэмы, происходящее в зоне защитной реакции на действие гриба *S. laricicola* может быть вызвано дефицитом ресурсов у деревьев, частично дефолиированных лиственничной чехлоноской.

Литература

- Баранчиков Ю.Н., Сафонова Л.В., Рыжкова Т.С., Кудашова Ф.Н. // Экология. - 1991.- № 6.- С. 56-61.
- Ветрова В.П., Матренина Р.М., Полякова Г.Г., Пашенова Н.В. // Микология и фитопатология.- 1995а.- Т.29, вып. 2.- С. 33-38.
- Ветрова В.П., Полякова Г.Г., Пашенова Н.В., Осипов В.И. // Лесоведение.- 1995б.- № 6.- С. 34-42.
- Ветрова В.П., Исаев А.С., Пашенова Н.В., Константинов М.Ю. // Лесоведение.- 1998.- № 3.- С. 58-67.
- Ермолаев И.В., Ермолаева М.В. // Энтомологические исследования в Сибири. Красноярск: ИЛ СО РАН.- 1998. - № 1.- С. 78-89.
- Исаев А.С., Гирс Г.И. Взаимодействие дерева и насекомых-ксилофагов.- Новосибирск.: Наука, 1975.- 346 с.
- Плохинский Н.А. Биометрия.- М: МГУ,- 1970.- 367с.
- Полякова Г.Г., Ветрова В.П., Пашенова Н.В., Осипов В.И. // Физиол. раст.- 1995.- Т.42, № 4.- С. 622-628.
- Полякова Г.Г., Ветрова В.П., Пашенова Н.В. // Лесоведение.- 2000.- № 2.- С. 23-29.
- Плешанов А.С. Насекомые-дефолианты лиственничных лесов Восточной Сибири.- Новосибирск: Наука, 1982.- 209 с.
- Bach M., Seitz H.U. // Can. J. Botany. - 1997.- V.75, N.8.- P.1243-1251.
- Benz G. // Z. Ang. Entomol.- 1974.- Bd.76.- S. 196-228.
- Futai K., Sutherland J.R. // Can. J. For. Res.- 1989.- V.19.- P. 1256-1261.
- Klement Z., Goodman R.N. // Ann. Rev. Phytopathol.- 1969.- N 5.- P. 17-44.
- Krokene P., Christiansen E., Solheim H., Franceschi V.R., Berryman A.A. // Plant Physiol.- 1999.- V.121, N 2.- P. 569-656.
- Miller R.H., Berryman A.A., Ryan C.A. // Phytochemistry.- 1986.- V. 25, N 3.- P. 611-612.
- Paine T.D., Raffa K.F., Harrington T.C. // Annu. Rev. Entomol.- 1997.-V. 42.- P.179-206.
- Polyakova G.G., Pashenova N.V., Vetrova V.P., Stasova V.V., Zrazevskaya G.K., Shein I.V., Konstantinov M.Yu. // Proceedings of The 2nd International Symposium on New Horizon of Bioscience in Forest Product Field / Ed. Nam-Seok Cho. Cheongju, Korea: Chungbuk National University.- 2000.- P. 26-42.
- Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. // Phytochemistry.- 1986.- V.25, N 1.- P. 223-230.
- Primoz O. // Zb. gozd. in les.- 1999.-V. 58.- C.189-217.

Reid R.W., Whitney H.S., Watson J.A. // *Can. J. Bot.*- 1967.- V. 45.- P. 1115-1126.

Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.-J., Hunt M.D. // *The plant cell.*- 1996.- V.8, N.10.- P. 1809-1819.

Venverloo C.J. // *Acta Bot. Neerl.*- 1969.- V. 18, N. 2.- P. 241-314.

Vetrova V.P., Stasova V.V., Pashenova N.V. // *Proceedings of The International Symposium on Physiology and genetics of tree-phytophage interactions.* IUFRO. / Eds. F. Lieutier, W.J. Mattson, M.R. Wagner. Paris: INRA Editions.- 1999.- P.287-298.

Werner R.A., Illman B.L. // *Environ. Entomol.*- 1994.- V. 23.- P. 472-478.

Wong B.L., Berryman A.A. // *Can. J. Bot.* 1977.- V.55, N 17. P. 2358-2365.