

УДК 630.160+582.28

ЗНАЧЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ ДЕРЕВЬЕВ 16-ЛЕТНИХ КУЛЬТУР ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

© 2019 г. Л. В. Полякова^{а, б, *}, В. И. Литвиненко^{б, с}

^аФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»
Россия, 394087 г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105

^бУкрНИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации
Украина, 63024 г. Харьков, ул. Пушкинская, 86

^сГосударственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции
ул. Астрономическая, 33, г. Харьков, 63085 Украина

*E-mail: polyakova_lv@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2016 г.

После доработки 05.04.2018 г.

Принята к публикации 08.10.2018 г.

Изучали 16-летнюю культуру дуба черешчатого, в составе которой 57% деревьев инфицировано мучнистой росой. Данные биохимического анализа показали значительные отличия устойчивых и восприимчивых к мучнистой росе деревьев по синтезу в листьях вторичных метаболитов фенолпропаноидной структуры – флавонолов (ФЛ) и конденсированных танинов (КТ). В листьях восприимчивых деревьев синтезируется в среднем на 50–150% больше КТ и на 20–40% меньше ФЛ. Повышенный уровень КТ, вероятно, не является токсичным для патогена, так как не останавливает разрастания мицелия на поверхности листовой пластины. Снижение уровня ФЛ в зоне листа, покрытой мицелием, напротив, указывает на их вероятную токсичность. Изменение под влиянием патогена пропорций синтезируемых в листьях КТ и ФЛ указывает на дестабилизацию вторичного метаболизма восприимчивых к инфекции деревьев. Отмечено также, что средний диаметр деревьев устойчивой группы на 7.2% ниже, чем группы восприимчивых к инфекции деревьев, что может быть следствием снижения в них уровня ФЛ, известных как ингибиторы осевого транспорта ауксинов. Важным свойством ФЛ является их антиоксидантная активность, повышающая устойчивость к действию УФ-Б-радиации, засухе, а также способность снижать повреждающее действие активных форм кислорода. Снижение уровня ФЛ в листьях восприимчивых к мучнистой росе деревьев может влиять на их устойчивость к действию внешних факторов, приводя к более раннему элиминированию из состава насаждения.

Ключевые слова: дуб черешчатый, мучнистая роса, вторичные метаболиты, гидролизуемые танины, конденсированные танины, катехины, флавонолы.

DOI: 10.1134/S0024114819010108

В настоящее время деградация и массовое усыхание дубрав стали уже глобальным явлением, отмечены практически по всему ареалу многих видов дуба. В качестве одной из причин ослабления насаждений дуба черешчатого рассматривается патологический комплекс, в котором основное место занимают повреждения мучнистой росой (48.6% поражаемости) и бурой пятнистостью (13.6%) (Каплина, Селочник, 2015). В работе, посвященной анализу влияния патогенов и насекомых на лесные экосистемы, подчеркивается, что умеренная инфекция ведет к элиминации индивидуальных особей, в то время как высокий ее уровень обеспечивает постоянный

падеж деревьев в течение многих лет (Dietze, Matthes 2014). Влияние мучнистой росы на численность деревьев в насаждениях было отмечено при сравнении числа инфицированных деревьев 200–300-летнего насаждения и растущей на этой же территории 50-летней культуры: численность деревьев со степенью инфицирования 10–30% составила для 200–300-летних деревьев 25%, в то время как в 50-летней культуре со степенью инфицирования 30–60% отмечено 50% деревьев (Полякова и др., 2014б).

Патоген мучнистой росы – *Erysiphe alphythoides* – является облигатным биотрофом, который использует фотосинтаты растения для

своего питания, не убивая его. Заметное снижение активности фотосинтеза отмечается уже при инфицировании выше 30% поверхности листа, а в молодых листьях (сеянцев или вторичных побегов), инфицированных на уровне 50–75% теряется почти 50% ее активности. Несмотря на то, что инфекция снижает активность фотосинтеза, однозначного влияния на ростовые показатели деревьев не установлено, так как чаще всего связь между листовой инфекцией и продуктивностью деревьев является нелинейной (Pap et al., 2014; Bert et al., 2016).

Влияние мучнистой росы на биохимические показатели листьев, а также на один из основных ростовых параметров дерева – диаметр – изучали на примере 16-летней культуры дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), в которой мучнистой росой инфицировано 57% деревьев. Для более полного анализа в листьях деревьев определяли содержание всех основных групп вторичных веществ (Salminen et al., 2004), включая гидролизуемые, конденсированные танины, гликозиды флавонолов, свободный кверцетин. Определялось также содержание белка. Основная цель работы – оценить влияние мучнистой росы на участие разных групп веществ в формировании устойчивости деревьев дуба черешчатого к данной инфекции, а также оценить состояние деревьев культуры по одному из ростовых показателей – диаметру.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА

Культура дуба, созданная в 1998 г. на площади 2 га, произрастает в условиях ДЗ Липецкого лесничества Даниловского лесхоза (Харьковской области), имеет состав 10Д со схемой посадки 4.5 × 0.8 м. Деревья для анализа выбирались произвольно в течение одного дня – 11.07.2014 г. С каждого дерева отбирали 4–6 побегов нижнего яруса южной экспозиции. Состояние дерева по степени инфицирования листьев оценивали согласно общепринятой методики – визуально оценивая разрастание эпифитного мицелия. Образцы побегов каждого дерева разделяли на группы – 1 – нулевая инфекция; 2 – слабая (до 10%); 3 – умеренная (10–30%); 4 – средняя (30–50%); 5 – сильная (50–75%); 6 – очень сильная (>75%). (Pap et al., 2014). Наблюдалось также незначительное инфицирование листьев бурой пятнистостью (*Gloeosporium quercinum*), единично сажистым грибом (*Apiosporum* sp.). Для анализа отбирали по 4 листа с дерева, преимущественно системные (неповрежденные), которые фиксировали в кипящем этаноле и анализировали раздельно.

В комплексе биохимических показателей определяли: содержание белка (Б) по реакции с амидо-черным, 615 нм (Бузун и др., 1982), гидролизуемых танинов (ГТ) (в сумме с эллаговыми тани-

нами), реактив Фолина-Дениса, 750 нм (Swain, Hillis, 1959). Из фенолпропаноидных структур определяли содержание низкомолекулярных катехинов (К), построенных на их основе конденсированных танинов (КТ), ванилиновый реактив, 500 нм (Julkunen-Tiitto, 1985), а также группы флавоноловых гликозидов (ФЛ), реакция с $AlCl_3$, 415 нм (Беликов, 1985) и свободного кверцетина (Кв), 374 нм. Для более точного определения содержания некоторых групп веществ применили последовательную экстракцию листьев 96%-м (К, ФЛ, Кв) и 50%-м этанолом (КТ, ГТ). В первой фракции (96% спирт) определяли содержание К. Далее спирт упаривали до 1 мл, добавляли 5 мл дистиллированной H_2O и обрабатывали 3 мл хлороформа. После разделения слоев в водно-спиртовой фракции определяли содержание ФЛ, в хлороформной фракции определяли содержание свободного Кв. В извлечении 50%-го этанола определяли содержание КТ и общую сумму фенольных соединений (ФС) (Swain, Hillis, 1959). Разницу между содержанием ФС в этой фракции и КТ рассматривали как содержание гидролизуемых танинов. Статистическая обработка данных произведена в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая неоднородность деревьев 16-летней культуры в связи с инфицированием мучнистой росой, данные биохимического анализа представлены для двух групп деревьев – устойчивых к инфекции (мицелиальный налет 0–5%) и восприимчивых (10–80%) (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают, что по содержанию белка и ГТ обе группы деревьев практически не отличаются. По содержанию суммы К и построенных на их основе КТ, деревья, восприимчивые к инфекции, заметно превышали уровень этих веществ в деревьях устойчивой группы. По накоплению в листьях ФЛ, напротив, повышенное содержание было характерно для деревьев устойчивой группы. Коэффициенты вариации указывают на относительно стабильные уровни белка и ГТ (8–22%) в обеих группах, а также ФЛ и Кв в листьях устойчивых деревьев (26–32%). Выделяются структуры КТ, вариабельность которых в обеих группах имеет высокие значения ($CV = 43–54\%$). Данные табл. 1 позволяют также отметить превышение на 7.2% диаметра восприимчивых к инфекции деревьев по сравнению с устойчивыми, а также повышенную вариабельность по данному размерному признаку деревьев восприимчивой группы. Оказалось также, что среди инфицированных деревьев культуры только 6 из 20-ти имели умеренную и среднюю инфицированность листьев (10–30 и 30–50%), а основная часть этой группы – 14 деревьев – ока-

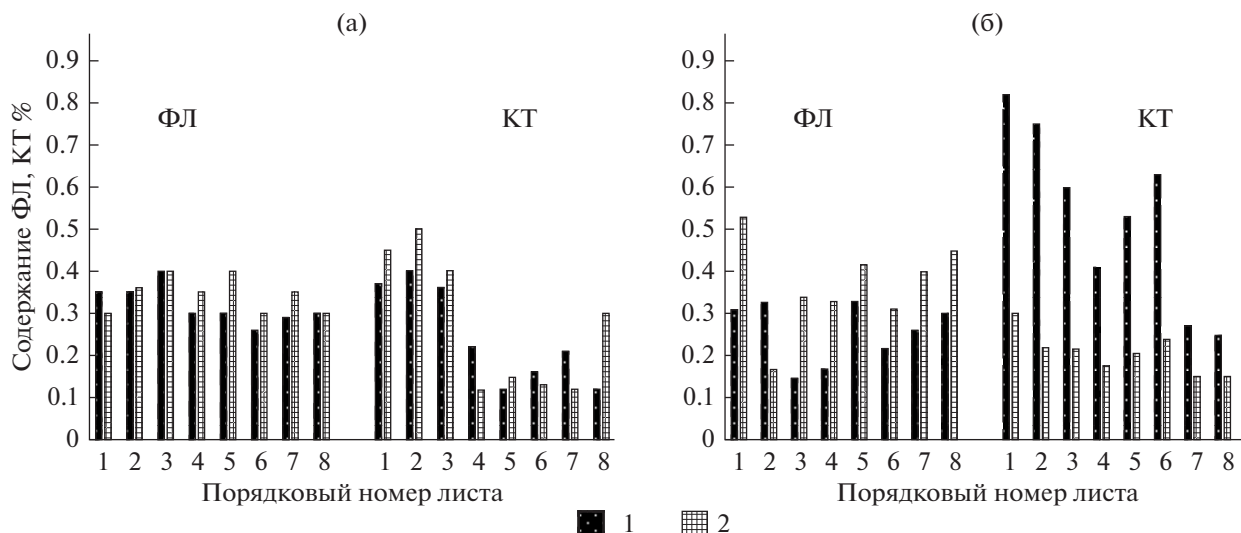


Рис. 1. Содержание ФЛ и КТ в центральной и периферической зонах листовых пластин устойчивого к мучнистой росе дерева (а) и восприимчивого к ней (б). 1 – центральная часть листа; 2 – периферическая. ФЛ – гликозиды флавонолов; КТ – конденсированные танины.

зались сильно и очень сильно инфицированными (50–70 и >75%).

Значительные биохимические отличия между устойчивыми и восприимчивыми к мучнистой росе деревьями могут указывать на то, что изменение содержания вторичных веществ является следствием индуцированного патогеном дополнительного синтеза таких компонентов, как КТ (в сумме с К), и заметного снижения уровня ФЛ. Уточнить характер влияния патогена на биохимические показатели позволил анализ различных зон листовой пластины восприимчивого к мучнистой росе дерева, так как гифы гриба располагаются, как правило, вдоль центральной и боковых жилок, а краевые зоны листа оказываются свободными от инфекции. Содержание ФЛ и КТ в разных зонах листовой пластины устойчивого и восприимчивого к мучнистой росе деревьев показано в виде гистограммы на рис. 1 (анализировали по 8 листьев каждого дерева).

Рис. 1 свидетельствует, что содержание ФЛ и КТ в листьях устойчивого к патогену дерева явля-

ется практически одинаковым как в центральной, так и периферической зонах. В листьях, инфицированных мучнистой росой (рис. 1), в центральной зоне листа, покрытой гифами гриба, содержание ФЛ падает на 16–40%, в то время как содержание КТ увеличивается более чем в 2 раза. Иными словами, под влиянием инфекции происходит смещение активности синтеза этих веществ таким образом, что содержание ФЛ в центральной зоне листа (покрытой мицелием) падает, но увеличивается в свободной от инфекции периферической зоне. КТ, напротив, почти в 2 раза активнее синтезируются в центральной (инфицированной) зоне листа. Причем, повышенный уровень КТ, как показал анализ, не является токсичным для разрастающегося мицелия, что и составляет, видимо, причину того, что этот патоген (относящийся к биотрофам) так активно поражает насаждения дуба. В то же время ФЛ, вероятно, токсичны для патогена, так как в инфицированной зоне листа наблюдается заметное снижение их уровня. Анализ ГТ устойчивых и восприимчи-

Таблица 1. Биохимические показатели листьев устойчивых и восприимчивых к мучнистой росе деревьев 16-летней культуры дуба черешчатого

Группа деревьев	Диаметр ствола, см	Содержание				
		белка	ГТ	КТ	ФЛ	Кв
Устойчивая ($n = 15$)	8.07 ± 0.65	10.89 ± 0.23	2.03 ± 0.116	$0.88 \pm 0.10^*$	0.60 ± 0.04	$0.18 \pm 0.015^*$
	31.4	8.1	22.1	43.2	26.6	32.6
Восприимчивая ($n = 20$)	8.65 ± 0.77	10.96 ± 0.30	2.12 ± 0.1	$1.36 \pm 0.16^*$	0.53 ± 0.05	$0.15 \pm 0.02^*$
	40.0	12.3	22.3	54.5	45.2	57.1

Примечание: в числителе – содержание вещества в % воз-сух. веса; в знаменателе – коэффициент вариации признака, CV%; * достоверность различий по Tst ≥ 2.0 . В табл. 1–3: ГТ – гидролизуемые танины; КТ – сумма низкомолекулярных катехинов и конденсированных танинов; ФЛ – гликозиды флавонолов; Кв – агликон кверцетин.

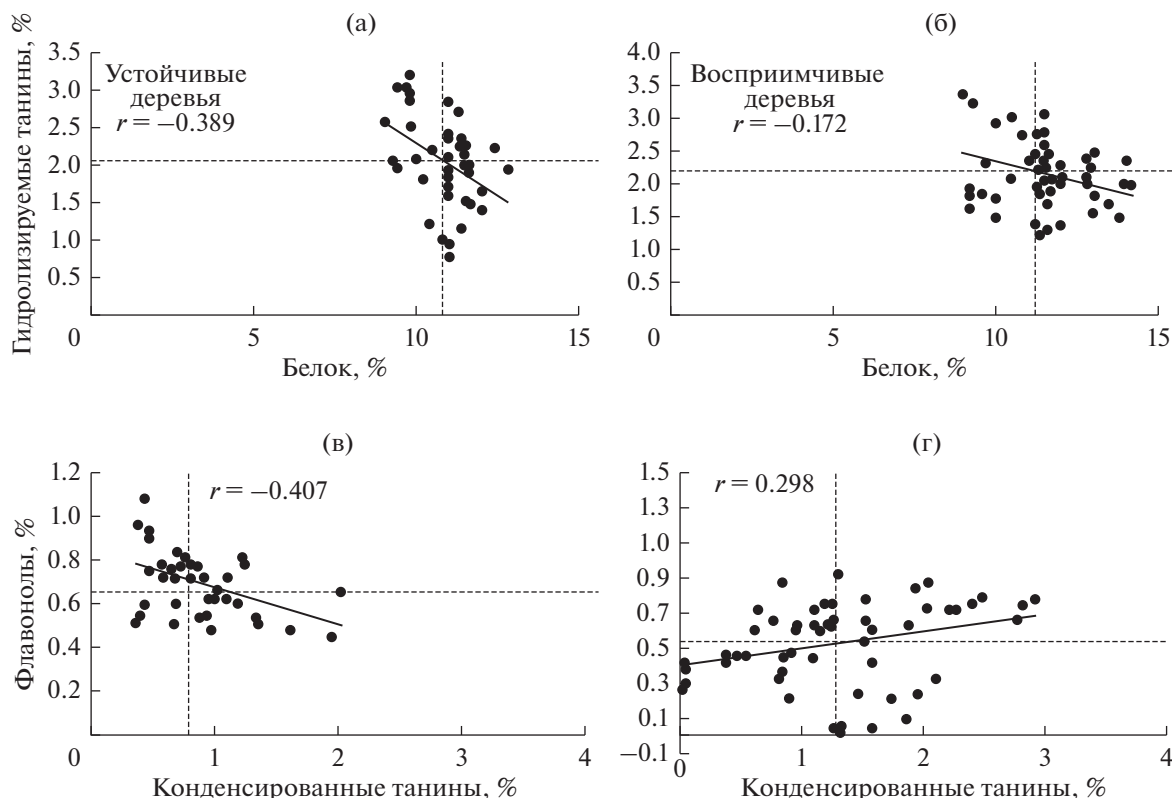


Рис. 2. Корреляции биохимических признаков в листьях устойчивых (15 особей) и восприимчивых (20 особей) к мучнистой росе деревьев. а, б – корреляции признаков “белок – гидролизуемые танины” (Б-ГТ); в, г – корреляции признаков “конденсированные танины – флавонолы” (КТ-ФЛ). Штриховая линия – средние значения признаков. В анализ включены показатели четырех листьев каждого дерева.

вых деревьев показал незначительное снижение их содержания от центральной зоны к периферической – на 15–18%.

Содержание белка достоверно оценить сложнее, так как при сильном инфицировании зона листа, покрытая мицелием, может показать его повышенный уровень. Поэтому определяли белок только в разных зонах листа устойчивого дерева. Анализ 12 листьев устойчивого дерева показал повышенное на 6.5% содержание белка в центральной зоне по сравнению с периферической, что может быть причиной более активного инфицирования именно центральной зоны листовой пластины (Полякова и др., 2014а).

Отличие в поведении разных групп вторичных веществ под влиянием инфекции – с одной стороны, мало изменяющихся количественно белка и ГТ, а с другой стороны, показывающих заметный индуцированный синтез КТ и ФЛ достаточно отчетливо проявляется при определении корреляционной структуры этих признаков в листьях здоровых и инфицированных мучнистой росой деревьев культуры (рис. 2).

Рис. 2 показывает, что в группах деревьев, устойчивых к инфекции, наблюдается достоверная негативная корреляция между содержанием, с од-

ной стороны белка и ГТ (–0.389) и с другой – фенилпропаноидных структур ФЛ-КТ (–0.407). В группе восприимчивых к патогену деревьев наблюдается ослабление негативной корреляции белка и ГТ до уровня –0.172 (недостоверное значение). Взаимосвязь веществ фенилпропаноидной структуры в группе восприимчивых к патогену деревьев изменилась на позитивную (0.298), что может определяться более активным (индуцированным) возрастанием уровня КТ в инфицированных листьях, в которых первоначально был более высокий уровень ФЛ.

Фенилпропаноидная группа веществ (КТ и ФЛ) показывает близкие значения обоих показателей для деревьев устойчивой группы, что отражается достаточно сильной и негативной корреляционной связью (рис. 2в). Значительный разброс показателей отмечается в листьях деревьев, восприимчивых к инфекции (рис. 2г). По штриховым линиям средних значений признаков отчетливо проявляется смещение численных показателей для КТ в сторону повышенных значений, а для ФЛ в сторону пониженных.

Следует отметить, что наблюдаемые взаимосвязи данных биохимических признаков не просто отражают особенности их поведения в дере-

Таблица 2. Парные коэффициенты корреляции Пирсона биохимических показателей листьев плюсовых и минусовых групп деревьев 16-летней культуры дуба

Группа деревьев	Белок-ГТ	ФЛ-К	К-Кв	ФЛ-Кв	Диаметр ствола, см
Плюсовая устойчивая	-0.627**	-0.898**	0.847**	-0.735**	12.2 + 0.62
	0.122	-0.206	-0.448*	0.517*	13.6 + 0.64
Минусовая устойчивая	-0.079	0.565*	-0.015	-0.304	4.4 + 0.3
	0.074	-0.430*	-0.163	0.245	5.0 + 0.32

* $P \geq 0.05$, ** $P \geq 0.01$. Примечание: обозначения те же, что в табл. 1 за исключением К – обозначает фракцию низкомолекулярных катехинов; диаметр ствола деревьев плюсовой и минусовой групп дан в показателях среднего диаметра отдельно для устойчивых и восприимчивых деревьев каждой группы.

вях данной 16-летней культуры, но находятся в надежном соответствии с имеющимися в литературе данными об особенностях биосинтеза этих структур в растительном организме по шикиматному пути образования аминокислоты фенилаланина и флавоноидов (Vogt, 2010).

Считается, что ГТ, синтезируемые на основе галловой кислоты, берут начало от предшественника – дегидрошикимовой кислоты (Ossipov et al., 2001), которая одновременно является предшественником аминокислоты фенилаланина. Таким образом, обнаруживаемая нами устойчивая негативная корреляция между содержанием белка и ГТ во всех случаях анализа популяций сеянцев и взрослых деревьев дуба (Полякова и др., 2014б), вероятно, является отражением конкуренции за общий биосинтетический предшественник – аминокислоту фенилаланин – для белка и галловой кислоты (ГТ). При этом характерная для растений жесткая регуляция синтеза белка (CV – 8–12%) оказывает, вероятно, некоторое стабилизирующее влияние и на вариабельность группы ГТ, которая намного ниже, чем фенилпропаноидных структур – согласно данным табл. 1.

Фенилпропаноидные структуры – ФЛ и КТ, согласно шикиматному пути биосинтеза, связаны другим общим предшественником – дигидрокверцетином (Onkokesung et al., 2014). Борьба за предшественника также определяет преимущественно негативную корреляцию между накоплением этих структур в неповрежденном растении. Однако значительная позитивная корреляция, которую показывают инфицированные листья, может указывать на то, что в данном случае происходит не просто изменение пропорций, но и перепрограммирование регуляторной активности синтеза этих веществ с негативного характера корреляции (устойчивые деревья) на выраженную позитивную (инфицированные). Это может указывать на нарушение сбалансированности образования этих структур под влиянием патогена (Peters, Constabel, 2002).

Для того, чтобы оценить влияние сбалансированности метаболизма данных структур на состояние деревьев дуба как в плане устойчивости к рассматриваемой инфекции, так и особенностей их развития, сравнили показатели корреляции признаков в листьях плюсовых и минусовых деревьев культуры (табл. 2).

Данные т. 2 показывают, что наиболее высокие коэффициенты корреляции связывают все указанные группы компонентов в листьях плюсовых деревьев, устойчивых к мучнистой росе. Это может свидетельствовать о метаболической сбалансированности вторичных и первичных веществ в листьях деревьев, наиболее приспособленных и продуктивных в своей среде обитания. Негативная корреляция устойчивых групп деревьев для структур ФЛ-Кв (агликон Кв и образованные на его основе гликозиды – ФЛ) подтверждается данными, полученными с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для Кв и построенных на его основе гликозидов ФЛ в листьях курильского чая (Андышева, Храмова, 2015).

Минусовая группа деревьев, согласно коэффициентам корреляции, характеризуется отсутствием сбалансированности групп белок – ГТ, ФЛ-Кв и наличием позитивной корреляции ФЛ-КТ даже среди устойчивых деревьев. Эти нарушения, вероятно, могут служить одной из причин низкой ростовой активности деревьев минусовой группы.

Согласно данным табл. 2 показатели диаметра устойчивых деревьев как плюсовой, так и минусовой групп оказались на 11.5 и 13%, соответственно, ниже по сравнению с диаметрами восприимчивых к мучнистой росе деревьев тех же групп. Согласно данным т. 1, в целом по культуре восприимчивые деревья (20 особей) на 7.2% превосходят группу устойчивых деревьев (15 особей) по показателю среднего диаметра. Вполне возможно, что инфицирование деревьев патогеном каким-то образом влияет на их ростовую активность.

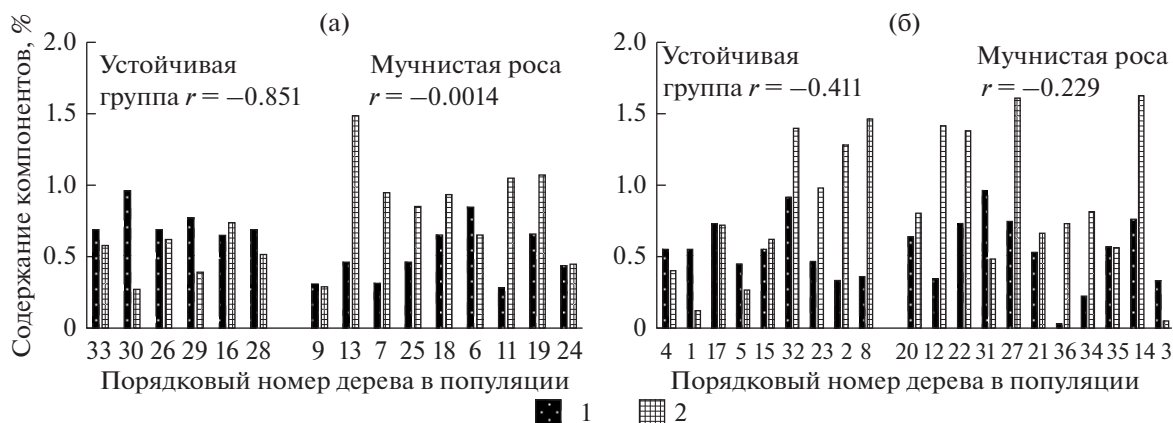


Рис. 3. Структура популяции дуба черешчатого (16-летняя культура) в зависимости от одного из основных ростовых параметров – диаметра дерева – в показателях содержания в листьях ФЛ и КТ. а – кодоминантно-доминантная группа; б – угнетенно-подчиненная группа; в каждой группе выделены устойчивые и восприимчивые к мучнистой росе деревья, указаны соответствующие коэффициенты корреляции данных признаков. 1 – ФЛ; 2 – КТ (в сумме с К).

Структура популяции в показателях диаметра может быть представлена на основе вариационного распределения признака. Вся выборка деревьев была разбита на 4 группы: 1-я – диаметр < $(\bar{x} - 1\sigma)$ – угнетенные деревья); 2-я – в диапазоне $(\bar{x} - 1\sigma)$ – (подчиненные); 3-я – в диапазоне $(\bar{x} + 1\sigma)$ – (кодоминантные); 4-я – значения > $(\bar{x} + 1\sigma)$ – (доминантные). Для наглядности деревья объединили в две группы – кодоминантные + доминантные и угнетенные + подчиненные и оценили их биохимическое разнообразие в параметрах показателей ФЛ и КТ (рис. 3).

Рис. 3 показывает, что наиболее сбалансированное соотношение ФЛ и КТ характерно для устойчивых деревьев кодоминантно-доминантной группы ($r = -0.851$). Причем, наблюдаются относительно близкие численные уровни обеих групп веществ в большинстве деревьев. Нарушение пропорций отчетливо проявляется в инфицированных деревьях этой группы, т.к. заметно более низкий уровень ФЛ показали 6 деревьев из 9, а у 3 деревьев был уровень, сравнимый с устойчивыми деревьями. Аналогичное разнообразие отмечается и в отношении содержания КТ в восприимчивых деревьях группы – при общем заметно более высоком содержании этих веществ уровень их в двух деревьях оказался очень низким (№№ 9, 24) или сравнимым с устойчивыми деревьями (№ 6).

Еще более заметное разнообразие показывают деревья угнетенно-подчиненной группы, как устойчивые, так и восприимчивые. Даже среди устойчивых деревьев группы при общем сниженном содержании ФЛ и повышенном КТ наблюдаются самые разнообразные пропорции этих веществ. А именно: 5 деревьев из 9 показывают соотношение ФЛ и КТ, характерное для устойчивых деревьев (повышенный уровень ФЛ и пони-

женный КТ), а у 4 деревьев варианты соотношения ФЛ и КТ характерны для восприимчивых деревьев. Т.е., даже среди устойчивых к инфекции деревьев пониженной и низкой ростовой активности возможны различные биохимические варианты, что проявляется соответственно в пониженном коэффициенте корреляции между ФЛ и КТ ($r = -0.411$). При этом можно отметить, что встречаются особи с редуцированным синтезом либо ФЛ (№ 36), либо КТ (№ 1, № 3). Это указывает на возможность существенных нарушений метаболизма вторичных веществ в деревьях низкой ростовой активности.

Таким образом, оценить потенциальную устойчивость к мучнистой росе только на основании численных показателей – повышенного уровня ФЛ в листьях или низкого уровня КТ, не представляется возможным, т.к. в основе процесса невосприимчивости к мучнистой росе лежит, скорее всего, устойчивость регуляторной системы дерева, способной поддерживать синтез этих структур на конститутивном уровне даже в условиях распространения инфекции. Значение фактора регуляции синтеза фенилпропаноидных структур в поддержании устойчивости к вредителям показано на примере культуры *Arabidopsis* (Onkokesung et al., 2014).

Некоторым отражением фактора устойчивости регуляторной системы может служить то, что наблюдают фитопатологи на листьях деревьев дуба, устойчивых к мучнистой росе – есть зоны внедрения патогена, но нет разрастания эпифитного мицелия. В этом случае, вероятно, сохраняется устойчивая регуляция синтеза фенилпропаноидных веществ на конститутивном уровне, что проявляется как сильная и средней силы негативная корреляция взаимосвязи ФЛ–КТ в листьях деревьев, устойчивых к МР ($r = -0.851$ и $r = -0.411$

Таблица 3. Парные коэффициенты корреляции Пирсона некоторых биохимических показателей и диаметра ствола деревьев

Группа деревьев	Белок-диаметр	ГТ-диаметр
Общая выборка деревьев ($n = 35$)	-0.318*	0.013
Плюсовая группа ($n = 8$)	0.135	-0.366
Средняя группа ($n = 19$)	-0.325	-0.371
Минусовая группа ($n = 8$)	-0.474	0.189

* $P \leq 0.05$. Примечание: обозначения см. табл. 1.

для кодоминантно-доминантной и угнетенно-подчиненной групп соответственно). В случае ослабленной регуляторной системы под влиянием патогена нарушается взаимосвязь между этими структурами – корреляции принимают значения соответственно $r = -0.0014$ и $r = 0.229$ в восприимчивых к рассматриваемой инфекции кодоминантно-доминантной и угнетенно-подчиненной группах деревьев, что сопровождается активным разрастанием эпифитного мицелия на поверхности листьев.

В целом высокой сбалансированностью веществ белок и ГТ и фенилпропаноидной структуры (ФЛ-КТ и ФЛ-Кв) отличаются только устойчивые к мучнистой росе деревья высокой и повышенной ростовой активности – доминантные и кодоминантные.

Поскольку уровни содержания белка и ГТ под влиянием рассматриваемой инфекции меняются менее заметно, чем фенилпропаноидные структуры, оценили также влияние этих показателей на диаметр всех деревьев 16-летней культуры (табл. 3).

Как показывают данные т. 3 уровень содержания белка в листьях негативно коррелирует с диаметром дерева. Вместе с тем отчетливое влияние количественно ведущей группы вторичных веществ – ГТ достоверно не прослеживается, хотя и близко к среднему негативному уровню в наиболее многочисленной средней группе деревьев (диапазон изменчивости диаметра в пределах $(\bar{x} \pm 1\sigma)$).

В данной работе, посвященной устойчивости деревьев дуба к мучнистой росе, прослеживается значительная роль вторичных метаболитов фенилпропаноидной структуры в формировании устойчивости деревьев к данной инфекции – это флавонолы и конденсированные танины, построенные на основе катехинов. Особенного внимания заслуживает группа флавонолов (в листьях дуба это в основном гликозиды кверцетина) (Salminen et al., 2004), так как именно эти структуры оказывают многофункциональное влияние на растительный организм.

С одной стороны, на модельных растениях *Arabidopsis* было установлено свойство ФЛ ингибировать осевой транспорт ауксинов и вызывать

задержку развития растений (Kuhn et al., 2011). Это свойство было отмечено также на эксплантах дуба черешчатого при микроклонировании *in vitro*, а также на 1-летних сеянцах полусибового потомства, как снижение активности корнеобразования и ростовой активности при повышенном уровне ФЛ в листьях (Полякова, Литвиненко, 2016). В соответствии с этим снижение уровня ФЛ в листьях активно растущих, но инфицированных МР молодых деревьев дуба, может сопровождаться повышением их ростовой активности – как было отмечено в 2-х летней культуре дуба – на 32% (Полякова и др., 2014а). В 16-летней культуре диаметр устойчивых плюсовых деревьев в среднем был на 11.5% ниже, чем восприимчивых, а устойчивых минусовых деревьев на 13% ниже, чем восприимчивых в своей группе (табл. 2). В выборке данной культуры из 35 особей отмечено общее превышение диаметра группы инфицированных деревьев по сравнению с группой устойчивых на 7.2%, (табл. 1).

Следствием повышенной ростовой активности инфицированных деревьев является то, что они могут доминировать в насаждениях, обеспечивая некоторое продуктивное и семенное преимущество. Потенциальная устойчивость к мучнистой росе семенного потомства насаждения (культуры) дуба может быть повышена, если использовать сбор желудей преимущественно под кронами устойчивых материнских деревьев. Анализ наследуемости устойчивости (восприимчивости) к мучнистой росе полусибовым потомством устойчивого 600-летнего и восприимчивого 300-летнего деревьев (желуди собраны под их кронами) показал достаточно высокий уровень наследуемости признака, так как наследуемость в узком смысле составила 0.78 для 600-летнего дерева и 0.42 для 300-летнего. Участие материнского фактора в наследовании признака подтвердилось также расчетом численности устойчивых к мучнистой росе 6-месячных сеянцев в потомствах этих деревьев – численность устойчивых сеянцев в потомстве 600-летнего дерева составила 57%, в то время как в потомстве 300-летнего – 25% (Полякова и др., 2014а).

С другой стороны, снижение уровня ФЛ в листьях восприимчивых к инфекции деревьев может отражаться на их более низкой антиокси-

дантной защите от внешних повреждающих факторов. Известно, что ФЛ присутствуют практически во всех растениях и вследствие своей способности служить донорами электронов или атомов водорода их относят к вторичной антиоксидантной системе. Особое значение придается кверцетину и его гликозилированным производным – ФЛ, так как они наиболее активны в процессах экранирования клеток от УФ радиации, могут взаимодействовать с перекисями, свободными радикалами, предполагается, что гликозиды Кв могут находиться в оболочке хлоропластов и защищать их от избыточного солнечного света (Ryan et al., 2002; Agati et al., 2012). Вероятно, не случайно, что в листьях деревьев устойчивой группы обнаружено на 20% больше свободного Кв и на 12% больше ФЛ по сравнению с их содержанием в листьях инфицированных деревьев (табл. 1).

Дестабилизация метаболизма вторичных веществ под влиянием инфекции мучнистой росы с возрастом может повысить уязвимость деревьев к атакам разнообразных видов патогенов и насекомых, увеличить чувствительность к повышенным температурам и засухе. Высокий уровень инфицированных деревьев в 16-летней культуре подтверждает данные о том, что в молодых культурах восприимчивость к мучнистой росе не снижается, а возрастает. Это может быть одной из причин усиления патологического фактора в наблюдаемой деградации насаждений дуба, а также резкого снижения площади дубрав и сокращения доли участия дуба как лесокультурной породы (Каплина, Селочник, 2015). При этом изменение климата может влиять на усиление заболевания в основном за счет изменения патогеном фенологической синхронности, соответствующей изменению растения-хозяина. Снижение уровня фотосинтеза и биологической устойчивости деревьев под влиянием инфекции *Erysiphe alphythoides* становится фактором, снижающим жизнеспособность дубовых лесов (Marçais, Desprez-Loustau, 2014).

Заключение. Данные биохимического анализа показали, что в листьях деревьев дуба черешчатого, восприимчивых к инфекции мучнистой росы, наблюдаются существенные изменения в количественных пропорциях и корреляционных связях вторичных веществ структуры фенолпропаноидов. В листьях восприимчивых деревьев синтезируется в среднем на 50–150% больше КТ и на 20–40% меньше гликозидов ФЛ. Значительное увеличение уровня КТ рассматривается как индуцированное инфекцией, причем их повышенный уровень, вероятно, не является токсичным для патогена, так как не останавливает разрастания мицелия на поверхности листьев. Снижение уровня ФЛ в зоне листа, покрытой мицелием гриба, напротив, указывает на вероятную токсичность ФЛ. Значительная вариабельность обеих

структур в деревьях культуры не позволяет оценить потенциальную устойчивость дерева к патогену достаточно простыми методами – только по фиксации повышенного содержания ФЛ и пониженного КТ в листьях. Сделано предположение, что устойчивость к мучнистой росе зависит от регуляторной системы, контролирующей синтез таких структур, как Кв, К, ФЛ, КТ, что оценивалось нами согласно корреляционной структуре признаков в разных по устойчивости и продуктивности группах деревьев. Наиболее высокая метаболическая сбалансированность веществ вторичного обмена оказалась характерной для устойчивых деревьев плюсовой группы.

Физиологические особенности влияния ФЛ на ростовую активность позволяют объяснить некоторое превышение по диаметру восприимчивых деревьев по сравнению с устойчивыми. При этом инфицированные деревья представляют собой ослабленную часть насаждения в плане устойчивости к разнообразным внешним факторам (как биотическим так и абиотическим), вследствие чего они могут приводить как к ранней суховершинности деревьев (Полякова и др., 2014б), так и более заметной элиминации их из состава насаждения с возрастом (Dietze, Matthes, 2014).

Выполненный ранее расчет наследуемости признака устойчивости к мучнистой росе показал, что восприимчивость сеянцев полусибового потомства дерева к инфекции может зависеть от материнского фактора. Это подтвердили высокие коэффициенты наследуемости признака и подсчет численности устойчивых к инфекции сеянцев в полусибовом потомстве 600-летнего (устойчивого) и 300-летнего (восприимчивого) деревьев. В связи с этим, вероятно, одним из способов оздоровления вновь создаваемых лесокультур дуба черешчатого может стать выборочный сбор семян с деревьев устойчивых к инфекции или слабо (до 20%) инфицированных мучнистой росой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андышева Е.В., Храмова Е.П. Сезонная динамика накопления фенольных соединений *Pentaphylloides fruticosae* при интродукции на юге Амурской области, *Материалы IX международного симпозиума “Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты”*. г. Москва. 20–25 апреля 2015. М.: ИФР РАН, 2015. С. 200–205.
- Беликов В.В., Оценка содержания флавоноидов – производных в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaerth. *Растительные ресурсы*. 1985. № 3. С. 198–204.
- Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного. *Физиология растений*. 1982. Т. 29. № 1. С. 350–358.
- Каплина Н.Ф., Селочник Н.Н. Текущее и долговременное состояние дуба черешчатого в трех контрастных типах леса южной лесостепи. *Лесоведение*. 2015. № 3. С. 191–201.

- Полякова Л.В., Болтенков Ю.А. Корреляция первичных и вторичных метаболитов как показатель формирования коадаптивных комплексов в листьях дуба черешчатого. *Матер. Междунар. науч.-практ. конф. "Биоразнообразие и устойчивое развитие"*. г. Симферополь. 19–23 мая. Таврический нац. университет. 2010. С. 100–104.
- Полякова Л.В., Литвиненко В.И. Биохимическое разнообразие полусибирского потомства деревьев дуба черешчатого как источник отбора генотипов для микроклонирования. *Бюллетень Никитского Ботанического сада*. 2016. № 121. С. 24–32.
- Полякова Л.В., Гамаюнова С.Г., Журова П.Т. Анализ взаимодействия между биохимическими параметрами и устойчивостью деревьев дуба черешчатого в культурах разного возраста. *Лісівництво і Агроекологія*. 2014а. № 124. С. 185–195.
- Полякова Л.В., Гамаюнова С.Г., Журова П.Т., Литвиненко В.И. Биохимические особенности суховершинных деревьев дуба черешчатого. *Лесоведение*. 2014б. № мис т 4. С. 28–35.
- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., M. T. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*. 2012. V. 196. P. 67–76.
- Bert D., Lasnier J.-B., Capdevielle X., Dugravot A., Desprez-Loustau M.-L. Powdery mildew decreases the radial growth of oak trees with cumulative and delayed effects over years. *PLOS ONE*. 2016. V. 11. № 5. Article e0155344.
- Dietze M.C., Matthes J.H. A general ecophysiological framework for modelling the impact of pests and pathogens on forest ecosystems. *Ecology Letters*. 2014. V. 17. № 11. P. 1418–1426.
- Julkunen-Tiitto R., Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 1985. V. 33. № 2. P. 213–217.
- Kuhn B.M., Geisler M., Bigler L., Ringli C. Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2011. V. 156. № 2. P. 585–595.
- Marçais B., Desprez-Loustau M.-L. European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Annals of Forest Science*. 2014. V. 71. № 6. P. 633–642.
- Onkokesung N., Reichelt M., Van Doorn A., Schuurink R.C., Van Loon J.J.A., Dicke M. Modulation of flavonoid metabolites in Arabidopsis thaliana through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dihydroxamate in resistance to the specialist insect herbivore Pieris brassicae. *J. Experimental Botany*. 2014. V. 65. № 8. P. 2203–2217.
- Ossipov V., Salminen J.-P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003. V. 31. № 1. P. 3–16.
- Pap P., Stojnić S., Nikolić N., Orlović S., Marković M., Vasić V., Stevanov M. Impact of Erysiphe alphitoides (Griffon & Maubl.) on leaf physiological parameters in pedunculate oak (Quercus robur L.) saplings. *Baltic forestry*. 2014. V. 20. № 1. P. 2–9.
- Peters D.J., Constabel C.P. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (Populus tremuloides). *The Plant J*. 2002. V. 32. № 5. P. 701–712.
- Ryan K.G., Swinny E.E., Markham K.R., Winefield C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant Petunia leaves. *Phytochemistry*. 2002. V. 59. № 1. P. 23–32.
- Salminen J.-P., Roslin T., Karonen M., Sinkkonen J., Pinlaja K., Pulkkinen P. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides and proanthocyanidins in oak leaves. *J. Chemical Ecology*. 2004. V. 30. № 9. P. 1693–1702.
- Swain T., Hillis W.E. The phenolic constituents of Prunus domestica. I. — The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. the Science of Food and Agriculture*. 1959. V. 10. № 1. P. 63–68.
- Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*. 2010. V. 3. № 1. P. 2–20.

Role of Secondary Metabolites in Development of Resistance to Powdery Mildew on Trees of 16-Year Old Plantation of English Oak

L. V. Polyakova^{1,2,*} and V. I. Litvinenko^{2,3}

¹Research Institute of Forest Genetics and Breeding
Lomonosov st. 105, Voronezh, 394087 Russia

²Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration
Pushkinska st. 86, Kharkiv, 61024 Ukraine

³State Research Center of Medications
Astronomicheskaya st. 33, Kharkiv, 61085 Ukraine

*E-mail: polyakova_lv@mail.ru

Received 10 December 2016

Revised 5 April 2018

Accepted 8 October 2018

16-years old plantation of English oak, having 57% infected by powdery mildew, was studied. Biochemical data showed significant differences in synthesis of secondary metabolites of phenylpropanoid structure (flavonols (FL) and condensed tannins(CT)) between resistant and vulnerable trees to powdery mildew. Vulnerable trees synthesize on average 50–150% more of CT, and 20–40% less of FL. Elevated level of CT is likely not toxic to the pathogen because it does not limit growth of mycelium on a surface of a leaf. Contrarily,

decrease in FL level in part of a leaf, covered by the mycelium points to their likely toxicity. Changes in proportions of CT and FL, synthesized in leaves, caused by pathogens points to a destabilization of secondary metabolism in the vulnerable trees. Also, mean diameter of the resistant trees was 7.2% less than of the vulnerable to infection. This might be caused by the decrease in FL, which are known as inhibitors of axial transport of auxins. An important feature of FL is antioxidant activity, rising resistance to UVB radiation, draughts as well as reducing injuries from active forms of oxygen. Decrease in FL content in leaves, vulnerable to powdery mildew may affect their sustainability and may result in earlier elimination from forest.

Keywords: English oak, powdery mildew, secondary metabolites, hydrolysable tannins, condensed tannins, catechins, flavonols.

REFERENCES

- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., M. T., Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance, *Plant Science*, 2012, Vol. 196, pp. 67–76.
- Andysheva E.V., Khramova E.P., Sezonnaya dinamika nakopleniya fenol'nykh soedinenii *Pentaphylloides fruticosa* pri introduktsii na yuge Amurskoi oblasti (Seasonal dynamics of accumulation of phenolic compounds in *Pentaphylloides fruticosa* introduced in southern Amur Oblast), *Phenolic compounds: fundamentals and applications*, Proc. conf., Moscow, 20–25 April 2015, Moscow: Izd-vo IFR RAN, 2015, pp. 200–205.
- Belikov V.V., Otsenka soderzhaniya flavononol – proizvodnykh v plodakh *Silybum marianum* (L.) Gaerth. (Estimation of flavonols' derivants in fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaerth.), *Rastitel'nye resursy*, 1985, No. 3, pp. 350–358.
- Bert D., Lasnier J.-B., Capdevielle X., Dugravot A., Desprez-Loustau M.-L., Powdery mildew decreases the radial growth of oak trees with cumulative and delayed effects over years, *PLOS ONE*, 2016, Vol. 11, No. 5, Article e0155344.
- Buzun G.A., Dzhemukhadze K.M., Mileshko L.F., Opredelenie belka v rasteniyakh s pomoshch'yu amido-chnernogo (Detection of protein in plants with amido black), *Fiziologiya rastenii*, 1982, Vol. 29, No. 1, pp. 198–204.
- Dietze M.C., Matthes J.H., A general ecophysiological framework for modelling the impact of pests and pathogens on forest ecosystems, *Ecology Letters*, 2014, Vol. 17, No. 11, pp. 1418–1426.
- Julkunen-Tiitto R., Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, Vol. 33, No. 2, pp. 213–217.
- Kuhn B.M., Geisler M., Bigler L., Ringli C., Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 2011, Vol. 156, No. 2, pp. 585–595.
- Marçais B., Desprez-Loustau M.-L., European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change, *Annals of Forest Science*, 2014, Vol. 71, No. 6, pp. 633–642.
- Onkokesung N., Reichelt M., Van Doorn A., Schuurink R.C., Van Loon J.J.A., Dicke M., Modulation of flavonoid metabolites in Arabidopsis thaliana through overexpression of the MYB75 transcription factor: role of kaempferol-3,7-dirhamnoside in resistance to the specialist insect herbivore Pieris brassicae, *Journal of Experimental Botany*, 2014, Vol. 65, No. 8, pp. 2203–2217.
- Ossipov V., Salminen J.-P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K., Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, Vol. 31, No. 1, pp. 3–16.
- Pap P., Stojnić S., Nikolić N., Orlović S., Marković M., Vasić V., Stevanov M., Impact of *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) on leaf physiological parameters in pedunculate oak (*Quercus robur* L.) saplings, *Baltic forestry*, 2014, Vol. 20, No. 1, pp. 2–9.
- Peters D.J., Constabel C.P., Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*), *The Plant Journal*, 2002, Vol. 32, No. 5, pp. 701–712.
- Polyakova L.V., Gamayunova S.G., Jurova P.T., Analiz vzaimodeistviya mezhdubiohimicheskimi parametrami i ustoichivost'yu derev'ev duba chereschatogo v kul'turakh raznogo vozrasta (Analysis of correlations between biochemical traits, biometrical parameters and resistance for *Quercus robur* L. trees in the cultures of different age), In: *Lisivnitsvo i agrolisomeliorsiya (Forestry & forest melioration)* Kharkiv: URIFFM, 2014, pp. 185–195.
- Polyakova L.V., Gamayunova S.G., Zhurova P.T., Litvinenko V.I., Biochemical specifics of English oak trees with dry crown, *Contemporary Problems of Ecology*, 2015, Vol. 8, No. 7, pp. 885–891.
- Polyakova L.V., Litvinenko V.I., Biokhimicheskoe raznobrazie polusibovogo potomstva derev'ev duba chereschatogo kak istochnik otbora genotipov dlya mikroklonirovaniya (Biochemical diversity of half-sib progeny of *Quercus robur* trees as genotypes for microcloning), *Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada*, 2016, No. 121, pp. 24–32.
- Ryan K.G., Swinny E.E., Markham K.R., Winefield C., Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves, *Phytochemistry*, 2002, Vol. 59, No. 1, pp. 23–32.
- Salminen J.-P., Roslin T., Karonen M., Sinkkonen J., Pihlaja K., Pulkkinen P., Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides and proanthocyanidins in oak leaves, *Journal of Chemical Ecology*, 2004, Vol. 30, No. 9, pp. 1693–1702.
- Swain T., Hillis W.E., The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1959, Vol. 10, No. 1, pp. 63–68.
- Vogt T., Phenylpropanoid Biosynthesis, *Molecular Plant*, 2010, Vol. 3, No. 1, pp. 2–20.