

Изучение взаимоотношений в системе “растение-хозяин – патоген” на примере сосны обыкновенной и факультативного сапротрофа *Lophodermium seeditiosum* Minter, Staley & Millar.

В. А. СЕНАШОВА, А. А. АНИСКИНА, Г. Г. ПОЛЯКОВА

Институт леса имени В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28
E-mail: vera0612@mail.ru

Статья поступила 18.01.2023

После доработки 08.02.2023

Принята к печати 10.02.2023

АННОТАЦИЯ

Рассмотрено взаимодействие в системе “эпифитные микроорганизмы – растение-хозяин – патоген” на примере сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), искусственно зараженных факультативным сапротрофом *Lophodermium seeditiosum* Minter, Staley & Millar. При этом исследовали изменение численности эпифитных микроорганизмов, состава и концентрации летучих соединений, морфологических параметров сосны в разных вариантах опыта. Рассматривали влияние на исследуемые характеристики двух факторов: заражение *L. seeditiosum* и внесение микокомпоста в почву. Использовали стандартные фитопатологические и микробиологические методы. Летучие соединения изучали с помощью хромато-масс-спектрометрии, фитонцидную активность – адаптированным методом Токина. На стадии прорастания аскоспоры отмечено увеличение количества летучих компонентов, выделяемых пораженной хвоей, и уменьшение числа таковых, выделяемых корнями зараженных растений. При этом содержание α-пинена в летучей фракции хвоинок с некротическими пятнами снижено на 24 % по сравнению со здоровыми. В опытных образцах доли некоторых терпенов увеличиваются, так, содержание 3-карена превысило в 2,3 раза контрольные значения. На фоне изменения компонентного состава летучих соединений установлено повышение фитонцидной активности листовой и корневой систем растений с признаками заболевания по сравнению с экземплярами без признаков повреждений. Об этом же свидетельствуют и результаты микробиологических посевов: в вариантах с заражением по сравнению с контрольными отмечено достоверное снижение численности эпифитных микроорганизмов. Установлено достоверное увеличение массы хвоинок в вариантах с инфицированием и при внесении микокомпоста, подтвержденное анализом ANOVA. Зарегистрированные эффекты соответствуют адаптационному синдрому Селье (активации физиологических процессов на раннем этапе неблагоприятного воздействия, сменяющейся истощением организма, если нагрузка продолжается).

Ключевые слова: обыкновенное шютте, сосна обыкновенная, летучие соединения, терпены, эпифитные микроорганизмы, фитонцидная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы, являясь важнейшей составляющей биосферы, активно взаимодей-

ствуют с живыми организмами, в том числе и растениями. При этом каждый из органов растения представляет собой экологическую

нишу, заселенную микроскопическими существами: филлосферу (надземная часть растения), филлоплану (листовой аппарат), каллосферу (стебель), геммисферу (почки), антосферу (цветки), карпосферу (плоды и семена), спермосферу (семена), ризоплану (корневая система) и ризосферу (прикорневая область) [Ерина, Коптева, 2015]. Таким образом, растения выступают центрами формирования микробных сообществ. Микроорганизмы, связанные с растениями, могут играть как положительную (обеспечение организма-хозяина дополнительными питательными веществами и т. п.), так и отрицательную роль (вызывать заболевания). В большинстве случаев фитопатологическими агентами являются грибы (микромитеты), реже бактерии.

Фитопатогенные грибы являются важнейшим фактором, определяющим состояние хвойных лесов. Во время инфекционного процесса болезнетворный организм вызывает у растения физиолого-биохимические нарушения, приводящие к различным анатомо-морфологическим изменениям, что влияет на синтез вторичных метаболитов [Полякова, 2002] и, как следствие, на количественный и качественный состав эпифитного сообщества.

Рассматривая растительный организм как систему “эпифитные микроорганизмы – растение-хозяин – патоген”, наше внимание сконцентрировалось на сопряженном развитии этих компонентов через взаимодействие фитопатогенов, эпифитных микроорганизмов и вторичных метаболитов растений, в частности летучих соединений.

Поскольку эпифитные микроорганизмы играют важную роль в жизни растения-хозяина, нашу работу по изучению процессов в системе “растение-хозяин – патоген” мы начали со сравнения эпифитных сообществ здоровой филлосферы основных видов хвойных Сибири и при ее поражении различными заболеваниями [Сенашова, 2012; Сенашова и др., 2012; Сенашова, Гродницкая, 2015]. Также были проведены исследования по влиянию облигатного паразита *Melampsorella caryophyllacearum* (DC.) J. Schröt на пихту сибирскую (*Abies sibirica* Ldb.): рассмотрены изменения эпифитного комплекса, компонентного состава летучих соединений и фитонцидная активность филлосферы пихты сибирской при поражении ее ржавчинным раком в течение

вегетационного периода, а также динамика углеводов и других вторичных соединений [Сенашова, 2014; Полякова, Сенашова, 2017; Сенашова, Анискина, 2017].

На территории Средней Сибири поражения филлосферы преимущественно вызываются факультативными сапротрофами [Сенашова, 2012; Сенашова и др., 2021], но исследованиям процессов на начальных этапах заражения не уделялось внимания. Мы начали работу по комплексному изучению отношений факультативного сапротрофа и растения-хозяина на раннем этапе инфекционного процесса.

Цель данной работы – изучение взаимоотношений факультативного сапротрофа *Lo-phodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на начальной стадии инфекционного процесса. В задачи исследования включена оценка компонентного состава летучих соединений, фитонцидной активности, численности микробного комплекса, ассоциированного с растением, и морфологических характеристик сосны на примере изменения массы хвои. Исследовано влияние внесения микокомпоста в почву на все измеряемые характеристики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В рамках поставленной цели был заложен микрополевой опыт: в конце мая в трехкратной повторности проведен посев семян сосны обыкновенной (*P. sylvestris*) на опытные делянки, которые затем были укрыты нетканым материалом (плотность 17 г/м²) для предотвращения попадания на всходы инфекционного начала. В течение вегетационного сезона проводили традиционные агротехнические мероприятия (прополка, рыхление, полив). На следующий год в конце мая на две делянки (в междурядья) внесено по 1,5 кг микокомпоста – продукта биоконверсии сосновых опилок базидиомицетом *Trametes versicolor* (L.) Lloyd [Пашенова и др., 2009]. Во второй декаде июля в междурядья двух делянок была разложена мертвая хвоя сосны обыкновенной со зрелыми апотециями *L. seditiosum*. Выбор данного гриба, вызывающего шютте сосны, обусловлен тем, что является наиболее распространенным патогеном филлосферы в Средней Сибири [Сенашова и др., 2021]. Описание полученных вариантов приведено в табл. 1.

Т а б л и ц а 1
Варианты проведения эксперимента и их обозначения

Вариант эксперимента	Инфицированность сосен патогеном* (фактор “Инфицированность”)	Наличие микокомпоста в почве (фактор “Микокомпост”)
K0 (контроль)	Нет	Нет
KМ (контроль)	»	Есть
L0 (опыт)	Есть	Нет
LM (опыт)	»	Есть

* Стадия прорастания аскоспоры.

В дальнейшем посевы с опытных делянок регулярно проверяли на наличие признаков поражения шютте. На стадии прорастания аскоспор (появление некротических пятен на хвое) отбирали образцы хвои, корней и ризосферной почвы для дальнейшего исследования. Параллельно были взяты образцы и с контрольных вариантов с сеянцев без признаков повреждения (далее “здоровые”). Данный этап пришелся на вторую декаду сентября (фенофаза осеннего расцветивания листвы). Каждый образец формировали из не менее чем 10 растений.

Материалом для изучения компонентного состава летучих соединений являлись хвоя второго года жизни и корни двулетних сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (см. табл. 1).

Хвою и корни, предназначенные для анализа летучих соединений, измельчали и быстро помещали в вials “Agilent” емкостью 20 мл. В термосе со льдом вials транспортировали в лабораторию, где проводили исследование. Подготовку образцов осуществляли методом дробной мацерации (ремацерации) [Schulz, Klotz, 1953, 1954; Муравьев, 1968, 1974]. Данный классический метод построен на разности концентраций в сырье и экстрагенте и обеспечивает максимальное извлечение активов из сырья. Соотношение объема растительного образца к объему экстрагента 1 : 5. Экстрагент был разделен на три порции в соотношении по объему 3 : 1 : 1. Время настаивания – семь суток, и включает три этапа. I этап длится четверо суток, растительный материал при этом заливали первой порцией (самой большой) экстрагента. Далее (II этап) смесь отжимали (прессовали). Отжатый материал заливали второй порцией экстрагента и настаивали двое суток. На III этапе матери-

ал отжимали, заливали третьей порцией экстрагента и настаивали одни сутки. В качестве экстрагента использовали пентан.

Качественное определение компонентного состава образцов выполняли на хромато-масс-спектрометре Agilent 5975С-7890А фирмы Agilent (США) с использованием автоматического пробоотборника для жидких образцов Agilent 7683. Применяли 30-метровую кварцевую колонку НР-5 (сополимер 5 % – дифенил-95 % – диметилсилоксан) с внутренним диаметром 0,25 мм. Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1,0 мл/мин. Температура колонки: начальный изотермический участок 50 °С (2 мин), подъем температуры со скоростью 4 °С /мин от 50 до 200 °С (0 мин), 10 °С /мин до 220 °С (0 мин). Объем вводимой пробы 0,2 мкл.

Температура испарителя 280 °С, температура ионизационной камеры 170 °С, энергия ионизации 70 эВ.

Идентификацию компонентов проводили методом сравнения, по наличию и соотношению характеристичных ионов-фрагментов с использованием базы данных стандартных образцов из масс-спектральной библиотеки “NIST05a. L” и значениям линейных индексов удерживания, используя программу обработки данных AMDIS (The Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System).

При оценке фитонцидной активности использовали методику Б. П. Токина [1951], адаптированную к условиям эксперимента. В чашки Петри с равным слоем плотной питательной среды (картофельный агар) бактериологической иглой уколам высевали тестовые микроорганизмы. На крышку чашки помещали измельченную хвою/корни (≈0,2 г), чашки инкубировали в перевернутом виде при комнатной температуре, замер выросших колоний

проводили каждые 24 часа в течение четырех суток. Контролем служили изоляты, росшие без присутствия растительного материала. В качестве индикаторов активности летучих соединений хвои и корней выступали выделенные нами предварительно культуры эпифитных микромицетов (*Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Trichotecium* sp.), дрожжей (*Rhodotorula* sp.), споровых бактерий (*Bacillus* sp.), в том числе и актиномицетов (*Streptomyces* sp.) и неспоровых бактерий (*Micrococcus* sp., *Serratia* sp.).

Численность микроорганизмов филлосферы и ризопланы оценивали в лабораторных условиях методом смывов с поверхности хвои и корней с последующим посевом на плотные питательные среды. При работе с филлосферой использовали агаризированные среды Эшби (Э), Чапека (Ч), а также крахмалоаммиачный (КАА) и картофельный (КА) агары. При работе с ризопланой использовали агаризированные сусло (СА) и среду Эшби, а также крахмалоаммиачный, мясопептонный (МПА) и голодный (водный) (ГА) агары. При оценке численности ризосферных микроорганизмов проводили посев почвенной суспензии из разведений 1 : 10³ по 0,05 мл на те же питательные среды, что и при работе с ризопланой. Культивирование осуществляли при температуре 25 °С. Учет бактерий проводили на пятые сутки, актиномицетов и грибов – на 7–10-е сутки. Микроскопирование выполняли при увеличении ×1350. Проведен количественный учет колоний неспоровых и споро-

вых бактерий (в том числе актиномицетов), мицелиальных и дрожжевых грибов. Методом Грегерсена [Gregersen, 1978] устанавливали принадлежность бактериальных форм.

Проводили оценку массы хвои текущего года (далее однолетней) у двухлетних сеянцев во всех вариантах эксперимента. Отбирали хвою без видимых признаков поражения, при этом массу одной хвоинки рассчитывали в микрограммах как среднее значение из ста сухих хвоинок. Для оценки значимости влияния факторов “Инфицирование” и “Микокомпост” на массу хвои использовали факторный дисперсионный анализ ANOVA.

Все исследования выполнены в трехкратной повторности. Результаты исследования обрабатывались в программе Microsoft Excel 2007 и STATISTICA 5 (ANOVA (FactorialANOva, Quickspecsdialog)). Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение компонентного состава летучих соединений сеянцев сосны обыкновенной

Установлено, что на стадии прорастания аскоспоры происходит увеличение количества летучих компонентов, выделяемых пораженной хвоей, и уменьшение числа таковых, выделяемых корнями зараженных растений (рис. 1). При этом внесение микокомпоста

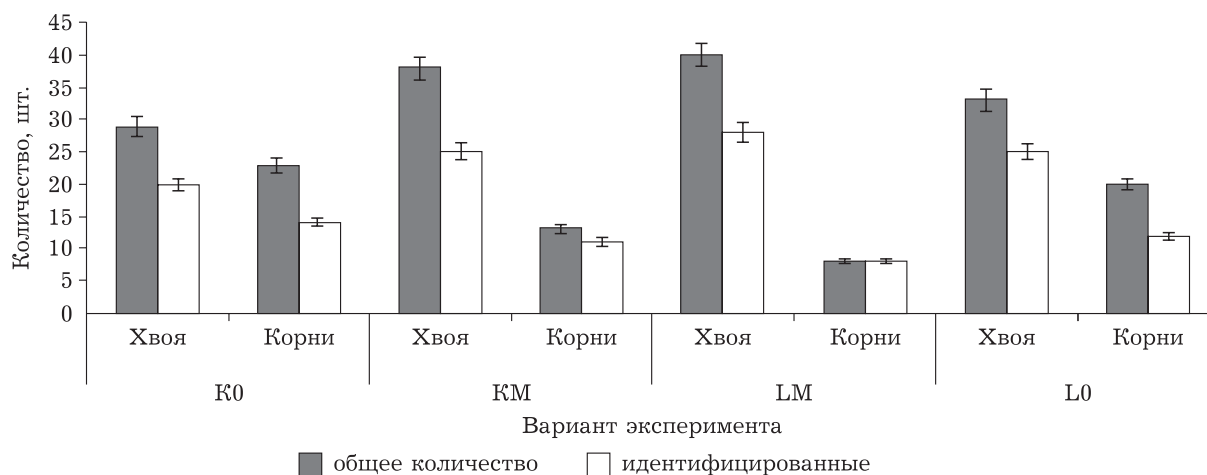


Рис. 1. Количество летучих соединений, выделяемых здоровыми сеянцами сосны обыкновенной и при поражении *Lophodermium seditiosum* на стадии прорастания аскоспоры (варианты эксперимента см. в табл. 1). Указаны средние значения и их ошибки

в почву способствует увеличению числа летучих веществ в образцах хвои и их уменьшению в пробах корней.

Анализ компонентного состава летучих соединений хвои семян сосны обыкновенной показал наличие терпенов и спиртов, также обнаружены эфир, кетон и полициклический ароматический углеводород (ПАУ). В образцах корней из перечисленных соединений выявлены только терпены и спирты (табл. 2, 3).

Отмечено, что в варианте без внесения микокомпоста содержание α -пинена в летучей фракции хвоинок с некротическими пятнами (L0) снижено на 24 % по сравнению со здоровыми. В опытных образцах доли некоторых терпенов увеличиваются, так, содержание 3-карена в образцах хвои (L0) превысило в 2,3 раза контрольное значение (K0) (см. табл. 2). Доля β -пинена во всех исследуемых частях семян также увеличивалась в опыт-

Т а б л и ц а 2

Доля летучих соединений, выделяемых хвоей здоровых семян сосны обыкновенной и при поражении *Lophodermium seditiosum* на стадии прорастания аскоспоры, %

Класс соединения	Название	Вариант эксперимента*			
		K0	KM	LM	L0
Монотерпены	Трициклен	0,00	0,16	0,00	0,00
	α -Пинен	59,95	29,05	40,15	45,03
	Камфен	1,18	0,93	0,63	0,87
	Сабинен	0,28	1,00	0,56	0,55
	β -Пинен	2,53	1,26	2,66	3,34
	β -Мирцен	0,80	1,26	0,78	0,67
	3-Карен	9,89	30,79	23,32	23,06
	Лимонен + β -фелландрен	1,66	1,23	1,22	1,40
	β -цис-Оцимен	0,84	0,28	0,00	0,00
	Терпинен	0,00	0,40	0,20	0,00
	Терпинолен	1,24	4,01	2,18	1,73
Всего		78,38	70,354	71,706	76,65
Сесквитерпены	Эликсен	0,45	1,09	1,19	0,71
	β -Элемен	0,62	1,79	1,81	1,35
	Кариофиллен	5,07	5,82	3,60	4,75
	α -Гумулен	0,60	0,83	0,48	0,58
	Гермакрен D	0,81	1,46	0,64	0,69
	γ -Элемен	0,65	1,61	1,81	1,05
	α -Муролен	0,00	0,22	0,25	0,00
	τ -Кадинен	0,00	0,38	0,70	0,19
	Δ -Кадинен	0,36	0,56	0,99	0,47
Всего		8,558	13,754	11,455	9,789
Спирты	α -3-Гексен-1-ол	2,77	2,08	1,31	0,41
	1-Гексанол	0,46	0,50	0,25	0,00
	Фенилэтиловый спирт	0,00	0,00	0,49	0,35
	<i>транс</i> -Пинокарвеол	0,00	0,00	0,56	0,88
	Терпинеол	0,00	0,23	0,31	0,24
	Гермакрен D-4-ол	2,27	7,56	8,35	5,89
	τ -Кадинол	0,42	0,50	0,83	0,45
	α -Кадинол	0,77	0,78	1,20	0,62
Всего		6,69	11,64	13,29	8,85
Эфир	Борнилацетат	0,95	1,10	0,88	1,39
ПАУ	Фенантрен	0,00	0,25	0,21	0,36
Кетон	Пинокарвон	0,00	0,00	0,13	0,28

* Вариант эксперимента см. в табл. 1.

Доля летучих соединений, выделяемых корнями здоровых сеянцев сосны обыкновенной и при поражении *Lophodermium seditiosum* на стадии прорастания аскоспоры, %

Класс соединения	Название	Вариант эксперимента*			
		K0	KM	LM	L0
Монотерпены	α -Пинен	56,26	50,49	59,70	58,00
	Камфен	0,35	0,35	0,00	0,59
	Сабинен	0,42	0,74	0,55	0,53
	β -Пинен	4,19	2,52	4,29	6,51
	β -Мирцен	0,70	0,82	0,74	0,65
	3-Карен	24,39	37,76	30,94	21,39
	o-Цимен	0,00	0,00	0,00	0,18
	Лимонен + β -фелландрен	1,35	1,03	1,30	1,46
	Терпинолен	1,08	1,75	1,92	1,52
	<i>Всего</i>	<i>88,73</i>	<i>95,46</i>	<i>99,43</i>	<i>90,84</i>
Дитерпены	Неоцебрен А	1,66	0,37	0,00	0,31
	Цембрен	1,83	1,32	0,00	1,27
	<i>Всего</i>	<i>3,48</i>	<i>1,68</i>	<i>0,00</i>	<i>1,58</i>
Сесквитерпены	Юнипен	1,01	1,09	0,57	0,82
Спирты	Борнеол	0,37	0,00	0,00	0,00
	Миртенол	0,47	0,00	0,00	0,00
	ψ ис-Миртанол	0,69	0,00	0,00	0,00
	<i>Всего</i>	<i>1,53</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>

*Вариант эксперимента см. в табл. 1

ных вариантах. Так, в варианте с внесением микокомпоста (LM) содержание данного терпена превысило контрольное (KM) в 1,7 (корни) и 2,1 (хвоя) раза. Также общее содержание спиртов в опытных образцах хвои (LM, L0) повышено по сравнению с контрольными вариантами (K0, KM).

Изучение фитонцидной активности хвои и корней сеянцев сосны обыкновенной

Установлено, что присутствие растительных тканей сеянцев сосны обыкновенной, как правило, оказывало сдерживающий эффект на рост тестовых изолятов, при этом в зависимости от варианта эксперимента наблюдали различные результаты. Например, наличие растительных тканей сеянцев без признаков повреждения, росших без добавления компоста, сдерживало рост тестового изолята *Trichotecium* sp. в первые и вторые сутки, в то

время как в других вариантах наблюдался выраженный фунгиостатический эффект на протяжении всего периода экспозиции (рис. 2).

Следует отметить, что внесение микокомпоста положительно сказалось на фитонцидной активности сеянцев, не подвергавшихся заражению (вариант KM). Корни сеянцев этого варианта в первые двое суток оказывали существенный фунгиостатический эффект по сравнению с вариантом K0 (табл. 4). При этом доля диаметра колоний *Bacillus* sp., росших в присутствии хвои сеянцев варианта KM, не превысила за четверо суток экспозиции 38 % от диаметра контрольных колоний.

Изучение численности микроорганизмов, ассоциированных с сеянцами сосны обыкновенной

Результаты микробиологических посевов показали, что максимальное значение суммарной (общей) численности микроорганиз-

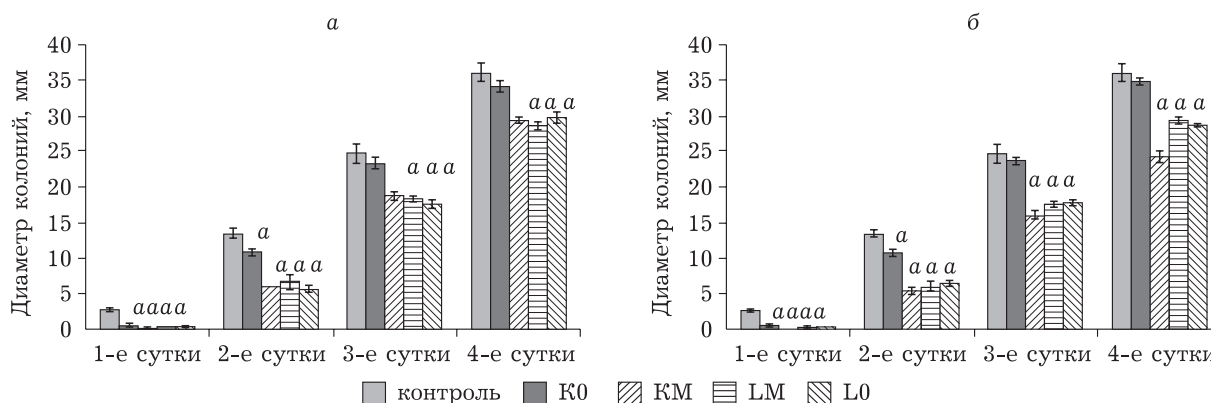


Рис. 2. Динамика роста диаметра колоний *Trichotecium* sp. в присутствии хвои (а) и корней (б) здоровых сеянцев сосны обыкновенной и при поражении их *Lophodermium seditiosum* (стадия прорастания аскоспоры): контроль – без присутствия растительного материала, K0 – L0 см. в табл. 1. Достоверные отличия от контрольных значений обозначены буквой а. Указаны средние значения и их ошибки

Т а б л и ц а 4

Доля (%) диаметра опытных колоний от диаметра контрольных колоний (мм)

Показатель	Вариант эксперимента*	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки
Хвоя (тестовый изолят <i>Bacillus</i> sp.)					
Диаметр, мм	Контроль	8,05 ± 0,30	25,33 ± 0,41	34,83 ± 0,54	46,00 ± 1,22
Доля, %	K0	42,86	44,74	50,77	48,19
	KM	13,25	23,03	32,87	37,32
	LM	47,62	35,53	54,55	57,07
	L0	37,27	49,47	63,64	64,13
Корни (тестовый изолят <i>Fusarium</i> sp.)					
Диаметр, мм	Контроль	3,50 ± 0,35	21,83 ± 0,20	36,17 ± 0,54	45,33 ± 0,41
Доля, %	K0	107,14	85,50	82,95	94,12
	KM	32,38	53,44	83,87	88,24
	LM	44,76	58,78	88,76	95,59
	L0	47,62	67,18	84,33	93,38

*Контроль – без присутствия растительного материала, K0 – L0 см. в табл. 1.

мов на поверхности хвои отмечено в контрольном варианте без внесения микокомпоста (K0) (рис. 3) и достигает 1,86 млн колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г. Внесение микокомпоста оказало сдерживающий эффект на развитие эпифитов как в контроле, так и при заражении факультативным сапротрофом (KM и LM). При этом наблюдаются различия в соотношениях групп микроорганизмов. Так, в контрольных вариантах доминируют неспоровые бактерии (80–97 %), в опытных –

дрожжевые формы грибов (88–90 %). Минорным компонентом являлись актиномицеты, доля которых от общей численности составила 0,26 % (KM) и 1,02 (L0).

Максимальное значение общей численности микроорганизмов на поверхности корней сеянцев сосны отмечено в контрольном варианте без внесения микокомпоста (K0) и достигало 58,41 млн КОЕ/г (рис. 4). Во всех случаях преобладали неспоровые бактерии, доля которых находилась в пределах 55,51–93,63 %. Числен-

ность споровых бактерий (без учета актиномицетов) относительно невелика и достигала 1,3 млн. КОЕ/г (K0). Последние выявлялись во всех образцах, кроме КМ, их численность колебалась от 1,08 до 9,26 млн КОЕ/г (см. рис. 4). Численность грибов ризопланы достигала 17,39 млн КОЕ/г (КМ), при этом дрожжевые формы были отмечены только в контролях, их доля составила 0,08 % (K0) и 0,14 % (КМ).

Изучение ризосферной почвы показало, что суммарная численность микроорганизмов достоверно ниже на опытных делянках и находится в пределах 24,52–24,98 млн КОЕ/г (L0 и LM соответственно) (рис. 5). В контрольных вариантах данный показатель составил 31,04 млн КОЕ/г (K0) и 38,25 млн КОЕ/г (КМ). Доминируют неспоровые бактерии, их доля находится в пределах 63,04–72,9 %. Содоминантами, кроме варианта КМ, являлись актиномицеты, доля которых достигала 26,56 % (L0).

Оценка массы хвои сеянцев сосны обыкновенной

Отмечено достоверное увеличение массы хвоинок у сеянцев, подвергнувшихся заражению, по сравнению с неинфицированными соснами. Внесение микокомпоста также вызвало увеличение данного показателя (рис. 6).

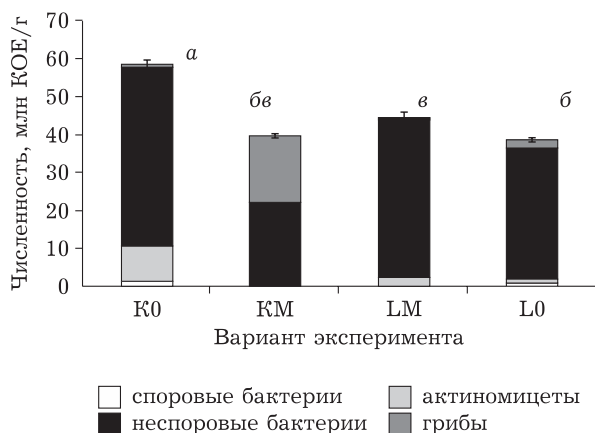


Рис. 4. Суммарная численность микроорганизмов ризопланы здоровых сеянцев сосны обыкновенной и при их заражении *Lophodermium seeditiosum* (стадия прорастания аскоспоры) (варианты эксперимента см. в табл. 1). Одинаковыми буквами а, б, в отмечены варианты опыта, достоверно не различающиеся между собой. Указаны средние значения и их ошибки

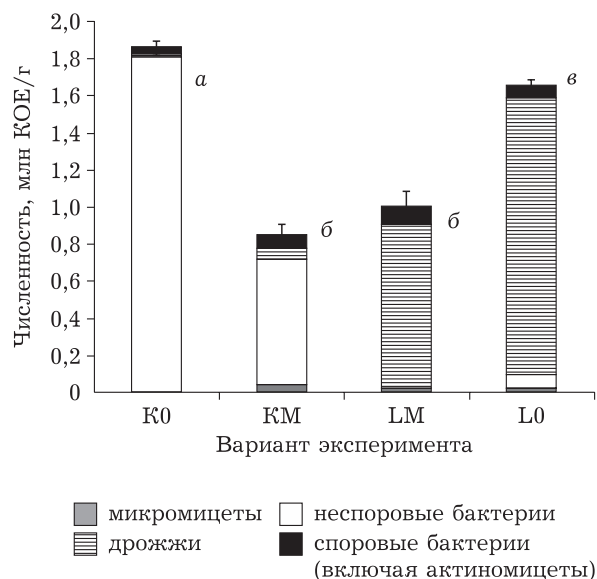


Рис. 3. Суммарная численность эпифитных микроорганизмов на поверхности хвои здоровых сеянцев сосны обыкновенной и при их заражении *Lophodermium seeditiosum* (стадия прорастания аскоспоры) (варианты эксперимента см. в табл. 1). Одинаковыми буквами а, б, в отмечены варианты опыта, достоверно не различающиеся между собой. Указаны средние значения и их ошибки

Факторный дисперсионный анализ ANOVA выявил существенное влияние двух факторов (“Инфицирование” и “Микокомпост”) и их совместного действия на массу хвои текущего

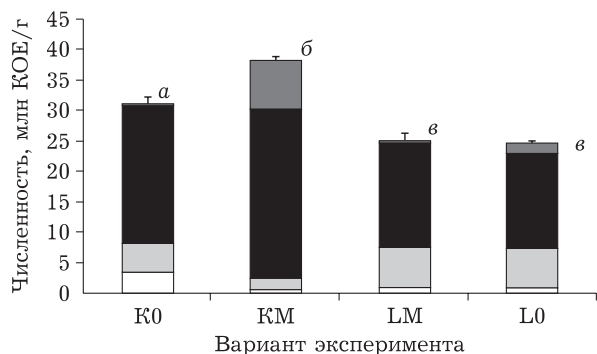


Рис. 5. Суммарная численность микроорганизмов ризосферы здоровых сеянцев сосны обыкновенной и при их заражении *Lophodermium seeditiosum* (стадия прорастания аскоспоры). Одинаковыми буквами а, б, в отмечены варианты опыта, достоверно не различающиеся между собой ($p = 0,05$ по t -критерию). Указаны средние значения и их ошибки

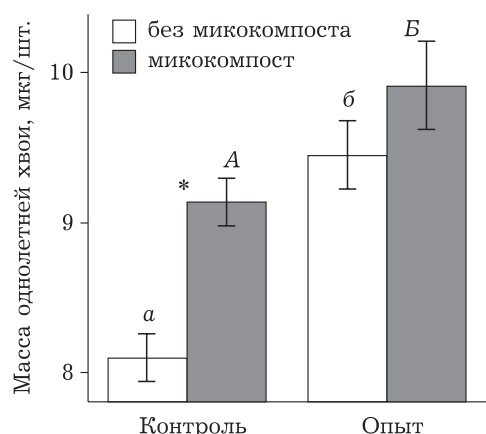


Рис. 6. Масса однолетней хвои у двухлетних сеянцев сосны обыкновенной на площадках без инфицирования и с искусственно инфицированным грибом *Lophodermium seditiosum* при двух вариантах обработки почвы (без внесения микокомпоста в почву (1) и его внесением (2)). Звездочкой отмечено достоверное различие между вариантами 1 и 2. Разными прописными буквами (а, б) обозначены средние значения, отличающиеся друг от друга в варианте 1, заглавными (А, Б) – в варианте 2. Указаны средние значения и их ошибки

года у двухлетних сеянцев сосны обыкновенной (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вторичные метаболиты растений, в том числе хвойных, являются важным показателем физиологического состояния организма [Mazid et al., 2011]. Увеличение их продукции и накопление происходит при столкновении

растения-хозяина с различными стрессами [Boncan et al., 2020]. Последнее мы наблюдали в экспериментальных вариантах, когда обнаружили повышение количества летучих соединений по сравнению с контролем. Одновременно на фоне этого увеличения происходит снижение содержания в пробе ряда веществ (см. табл. 2, 3). Жизнедеятельность паразита является причиной патологических изменений в тканях и живых клетках пораженного растения. Однако в одних случаях такие изменения – следствие прямого действия активного мицелия, а в других – главным образом ответная реакция организма-хозяина [Купревич, 1947]. В настоящее время сложно сказать, является ли уменьшение содержания ряда веществ попыткой растения ограничить патоген в питательных веществах или же мы наблюдаем подчинение/потребление ресурсов организма-хозяина “захватчиком”. В газовых пробах зараженной хвои наблюдалось как снижение доли 1-гексанола в 2 раза (LM), так и его отсутствие (L0) (см. табл. 2). Данный спирт принадлежит к комплексу феромонов тревоги насекомых [Телитченко, Остроумов, 1990] и выполняет защитную роль в жизни растений. Возникают следующие версии: растение “концентрируется” на борьбе с текущей угрозой, отключая синтез ненужных на данный момент соединений, и направляет все ресурсы на производство более актуальных веществ (β -пинена и др.). С другой стороны, уменьшение содержания 1-гексанола можно рассматривать как попытку патогена

Т а б л и ц а 5

Достоверность влияния различных факторов (инфицирование и микокомпост) и их совместного действия на среднюю массу* хвои текущего года у здоровых сеянцев сосны обыкновенной и при заражении *Lophodermium seditiosum* на стадии прорастания аскоспоры

Факторы и их сочетание	Факториальная сумма квадратов отклонений (SS)	Число степеней свободы (v)	Факториальная дисперсия (MS = SS/v)	F	p	Сила влияния фактора, % ((SS/ΣSS) × 100 %)
Инфицирование	11,5	1	11,5	25,86	0,000	29
Микокомпост	2,5	1	2,5	5,71	0,027	6
Инфицирование Микокомпост	17,0	1	17,0	38,29	0,000	43
Неучитываемые факторы (Error)	8,9	20	0,4			22
Сумма квадратов отклонений всех факторов (ΣSS)	39,9					100

* В пересчете на 1 шт.

привлечь дополнительный стрессовый фактор (насекомых), чтобы ослабить организм-хозяин.

Многие исследователи предлагают рассматривать вторичные метаболиты в качестве индикаторов состояния растения. Установлено, что при стрессе в тканях хвойных резко изменяется отношение α -пинена к β -пинену. В поврежденной хвое концентрация β -пинена может увеличиваться в 4 раза [Jüttner, 1988; Рощина, Рощина, 2012]. В текущем исследовании мы также наблюдали увеличение данного монотерпена в хвое и корнях зараженных сеянцев.

Моно- и сесквитерпенам часто приписывают роль аллелопатического фактора во взаимоотношениях растений. Этому есть экспериментальные доказательства: установлено, что монотерпены могут являться ингибиторами роста, в частности лимонен и терпинен [Фуксман, 2002; Рощина, Рощина, 2012].

Внесение микокомпоста также оказалось фактором, влияющим на компонентный состав летучих соединений: наблюдается либо изменение содержания ряда веществ по сравнению с вариантами без внесения дополнительного субстрата, либо наличие специфических соединений (терпинен, α -муrolен) (см. табл. 2, 3), что сказалось и на фитонцидной активности, и на численности эпифитных микроорганизмов (см. табл. 4, рис. 3, 4). Известно, что внесение субстратов на основе микокомпоста оказывает положительное действие на рост и развитие саженцев хвойных пород [Антонов и др., 2021].

Вторичные метаболиты, в том числе летучие соединения, обеспечивают и фитонцидную активность органов растения. Следует отметить, что разные виды растений обладают различной фитонцидной активностью, которая в свою очередь зависит от фенологической фазы растительного организма. Наименьший аллелопатический эффект в наших ранних исследованиях был отмечен в фазу расцветания листьев, когда растение готовится к покою [Сенашова, 2012; Сенашова и др., 2014]. В настоящей работе мы также наблюдаем относительно невысокую фитонцидную активность растительных тканей здоровых сеянцев, росших без внесения микокомпоста (K0), по сравнению с другими вариантами. По-видимому, увеличение содержания в пробе таких терпенов, как β -пинен, 3-ка-

рен, т-кадинен, и ряда спиртов обеспечивало фунгио- и бактериостатические эффекты. Например, фенилэтиловый спирт, обнаруженный только в опытных вариантах, обладает выраженными противогрибковыми свойствами [Лыков, 2019] и применяется в косметологии в качестве консерванта.

Наряду с гидротермическими условиями окружающей среды летучие соединения, выделяемые филлосферой/ризопланой, воздействуя на микроорганизмы, в значительной степени определяют структуру эпифитного и ризосферного комплексов растения. Ранее мы изучали состав микробных комплексов филлопланы основных хвойных пород Средней Сибири [Сенашова, 2012; Сенашова и др., 2012]. Показано, что здоровая филлосфера каждого изученного вида растений обладает специфическим эпифитным сообществом, обусловленным различием компонентного состава летучих соединений растений [Сенашова и др., 2014]. При отмирании хвои, вызванном факультативными сапротрофами (стадия формирования и созревания апотециев), различия нивелируются [Сенашова, 2012; Сенашова, Гродницкая, 2015]. Подобная закономерность прослеживалась и при изучении микробных комплексов хвои пихты сибирской (*A. sibirica*), пораженной ржавчинным раком (возбудитель *M. caryophyllacearum*). Летучие соединения, выделяемые здоровой хвоей, являются одним из факторов, лимитирующих развитие микроорганизмов, населяющих филлосферу растений [Бабьева, Чернов, 2004]. По мере отмирания хвои снижается ее фитонцидная активность, что приводит к возрастанию численности всех групп микроорганизмов. Наблюдаемое увеличение количества микробов происходит за счет как изначально населявших растение, так и сапротрофных форм, поступающих из окружающей среды с частицами пыли, каплями дождя и т. п. Таким образом, при протекании инфекционного процесса в эпифитных комплексах разных видов формируется близкий микробный состав, относительно однородный как качественно, так и количественно.

Исходя из вышеизложенного, мы считаем весьма интересным тот факт, что в текущем исследовании на стадии прорастания аскоспоры в вариантах с заражением (L0, LM) по сравнению с контрольными (K0, KM) отмечено

достоверное снижение численности эпифитных микроорганизмов (см. рис. 3–5). Подобное мы наблюдали при изучении эпифитных микроорганизмов филлосферы лиственницы сибирской, пораженной ржавчинным грибом *Melampsora larici-populina* Kleb., когда облигатный паразит оказывал стимулирующее действие на хозяина [Сенашова и др., 2012]. Учитывая, что стадия развития данного гриба на хвое лиственницы ограничена примерно 1,5 месяцами, при конкуренции за питательные вещества, которые при эпифитном способе существования весьма ограничены, тактика патогена, направленная на повышение фитонцидности, оправдана.

Таким образом, процессы, протекающие при взаимодействии патогена и растения-хозяина, могут различаться в зависимости от особенностей жизненного цикла фитопатогена (какую часть вегетационного периода он паразитирует на хозяине), но в любом случае наблюдаются патологические изменения в тканях атакуемого растения.

Все полученные результаты (компонентный состав летучих соединений, фитонцидная активность, численность микроорганизмов, данные о массе хвои) указывают на интенсификацию физиологических процессов сеянцев сосны на ранней стадии заражения *L. seditiosum* (этап прорастания аскоспоры), что повышает их защитные функции. Все перечисленное соответствует адаптационному синдрому Селье (активации физиологических процессов на раннем этапе неблагоприятного воздействия, сменяющейся истощением организма, если нагрузка продолжается) [Selye, 1980; Пахомова, 1995; Calabrese, 2014].

Любопытным фактом является то, что в возрасте пяти лет сеянцы сосны с контрольных делянок существенно пострадали от вертициллеза: растения в варианте К0 погибли полностью, в варианте КМ выжила одна треть от изначального количества (доля микромицетов рода *Verticillium* Nees., выделенных с корней, составила 47,67 %). Среди сеянцев опытных вариантов (L0, LM) не выявлено признаков сосудистого поражения, их корневая система была свободна от представителей *Verticillium* sp. По-видимому, сосны в вариантах с заражением имели ресурс, чтобы справиться с дополнительным фитопатогенным агентом, в то время как контрольные расте-

ния, не имея ранее опыта борьбы с грибной инфекцией, погибли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На начальной стадии инфекционного процесса, вызванного факультативным сапротрофом *L. seditiosum*, в газовой фракции хвои происходит увеличение количества компонентов летучих соединений за счет спиртов (фенилэтилового, *транс*-пинокарвеола) и кетона (пинокарвона). В газовой фракции корней, напротив, количество веществ снижается. Контрольные пробы хвои характеризуются повышенным содержанием ряда моно- и сесквитерпенов и некоторых спиртов, пробы корней – дитерпенов и спиртов.

Изменения компонентного состава летучих соединений привели к различиям фитонцидной активности изучаемых сеянцев. Сеянцы сосны, подвергшиеся заражению, обладают в целом более выраженными фитонцидными свойствами относительно контрольного варианта без внесения микокомпоста (К0).

Внесение микокомпоста также оказалось фактором, влияющим на микробный комплекс сосны и на компонентный состав летучих фракций хвои и корней, повышающим фитонцидные свойства и массу хвоинок у двухлетних растений сосны обыкновенной.

Таким образом, характер изменений в системе “растение-хозяин – патоген” определяется особенностями жизненного цикла патогена и стадией инфекционного процесса. Развитие патогенного организма влияет не только на изменение компонентного состава летучих соединений, выделяемых растением, но и на синтез ряда вторичных метаболитов в тканях растения-хозяина.

Изменения, наблюдающиеся у растения-хозяина на ранней стадии развития факультативного сапротрофа *L. seditiosum*, соответствуют адаптационному синдрому Селье – активации физиологических процессов на раннем этапе неблагоприятного воздействия, сменяющейся истощением организма, если нагрузка продолжается.

Работа выполнена в рамках проекта FWES-2021-0011 государственного задания.

ЛИТЕРАТУРА

Антонов Г. И., Барченков А. П., Пашенова Н. В., Кондакова О. Э., Гродницкая И. Д. Влияние опилочно-почвен-

- ных субстратов на рост саженцев сосны и ели в лесопитомнике экспериментального хозяйства "Погорельский бор" // Лесоведение. 2021. № 3. С. 303–317.
- Бабьева И. П., Чернов И. Ю. Биология дрожжей. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 221 с.
- Ерина Н. В., Коптева Т. С. Микробные сообщества филлосферы некоторых растений семейства Grossulariaceae // Науч. журн. КубГАУ. 2015. № 110. С. 660–671.
- Купревич В. Ф. Физиология больного растения в связи с общими вопросами паразитизма. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1947. 300 с.
- Лыков И. Н. Исследование противогрибковой активности действия эфирных масел // Тенденции развития науки и образования. 2019. № 51. С. 17–20.
- Муравьев И. А., Маняк В. А. К изучению процесса рематерации солодкового корня, заготовленного от солодки уральской // Лекарственные и сырьевые ресурсы Иркутской области. Иркутск, 1968. Вып. 5. С. 130–134.
- Муравьев И. А., Маняк В. А. Зависимость условий рематерации солодкового корня от способа его измельчения // Актуальные вопросы фармации. Ставрополь, 1974. Вып. 2. С. 235–240.
- Пахомова В. М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. 1995. Т. 37, № 1/2. С. 66–91.
- Пашенова Н. В., Лоскутов С. Р., Пермякова Г. В., Анискина А. А. Влияние отвара чистотела на биоконверсию сосновых опилок культурами базидиальных грибов-ксилотрофов / Матер. IV Всерос. конф. "Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья". Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2009. Кн. 2. С. 39–41.
- Полякова Г. Г. Физиологические механизмы противомикробной защиты пихты // Лесоведение. 2002. № 4. С. 25–30.
- Полякова Г. Г., Сенашова В. А. Влияние гриба *Melampsorella caryophyllacearum* на динамику углеводов и вторичных соединений пихты сибирской // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51, вып. 3. С. 168–177.
- Рощина В. В., Рощина В. Д. Выделительная функция высших растений. LAP Lambert Academic Publishing, 2012. 476 с.
- Сенашова В. А. Фитопатогенные микромицеты филлосферы хвойных насаждений Средней Сибири. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 104 с.
- Сенашова В. А. Влияние биотических факторов на формирование эпифитного сообщества пихты сибирской // Изв. Санкт-Петербург. лесотехн. академии. 2014. Вып. 207. С. 171–179.
- Сенашова В. А., Анискина А. А. Влияние ржавчинного гриба *Melampsorella caryophyllacearum* на компонентный состав летучих соединений, выделяемых хвоей пихты сибирской // Изв. Санкт-Петербург. лесотехн. академии. 2017. Вып. 220. С. 97–109.
- Сенашова В. А., Анискина А. А., Пляшечник М. А., Костякова Т. В. Компонентный состав летучих соединений хвойных в условиях Средней Сибири // Хим. раст. сырья. 2014. № 1. С. 77–85.
- Сенашова В. А., Гродницкая И. Д. Индикационные свойства микроорганизмов при мониторинге состояния хвойных // Изв. Санкт-Петербург. лесотехнической академии. 2015. Вып. 211. С. 230–242.
- Сенашова В. А., Громовых Т. И., Сорокин Н. Д. Эпифитная микрофлора здоровой и пораженной хвои древесных пород Средней Сибири // Лесоведение. 2012. № 4. С. 24–30.
- Сенашова В. А., Шилкина Е. А., Сафронова И. Е. Фитопатогенные микромицеты, ассоциированные с хвойными растениями на территории Средней Сибири // Изв. Санкт-Петербург. лесотехн. академии. 2021. Вып. 236. С. 129–151.
- Телитченко М. М., Остроумов С. А. Введение в проблемы биохимической экологии: биотехнология, сельское хозяйство, охрана среды. М.: Наука, 1990. 288 с.
- Токин Б. П. Фитонциды. 2-е изд. М.: Изд-во АМН СССР, 1951. 235 с.
- Фуксман И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на метаболизм веществ вторичного происхождения у древесных растений. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2002. 164 с.
- Boncan D. A. T., Tsang S. S. K., Li C., Lee I. H. T., Lam H. M., Chan T. F. et al. Terpenes and terpenoids in plants: interactions with environment and insects // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. P. 73–82.
- Calabrese E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology // Microb. Cell. 2014. Vol. 1, N 5. P. 145–149.
- Gregersen T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1978. Vol. 5, N 2. P. 127–132.
- Jüttner F. Changes of monoterpene concentration in needles of pollution injured *Picea abies* exhibiting montane yellowing // Physiol. Plant. 1988. Vol. 72. P. 48–56.
- Mazid M., Khan T. A., Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants // Biol. Med. 2011. Vol. 3. P. 232–249.
- Schulz O. E. Versuche zur Verbrennung von Extraktionsausbeuten // Grundlagen der galenische Pharmazie. Arzneimittel-Forsch. 1954. S. 325–327.
- Schulz O. E., Klotz J. Gesetzmässigkeit der Mazeration und Percolation 1 // Grundlagen der galenische Pharmazie. Arzneimittel-Forsch. 1953. S. 471–478.
- Schulz O. E., Klotz J. Gesetzmässigkeit der Mazeration und Percolation 1 // Grundlagen der galenische Pharmazie. Arzneimittel-Forsch. 1953. S. 529–530.
- Schulz O. E., Klotz J. Gesetzmässigkeit der Mazeration und Percolation 2 // Grundlagen der galenische Pharmazie. Arzneimittel-Forsch. 1953. S. 529–530.
- Selye H. Changing distress into eustress – Selye, hans voices theories on stress // Tex. Med. 1980. Vol. 76. P. 78–80.

The study of relationships in the “plant-host-pathogen” system on the example of scotch pine and facultative saprotroph *Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar.

V. A. SENASHOVA, A. A. ANISKINA, G. G. POLYAKOVA

V. N. Sukachev Institute of Forest SB RAS
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28
E-mail: vera0612@mail.ru

The interaction in the system “epiphytic microorganisms – host plant-pathogen” was considered on the example of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings which artificially infected with the facultative saprotroph *Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar. At the same time, the change of quantity of the epiphytic microorganisms, the composition and concentration of volatile compounds and the morphological parameters of pine in different variants of the experiment were studied. The influence of two factors on the studied characteristics was considered: *L. seditiosum* infection and the introduction of mycocompost into the soil. Classical phytopathological and microbiological methods were used. Volatile compounds were studied using chromat-mass spectrometry, phytoncide activity was studied using the Tokin method adapted to our conditions. At the stage of ascospore germination, an increase in the amount of volatile components released by the affected needles and a decrease in the number of those released by the roots of infected plants were noted. Against the background of changes in the composition of volatile compounds, an increase in the phytoncide activity of the leaf and root systems of plants with signs of the disease was found compared to specimens without signs of damage. This is also evidenced by the results of microbiological cultures: in the variants with infection, compared with the control, a significant decrease in the number of epiphytic microorganisms was noted. A significant increase in the mass of needles was noted in the variants with infection and with the adding of mycocompost, confirmed by ANOVA analysis. Registered correspond to Selye's adaptive syndrome (activation of physiological processes at an early stage of adverse effects, followed by exhaustion of the body if the load continues).

Key words: Lophodermium needle cast, Scotch pine, volatile compounds, terpenes, epiphytic microorganisms, phytoncide activity.