

На правах рукописи

Полякова

ПОЛЯКОВА Галина Геннадьевна

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНИТЕТА
ХВОЙНЫХ НА ПРИМЕРЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛОЭМЫ СТВОЛА И
ОФИОСТОМОВЫХ ГРИБОВ**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Красноярск – 2012

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте леса
им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН

**Официальные
оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор
Бабенко Андрей Сергеевич

доктор биологических наук, профессор
Мухин Виктор Андреевич

доктор биологических наук, профессор
Полонский Вадим Игоревич

**Ведущая
организация:**

Учреждение Российской академии наук
Институт проблем экологии и эволюции им.
А.Н. Северцова РАН

Защита состоится «30» марта 2012 г. в 10 часов на заседании диссертационного
совета ДМ 212.099.15 при Сибирском федеральном университете по адресу:
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. Р08-06
e-mail: nikgn5@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского федерального
университета

Автореферат разослан «27» февраля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н., доцент



Н.А. Гаевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Актуальность исследования иммунитета хвойных в отношении офиостомовых грибов связана с вспышками массового размножения стволовых вредителей – насекомых-ксилофагов, переносящих эти грибы. Способность агрессивных видов насекомых-переносчиков повреждать кроны здоровых деревьев при дополнительном питании создает угрозу метастабильного состояния очагов массового размножения (Исаев, Гирс, 1975). В последние десятилетия возникла угроза распространения сосудистых заболеваний хвойных, вызываемых патогенным комплексом офиостомовые грибы – нематоды, переносимым насекомыми-ксилофагами (Кулинич, 1993, Mireku, Simpson. 2002, Cardoza et al., 2008). Распространению патогенов способствует экспорт леса. Сосудистые микозы, вызываемые офиостомовыми грибами, известные на лиственных породах как голландская болезнь ильмовых и трахеомикозы дуба, вызвали гибель лиственных насаждений в середине прошлого века на обширных территориях (Лесная энциклопедия, 1985, *Ceratocystis and Ophiostoma*, 1999).

Опасность возникновения очагов массового размножения насекомых-вредителей и грибных эпифитотий связана с воздействием экологических повреждающих факторов на лесные массивы (Рахов, 1965, Яновский, 1991). В норме древесные растения устойчивы к офиостомовым грибам и отвечают на их инокуляцию сверхчувствительной некротической реакцией инфицированных клеток флоэмы, что является ярким примером иммунного ответа растительной ткани на действие патогена (Lieutier, Berryman, 1988, Paine et al., 1997, Yamaoka et al., 2004).

Понимание механизмов снижения иммунитета хвойных к патогенам в природных условиях необходимо для прогноза повреждения насаждений и разработки мер защиты. Несмотря на длительный период изучения, физиологические механизмы устойчивости хвойных к насекомым-переносчикам и офиостомовым грибам, причины возникновения этих ассоциаций, а также роль грибов в преодолении порога устойчивости деревьев при повреждении их насекомыми остаются неясными (Lorigo, 1988, Lieutier, 1999, Six, Wingfield, 2011).

На хвойных офиостомовые больше известны как грибы синевы древесины (Wong, Berryman, 1977, Seifert, 1999). Опыты с инокуляцией ствола хвойных живым мицелием показали накопление в зоне защитного ответа флоэмы терпеноидных соединений и снижение содержания углеводов (Wright et al., 1979, Solheim, 1999). Установлено, что содержание смолы в зоне некроза флоэмы, вызванного действием гриба, выше у деревьев, характеризующихся большей устойчивостью к насекомым-переносчикам (Wright et al., 1979, Cook, Hain, 1987). Роль фенольных соединений в устойчивости хвойных к действию патогенных организмов не ясна, поскольку отмечено как накопление (Witzell, Martin, 2008), так и снижение содержания этих соединений в зоне некроза (Brignolas et al., 1995).

Сезонная изменчивость характеристик иммунной реакции луба на инокуляцию ствола офиостомовыми грибами, продемонстрированная на деревьях хвойных (Reid et al., 1967, Paine et al., 1997), свидетельствует о зависимости этого ответа как от физиологического состояния дерева, так и экологических факторов. Для проверки такой связи сравнивали размер некроза и другие характеристики реакции луба на действие офиостомовых грибов у деревьев, находящихся в нормальных условиях и стрессированных экологическими факторами. Предполагалось, что влияние факторов среды на состояние дерева изменит характеристики этого ответа, что поможет понять физиологические механизмы устойчивости хвойных к патогенным организмам.

Изучение механизмов иммунитета лесобразующих видов в опытах с использованием паразитических грибов осложнено риском возникновения грибных

эпифитотий при экспериментальном инфицировании деревьев. Замена живого мицелия веществом с аналогичными свойствами позволила бы решить эту проблему. Однако возможность использования в качестве такого вещества грибных препаратов в экспериментах с хвойными деревьями до настоящего времени не проверяли, что сдерживает исследование иммунитета растений к патогенам.

Цель исследования

Определить физиологические механизмы защитной реакции флоэмы ствола, индуцируемой офиостомовыми грибами, и снижения устойчивости хвойных деревьев к этим патогенам при действии экологических факторов.

Задачи исследования

1. Провести сравнительное исследование защитной реакции разных видов хвойных на грибную инфекцию в норме и при стрессе (промышленном загрязнении, нарушении водного режима почвы, повреждении крон насекомыми-филлофагами).
2. Оценить защитную функцию фенольных соединений по результатам анализа анатомических, гистохимических и биохимических характеристик флоэмы ствола в зоне проявления иммунной реакции.
3. Исследовать роль высокомолекулярных экстрактивных веществ из мицелия патогенных грибов в индукции защитной реакции тканей хвойных с помощью измерения содержания фенольных соединений в модельных экспериментах на каллусах и проростках хвойных, а также на растущих деревьях.
4. Разработать метод ранней иммунодиагностики состояния деревьев и древостоев с применением мицелиальных экстрактов и провести его испытание на постоянных пробных площадях в фоновых и подверженных промышленному загрязнению древостоях сосны.
5. Оценить связь устойчивости деревьев к офиостомовым грибам и насекомым-переносчикам по параметрам ответа флоэмы ствола на действие грибного индуктора.

Термины «конденсированные дубильные вещества» и «проантоцианидины» (ПА), а также «луб», «живая кора» и «флоэма» использованы, как синонимы.

Защищаемые положения

1. Офиостомовые грибы, заносимые в проводящие ткани ствола хвойных насекомыми-ксилофагами, вызывают в зоне формирующегося некроза флоэмы защитную трансформацию клеточных стенок флоэмы и накопление в ней веществ, замедляющих рост грибов, что препятствует распространению мицелия в растительной ткани и увеличению некроза.
2. Ингибирование супрессорами офиостомового гриба раневой репарации флоэмы, поврежденной насекомыми-переносчиками, является одним из механизмов адаптации агрессивных видов офиостомовых грибов к растению-хозяину и возникновения ассоциации этих патогенов с насекомыми-ксилофагами.
3. Стрессовое воздействие экологического фактора, снижающее устойчивость хвойных деревьев к офиостомовым грибам и переносящим их насекомым, диагностируется по нарушению защитной реакции флоэмы на инокуляцию ствола мицелиальным экстрактом.

Научная новизна работы

На примере взаимодействия флоэмы ствола хвойных и офиостомовых грибов определены физиологические механизмы индуцированной защиты, адаптации паразита к растению-хозяину и снижения устойчивости деревьев к патогенам. Оригинальность методики заключается в использовании грибного препарата вместо живого мицелия и измерении биохимических параметров защитного ответа при изменении экологической ситуации в насаждении. Выбраны стандартные условия инокулирования ствола грибным

индуктором: доза мицелиального экстракта, высота расположения раневого отверстия на стволе, даты воздействия и регистрации параметров некротического ответа флоэмы ствола.

Впервые показано, что накопление лигнина и связанной формы конденсированных дубильных веществ, происходящее в результате их индуцированного синтеза при контакте клеток флоэмы с элиситорами гриба, препятствует распространению инфекции и увеличению сверхчувствительного некроза флоэмы. Установлено, что снижение иммунитета хвойных при экологических стрессах обусловлено нарушением защитной трансформации клеточных стенок. Зарегистрирован эффект ингибирования метаболитами офиостомового гриба ранней стадии лигнификации стенок ситовидных клеток во время раневой реакции флоэмы. Это позволило предложить гипотезу о причине возникновения ассоциации "насекомые-ксилофаги – офиостомовые грибы": подавление фитоиммунитета грибными супрессорами является выгодным для обоих партнеров короедно-грибного комплекса и содействует их поселению в тканях хвойных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан метод индуцирования иммунного ответа флоэмы ствола хвойных экстрактивными высокомолекулярными веществами, выделенными из мицелия офиостомовых грибов. Метод позволяет выяснять физиологические механизмы паразитизма, обуславливающие существование сообществ, образуемых разными видами хвойных и офиостомовых грибов. При этом исключаются артефакты (разрушение клеточных структур гифами, выделение грибом продуктов метаболизма, поглощение им веществ растения-хозяина), а также риск инфицирования насаждений.

Испытания, проведенные в сосняках, доказали возможность стволовой иммунной диагностики состояния насаждений на ранней стадии ослабления промзагрязнением и пирогенным повреждением. Показана принципиальная возможность иммунодиагностики хвойных насаждений для оценки риска вспышек массового размножения насекомых-ксилофагов.

Эксперименты показали возможность развития экологической дендроиммунологии, основанной на регистрации параметров иммунного ответа флоэмы ствола в изменяющейся экологической ситуации. Предложена гипотеза, согласно которой свободные ПА выполняют резервную функцию и расходуются во время синтеза лигнина и смолистых веществ в зоне защитной реакции флоэмы на действие грибных метаболитов в условиях пониженного содержания низкомолекулярных сахаров. Получено подтверждение концепции о снижении иммунитета растений в период активного роста.

Данные позволяют предполагать участие ПА и *n*-оксибензойной кислоты, подобно лигнину, в защитной трансформации клеточных стенок. В этом случае накопление *n*-оксибензойной кислоты на ранней стадии иммунного ответа, вероятно, обеспечивается резервными фондами хинной и шикимовой кислоты, характерными для хвойных.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на международных конференциях: «Blue-stain Fungi, and Conifer Defence Systems» (Ос, Норвегия, 1995), "Эколого-физиологические аспекты ксилотрофии хвойных" (Красноярск, Россия, 1996), "Physiology and genetics of tree-phytophage interactions" (Аркашон, Франция, 1997), конференция по анатомии и морфологии растений (С-Петербург, Россия, 1997), "Лиственница-98" (Красноярск, Россия, 1998), "Методы исследования состояния и устойчивости лесной экосистемы" (Красноярск, Россия, 1999), "Лес и общество: роль науки" (Куала-Лумпур, Малайзия, 2000), "Проблемы лесной фитопатологии и микологии" (Москва, Россия, 2002), "Строение, свойство и качество древесины" (С-Петербург, Россия, 2004), "Проблемы физиологии растений Севера" (Петрозаводск, Россия, 2004), "New Horizon of Bioscience in Forest Products Field" (Чунгбук, Южная Корея, 2004), "Грибы в природных и

антропогенных экосистемах" (С-Петербург, Россия, 2005), "Лес как возобновляемый источник жизненных ценностей" (Москва, Россия, 2009), Междисциплинарный микологический форум "ММФ'2009" (Москва, Россия, 2009), «Проблемы экологии» (Иркутск, Россия, 2010), "ММФ-2010" (Москва, Россия, 2010), "Химия и полная переработка биомассы леса" (С-Петербург, Россия, 2010).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 43 печатных работы.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, изложенных на 244 страницах и списка литературы (128 отечественных и 112 иностранных авторов), включает 39 таблиц и 41 рисунок.

Благодарности

Работа проводилась в комплексе с сотрудниками Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН: В.П. Ветровой (фитопатологические исследования), Н.В. Пашеновой (микробиологический материал), В.И. Поляковым (таксационные исследования), В.В. Стасовой (анатомический анализ), Г.К. Зражевой (калусы хвойных), И.В. Шеиним (анализ ВЭЖХ), О.Н. Зубаревой, Л.Н. Скрипальщиковой (данные по загрязнению). Автор благодарит сотрудников Института за предоставленный материал и участие в комплексных экспериментах, изложенных в совместных публикациях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Оценка состояния деревьев и древостоев при действии экологических факторов, пассивный и активный иммунитет растений

Различают два вида фитоиммунитета : пассивный и активный иммунитет, что соответствует понятиям конститутивная (первичная) и индуцированная устойчивость (Исаев, Гирс, 1975, Lieutier, 1999). Первичная устойчивость – комплекс свойств, присущих растению вне зависимости от контакта с патогенами (фитонциды, кутикула и другие признаки). Индуцированная устойчивость проявляется как ответ растения на действие патогенных организмов (вирусов, бактерий, грибов, нематод, насекомых).

Представляемая работа была направлена на изучение механизмов активного иммунитета хвойных. При этом использовалась стандартная методика инокуляции ствола хвойных офиостомовыми грибами (Reid et al., 1967, Solheim, 1999).

Поиск индикаторов ослабления древесных растений экологическими факторами базируется в основном на исследовании первичной устойчивости (Гирс, 1982, Судачкова и др., 1997). Однако, попытки объяснить устойчивость хвойных к насекомым-ксилофагам с позиций конститутивного метаболизма оказались неудачными из-за отсутствия связи между свойствами, присущими растению вне зависимости от контакта с патогеном, и выживаемостью деревьев после нападения насекомых, переносящих патогены (Vakke, 1983). Использование характеристик индуцированного ответа для оценки угрозы повреждения хвойных короедно-грибными комплексами оказались более удачными, хотя научные основы этого подхода слабо разработаны, а результаты иногда противоречивы. Весьма эффективной оказалась оценка риска повреждения хвойных насекомыми по активности вторичного смолообразования, вызванного инокуляцией ствола офиостомовыми грибами, (Wright et al., 1979, Cook, Hain, 1987).

Механизм участия терпенов в защитной реакции хвойных к насекомым-переносчикам и офиостомовым грибам остается неясным. Так, смоляные кислоты флэомы не влияли на выживаемость личинок насекомого, но ингибировали прорастание спор офиостомового гриба. (Kopper et al., 2005). Вместе с тем, недавние генетические исследования показали, что офиостомовые грибы в ответ на обработку их терпенами

растения после периода адаптации и перестройки генома способны использовать терпены в качестве единственного источника углерода (DiGustini et al., 2010). При этом в геноме гриба не были обнаружены гены, кодирующие ферменты, разрушающие растительные фенольные соединения.

Согласно унифицированной модели взаимодействие хвойных растений, вредителей и фитопатогенных грибов, переносимых насекомыми, включающее защитную реакцию растения, осуществляется с помощью экзогенных и эндогенных элиситоров (Berryman, 1988). Термин "элиситор" происходит от английского слова to elicit, что означает провоцировать. Экзоэлиситоры – это фрагменты покровных тканей вредителей, либо вещества фитопатогенных грибов, образующиеся при ферментативном действии на них растений. Эндоэлиситоры – фрагменты клеточных стенок растений, образующихся при их механическом повреждении, либо ферментативном расщеплении.

При разработке научных основ индуцированной устойчивости растений первоочередной задачей является изучение механизмов устойчивости и восприимчивости растений к патогенам, исследование природы грибных элиситоров. Выбор оптимального индуктора защитной реакции у хвойных предполагает необходимость выявления таких процессов в растительной ткани, которые обуславливают противомикробную защиту. Перспективным представляется исследование фенольных соединений у хвойных в качестве индикаторов фитозащиты, поскольку протекторная роль этих веществ доказана в опытах на травянистых растениях (Vidhyasekaran, 2008).

В работе основное внимание было направлено на изучение участия фенольных соединений в иммунитете хвойных к патогенам и изменчивости характеристик индуцированной устойчивости в природных условиях. В качестве индукторов защиты хвойных проверяли экстрактивные высокомолекулярные вещества, выделенные из мицелия офиостомовых грибов, В некоторых модельных экспериментах также оценивали элиситорную активность экстрактов из грибов других систематических групп.

Глава 2. Объекты и методы исследований

Исследование взаимодействия хвойных с офиостомовыми грибами проводили на основных лесообразующих породах Сибири: пихте сибирской, сосне обыкновенной, лиственнице сибирской, ели сибирской и кедре сибирском (табл. 1). В экспериментах использовали культуры грибов, выделенных из ходов опасных стволовых вредителей: черного пихтового усача, большого лиственничного короеда, короеда-типографа (табл. 1). Оценивали реакцию тканей флоэмы ствола на инокуляцию живого мицелия офиостомовых грибов разных видов или экстрактивных высокомолекулярных веществ, выделенных из мицелия, и на механическое поранение ствола (контроль).

Сравнивали защитный ответ флоэмы ствола на действие грибного индуктора у контрольных деревьев в нормальных условиях и деревьев, стрессированных каким-либо экологическим фактором – техногенное загрязнение, низовой пожар, подтопление, хроническая частичная дефолиация насекомым-филофагом. В очаге черного пихтового усача (*Monochamus urusovi* Fisch.) оценили связь устойчивости пихты сибирской к офиостомовым грибам и устойчивость деревьев к насекомому-переносчику. Сравниваемые древостои не различались по лесорастительным условиям и возрасту. На пихте и сосне также оценили изменчивость защитной реакции флоэмы в разные месяцы летнего периода. Для проведения опытов использовали разные сочетания: виды хвойных растений, виды грибов (или экстрактивных веществ из мицелия), различающиеся по специализации к хвойному растению и насекомому-переносчику (табл. 1).

Таблица 1. Схема постановки природных экспериментов

Насекомое-ксилофаг, повреждающее хвойное растение и переносящее гриб	Дерево-хозяин, из которого изолировали гриб	Вид офиостомового гриба	Виды хвойных, на которых проводили инокуляцию ствола мицелием или грибным экстрактом
Большой лиственничный короед <i>Ips cembrae</i> Heer.	Лиственница сибирская <i>Larix sibirica</i> Ledeb.	<i>Ceratocystis laricicola</i> Redfern & Minter	<i>Larix sibirica</i> <i>Pinus sylvestris</i> <i>Picea obovata</i> <i>Abies sibirica</i> <i>Pinus sibirica</i>
Большой лиственничный короед <i>Ips cembrae</i> Heer.	Сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> L.	<i>Ophiostoma minus</i> (Hedgc.)H. & P. Syd.	«
Короед-типограф <i>I. typographus</i> L.	Ель сибирская <i>Picea obovata</i> Ledeb.	<i>C. polonica</i> (Siem.)C. Moreau	«
Черный пихтовый усач <i>Monochamus urussovi</i> Fisch.	Пихта сибирская <i>Abies sibirica</i> Ledeb	<i>Leptographium sibirica</i> Jacobs & Wingfield	«
«	«	<i>Ophiostoma</i> sp.	«

Природные объекты для исследования иммунитета хвойных приведены ниже.

1. Пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb) (возраст 120-140 лет, средний диаметр 24 см) в пихтарнике разнотравном (Южно-Енисейский округ подтаежных сосновых и горно-таежных пихтовых лесов Алтае-Саянской горной лесорастительной области (Чередникова и др., 1999)), 56°05'25"с.ш., 92°26'13"в.д., 385 м н.у.м., а также пихта в пихтарнике разнотравно-хвощевом в очаге черного пихтового усача на правом берегу Енисейского района Красноярского края (Бахтинский округ среднетаежных темнохвойных и березовых лесов (Леса СССР, 1969), Приенисейская провинция темнохвойных и лиственничных лесов Средне-Сибирской плоскогорной лесорастительной области (Коротков, 1994)), 60°15'45"с.ш., 90°15'24"в.д., 63 м н.у.м. Характерной особенностью древостоя в очаге являлось избыточное увлажнение почвы при застое дождевой влаги на ее поверхности.

2. Ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.) 100-120 лет, диаметр 24 см, в ельнике приручьевом разнотравном (Южно-Енисейский округ подтаежных сосновых и горно-таежных пихтовых лесов Алтае-Саянской горной лесорастительной области (Чередникова и др., 1999)), 56°08'18"с.ш., 92°32'04"в.д., 260 м н.у.м. После сооружения плотины в 1950-х годах прибрежная часть древостоя около искусственного водохранилища подвергается сезонному подтоплению. В связи с подъемом уровня воды в водоеме освобождение подтопленного участка леса от поверхностных вод происходило в конце июня, а не в конце мая, как это наблюдалось в норме. В результате изменения водного режима в коренном типе леса – ельнике приручьевом – началась деградация мезофитного разнотравья, приведшая к появлению синузий осоки, растений-индикаторов избыточного увлажнения, например, калужницы болотной (*Caltha palustris* L.). Отмечено снижение бонитета, годичного прироста, на опушке началось усыхание отдельных деревьев. Часть древостоя с нормальным водным режимом почвы служила контролем.

3. Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.) в средневозрастном сосняке разнотравном (Красноярско-Канский лесорастительный округ подтаежно-лесостепных сосновых и березовых лесов Средне-Сибирской плоскогорной лесорастительной области (Чередникова и др., 1999)), 56°01'39"с.ш., 92°40'23"в.д., 317 м н.у.м., а также лиственница в

лиственничнике разнотравном 100-120 лет, диаметром 24 см, в спелом среднеполнотном насаждении состава 10Л (Южно-Хакасский округ подтаежных сосново-лиственничных и горно-таежных лиственнично-темнохвойных лесов Алтае-Саянской горной лесорастительной области (Смагин и др., 1980)), 54°41'11"с.ш., 89°25'37"в.д., 523 м н.у.м. Древостой расположен в хроническом очаге лиственничной чехликовой моли (чехлоноски) *Coleophora sibiricella* Falk. (Lepidoptera; Coleophoridae). Контролем служили деревья в очаге без визуальных признаков повреждения хвои.

4. Кедр сибирский (*Pinus sibirica* (Rupr.) Mayr.) (возраст 80-90 лет, средний диаметр 20 см) в пихтарнике разнотравном состава 5ПЗЕ2К (Южно-Енисейский округ подтаежных сосновых и горно-таежных пихтовых лесов Алтае-Саянской горной лесорастительной области (Чередникова и др., 1999)), 56°05'25"с.ш., 92°26'13"в.д., 385 м н.у.м.

5. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) в пригородных сосняках Красноярска, различающихся по степени промышленного загрязнения и повреждения низовым пожаром. Средневозрастные сосняки представлены постоянными пробными площадями (ПП) №1-4, 7 (табл. 2), приспевающие сосняки – ПП 5, 6. ПП заложены в соответствии с Инструкцией по проведению лесоустройства в лесном фонде России (1995). Деревьям на ПП присвоены индивидуальные номера.

Сосновые древостои не различаются по лесорастительным условиям (Красноярско-Канский лесорастительный округ подтаежно-лесостепных сосновых и березовых лесов Средне-Сибирской плоскогорной лесорастительной области (Чередникова и др., 1999)), типу леса, но испытывают разную степень техногенного загрязнения, о чем свидетельствуют данные наземного и космического зондирования снежного покрова. Загрязненные ПП 1, 2, 7 расположены по розе ветров от города (56°02'25"с.ш., 93°08'54"в.д., 160 м н.у.м.), фоновые (ПП 3-6) – с противоположной стороны (около 7 км от черты города) (56°01'55"с.ш., 92°40'52"в.д., 270 м н.у.м.).

Таксационные характеристики фоновых древостоев на ПП 3, 4 близки таковым в центре загрязненного бора (площадью 400 га) на ПП 2 (табл. 2). На ПП 2-4 I бонитет. ПП 1 и 7 представляют наиболее загрязненные участки с наветренной опушки бора – древостои с бонитетами II и III соответственно. Вместе с тем, ПП 7 находится вблизи от автострады.

В 1991-1998 гг. в г. Красноярске было отмечено 4-кратное снижение промышленной нагрузки (Государственный доклад..., 2008). Несмотря на это, в настоящее время уровень загрязнения атмосферы фторидами, бензапиреном, сернистым ангидридом и другими токсикантами характеризуется как очень высокий. Суммарное содержание на поверхности хвои таких элементов, как Pb, Cu, Zn, Co, Cr, Mn, Sr, Ni, F в загрязненном сосняке в 8 раз превосходит фоновый уровень (Татаринцев, Скрипальщикова, 2003). Содержание загрязняющих веществ в снежном покрове на ПП 1, 2, 7 превысило фоновый показатель на ПП 3-6 в 7 раз (37,5±3,7 г/м² против 5,4±0,7 г/м²).

В загрязненном сосняке наблюдалось достоверное увеличение размера ряда морфологических параметров по сравнению с фоновыми характеристиками – возрастание длины годовых побегов, размера и массы хвои ($P>0,95$). Эти изменения соответствуют неспецифическому адаптационному синдрому растений, согласно которому компенсационные процессы растения направлены на преодоление действия повреждающего экологического фактора.

Увеличение размера хвои компенсирует ухудшение условий фотосинтеза в связи с загрязнением хвои (в том числе из-за закупорки устьиц загрязняющими частицами и нарушения газообмена). При этом продолжительность жизни хвои, напротив, была снижена и составляла 4 года в загрязненном древостое против 5 лет в фоновом древостое. Об ослаблении загрязненного бора свидетельствует также снижение годового прироста луба по сравнению с фоновым показателем ($P>0,95$).

Таблица 2. Таксационная характеристика древостоев на постоянных ПП на 1 га в год закладки ПП и в 2010 г.

№ ПП	Год учета	Состав	Полнота	Основной эл-т леса	Сумма площ. сеч., м ²	Средние				Запас, м ³		Густота, шт.	
						возраст, лет	категория	высота, м	диаметр, см	растущего	сухостоя	растущего	сухостоя
1	2002	10СII+СI	1,4	СII	45,0	57	1,6	18,1	18,5	396	6	1671	56
	2010	10СII+СI	1,5	»	50,2	65	1,4	19,8	20,3	477	7	1545	56
2	2002	9СII+СI ед.Б	1,5	СII	48,7	58	1,4	21,3	21,9	489	10	1286	36
	2010	10СII+СI	1,5	»	53,7	66	1,4	23,3	23,9	581	7	1200	64
3	2002	9СIБ ед.Л	1,5	С	46,7	62	1,3	21,1	20,4	472	8	1430	81
	2010	9СIБ ед.Л	1,6	»	51,6	70	1,4	23,0	22,3	558	5	1319	44
4	2002	9СIЛ+Б	1,5	С	50,0	62	1,4	20,9	19,6	503	9	1664	172
	2010	9СIЛ+Б	1,6	»	53,2	72	1,6	23,1	22,0	578	17	1398	187
5	2003	10С ед.Л, Б	1,6	С	59,4	86	1,3	26,7	29,1	714	1	895	5
	2010	10С ед.Л	1,7	»	63,5	94	1,4	27,8	30,6	788	10	864	23
6	2005	10С+Л	1,6	С	55,7	73	1,3	22,2	22,1	584	4	1456	38
	2010	10С+Л	1,7	»	59,0	79	1,4	23,2	23,0	640	3	1425	31
7	2005	9СIIIСI	1,5	СII	42,1	59	1,5	16,3	16,4	339	3	1980	41
	2010	9СIIIСI	1,5	»	44,5	64	1,5	17,2	17,4	376	6	1865	74

Примечание. СI и СII – сосна первого (материнского) и второго (дочернего) поколений соответственно; Б – береза; Л – лиственница; 10, 9, 1, +, ед. – коэффициенты участия породы (элемента леса) в составе древостоя, определяемые по запасу растущего леса, то есть 100, 90, 10, 2-5% и менее 2% запаса. Полнота – отношение фактической суммы площадей сечений стволов на высоте 1,3 м к табличной, взятой из стандартных таблиц сумм площадей сечений и запасов нормальных древостоев сосны (Третьяков и др., 1952). Диаметр измеряется на высоте 1,3 м.

На ПП проверяли возможность ранней диагностики состояния хвойных по параметрам иммунного ответа стволовой флоэмы на действие мицелиального экстракта *Ceratocystis laricicola*. Ежегодно измеряли – величину и смещение некроза относительно раневого отверстия во флоэме после инокуляции ствола мицелиальным экстрактом у случайно выбранных деревьев (по 20-25 сосен на каждой ПП), а также категорию состояния всех учетных деревьев (по 200-300 деревьев на ПП). В загрязненных и фоновых древостоях ежегодно определяли средний размер некроза и среднюю категорию состояния, взвешенные по запасу (объему стволов). Данные наблюдений заносили в базу данных, созданную в среде MS ACCESS.

Модельные эксперименты проводили на изолированных тканях (каллусах) и проростках хвойных, которые обрабатывали мицелием или экстрактами фитопатогенных грибов. Каллусные культуры лиственницы сибирской, ели сибирской и сосны обыкновенной выращены при стандартных условиях из отрезков гипокотилей. 15-дневные проростки сосны выращены в вегетационной песчаной культуре с использованием питательной смеси Уолкера (Бутенко, 1964) (1/4 от полного состава). Концентрация веществ в полной смеси (мг/л раствора). Ca(NO₃)₂·4H₂O (236), KH₂PO₄ (86), KCl (149), MgSO₄·7H₂O (121), NH₄H₂PO₄ (57), MnSO₄·H₂O (4,5), FeCl₃ (1,5), H₃BO₃ (1,5), ZnSO₄·7H₂O (1,5), Mg₂MoO₄ (0,2), KJ (0,075).

Мицелий или выделенные из него экстрактивные вещества наносили на поверхность каллуса хвойных. Каллусы фиксировали 70%-ным этанолом через 24 и 48 часов после действия грибных индукторов. Кроме этого для инфицирования проростков сосны на

поверхность субстрата для выращивания наносили суспензию спор гриба *Fusarium sporotrichiella* var. *sporotrichioides* титром 1 млн спор на 1 см³ субстрата. Отбор проводили через 72 часа после заражения, разделяя проростки на устойчивые и восприимчивые.

Грибы выделяли в культуру из образцов луба, поврежденных насекомыми-ксилофагами, и хранили на агаризованной среде. Мицелиальную массу наращивали на жидком пивном сусле методом «поверхностного» культивирования. После фильтрации грибную массу использовали для извлечения высокомолекулярной фракции, обозначенной, как грибной (мицелиальный) экстракт (Полякова и др., 2011). Белковую фракцию из грибного экстракта выделяли методом гель-фильтрации в максимуме при 290 нм. (Метлицкий, 1976).

Для оценки протекторной роли фенольных соединений и возможности использования грибного экстракта вместо живого мицелия регистрировали размер некроза (рис. 1), анатомические, гистохимические характеристики и содержание фенольных соединений в лубе ствола хвойных

после его повреждения и внесения в раневое отверстие мицелия или мицелиального экстракта.

Рис. 1. Некротическое пятно на поверхности луба ствола сосны обыкновенной через 4 недели после внесения в раневое отверстие 0,5 мг экстрактивных веществ из мицелия гриба *Ceratocystis laricicola*. Мертвая кора удалена. НФ – некроз флоэмы.

В коре ствола высекали отверстия до заболони диаметром 7 мм. В эти раневые полости вносили 2-недельный мицелий грибов, либо

его экстракт. Полости в живой коре закрывали ее высечками. Образцы луба извлекали в начале опыта и через различное время после его поранения или поранения в сочетании с воздействием грибного индуктора – экстракта или мицелия. Образцы луба отбирали на 3-10 деревьях (повторностях) после удаления мертвой коры.

Число отверстий, высеченных на каждом дереве в начале опыта, соответствовало числу вариантов эксперимента. Условия проведения опыта стандартизировали в соответствии с результатами предварительных экспериментов (высота расположения раневого отверстия на стволе 1,3 м; доза грибного экстракта в 1 отверстию – 0,5 мг в 50 мкл дистиллята; дата обработки флоэмы – середина июля).

При изучении изменчивости реакции в летний период воздействие на флоэму осуществляли также в середине июня и середине августа. Через 4-6 недель после начала опыта, когда размер некроза уже не увеличивался, измеряли длину некроза и размер его верхней части – расстояние от середины отверстия до верхнего края некроза, чтобы оценить (в %) вертикальную асимметричность («смещение») зоны некроза относительно отверстия (рис. 1).

Растительный материал фиксировали 70%-ным этанолом для определения содержания фенольных соединений, смолистых веществ и углеводов (Полякова и др., 2011). Часть образца луба фиксировали в 4% формалине. На поперечных микросрезках были проведены гистохимические пробы на обнаружение лигнина (с флороглюцином и серной кислотой), смолистых веществ (с ацетатом меди). Также определяли степень

сформированности каллусного валика по периметру раны и некрофилактической перидермы в лубе, разделяющей некроз и живые ткани.

В растительной ткани определяли содержание лигнина с тиогликолевой кислотой (Venverloo, 1969), "целлюлозной" фракции (нелигниновых компонентов клеточной стенки), пентанорастворимых нелетучих смолистых веществ, низкомолекулярных сахаров методом восстановления меди (Вознесенский и др., 1962), ПА с помощью окисления смесью бутанол-соляная кислота (Stafford, Lester, 1986). Определение свободной и связанной форм ПА проводили при анализе экстрагированной этанолом и неэкстрагируемой частей растительного материала соответственно. Содержание общих ПА рассчитывали как сумму свободных и связанных ПА. *n*-оксибензойную кислоту анализировали методом ВЭЖХ.

Обработка данных выполнялась в системе STATISTICA методами корреляционного, дисперсионного (ANOVA) и регрессионного (линейного и нелинейного) анализа.

Глава 3. Оценка протекторной роли фенольных соединений в устойчивости хвойных к патогенным грибам

Сравнивали реакцию флоэмы ствола пихты сибирской на действие двух видов офиостомовых грибов, различающихся по агрессивности. *Ophiostoma* sp. вызывал некрозы меньшего размера по сравнению с *L. sibirica* (рис. 2). Скорость накопления лигнина и ПА в зоне некроза флоэмы, вызванного *Ophiostoma* sp., была выше по сравнению с *L. sibirica*.

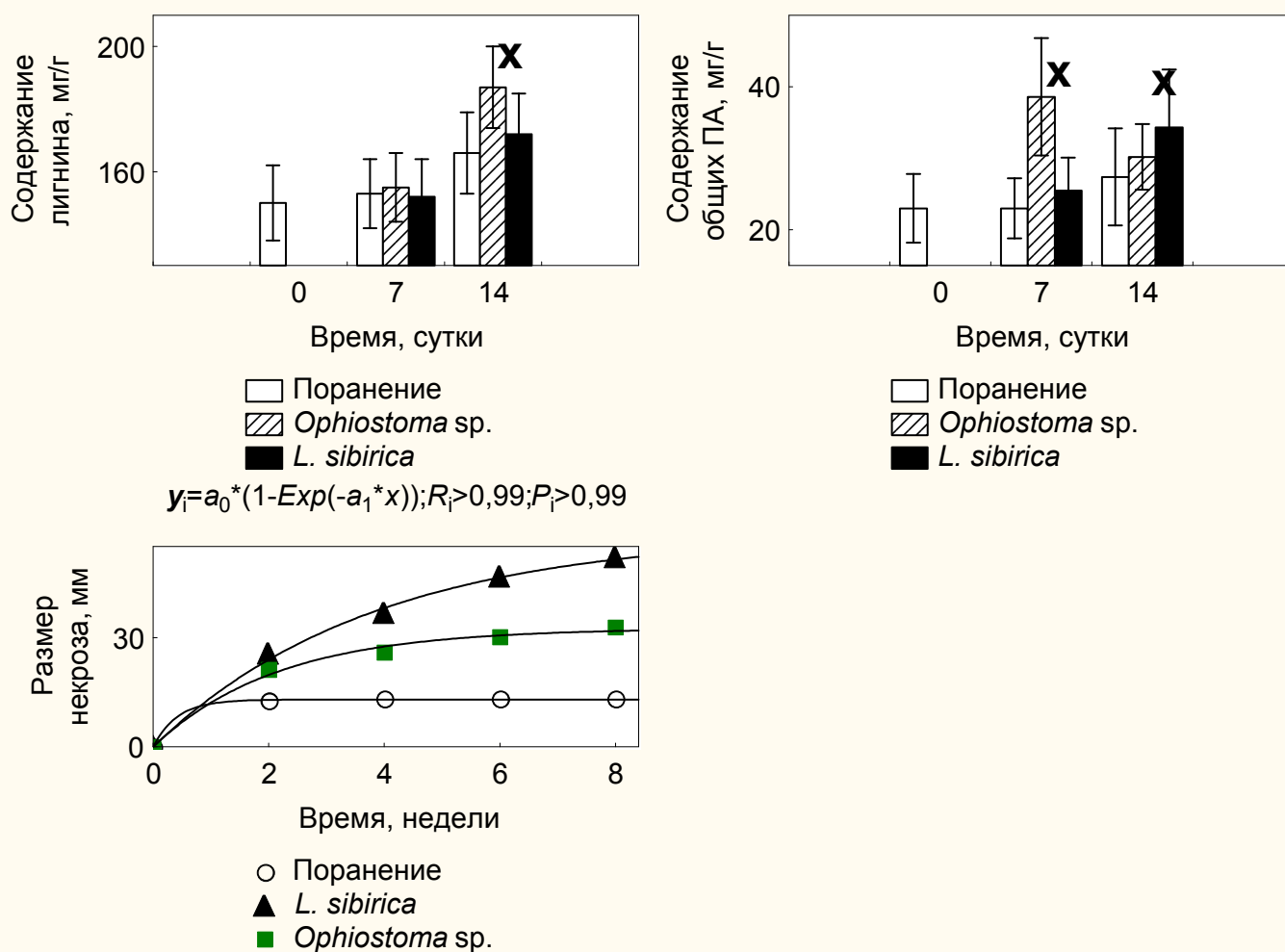


Рис. 2. Размер некроза, содержание лигнина и общих ПА во флоэме ствола пихты через различное время после инокуляции мицелия *Ophiostoma* sp. и *L. sibirica*. "X" отмечены различия между реакцией на инфекцию и поранение при $P > 0,95$.

Накопление общих ПА в зоне некроза через 2 недели после инокуляции ствола грибами с высокой степенью достоверности обратно коррелировало с величиной некроза (рис. 3).
 $R=-0,8; P=0,999; y=57-0,6*x$

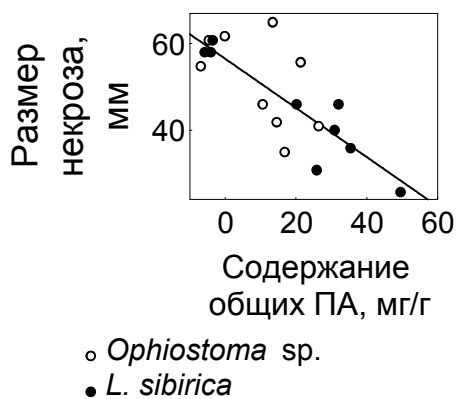


Рис. 3. Размер некроза луба ствола пихты сибирской через 14 суток после инокуляции мицелия *Ophiostoma* sp. и *L. sibirica* в связи с накоплением в лубе содержания общих ПА во 2 неделю после действия грибов.

Таким образом, активность изменения содержания ПА и лигнина в зоне некротической реакции флоэмы пихты сибирской на действие офиостомовых грибов характеризовала активность защитного ответа дерева.

Устойчивость пихты к грибам была выше у деревьев с более высокой устойчивостью к насекомому-переносчику грибов – черному пихтовому усачу (рис. 4). Так, размер некроза был меньше, а активность накопления лигнина и ПА была выше у деревьев, характеризующихся большей устойчивостью к насекомому. Опыты были проведены в очаге усача на деревьях, которые через 3 недели после инокуляции грибами были заселены усачом во время его массового лета. Плотность поселения усача 5-6 насечек на dm^2 поверхности ствола. На следующий год после заселения усачом устойчивые деревья еще сохраняли жизнеспособность, а ослабленные, обозначенные как неустойчивые, погибали.

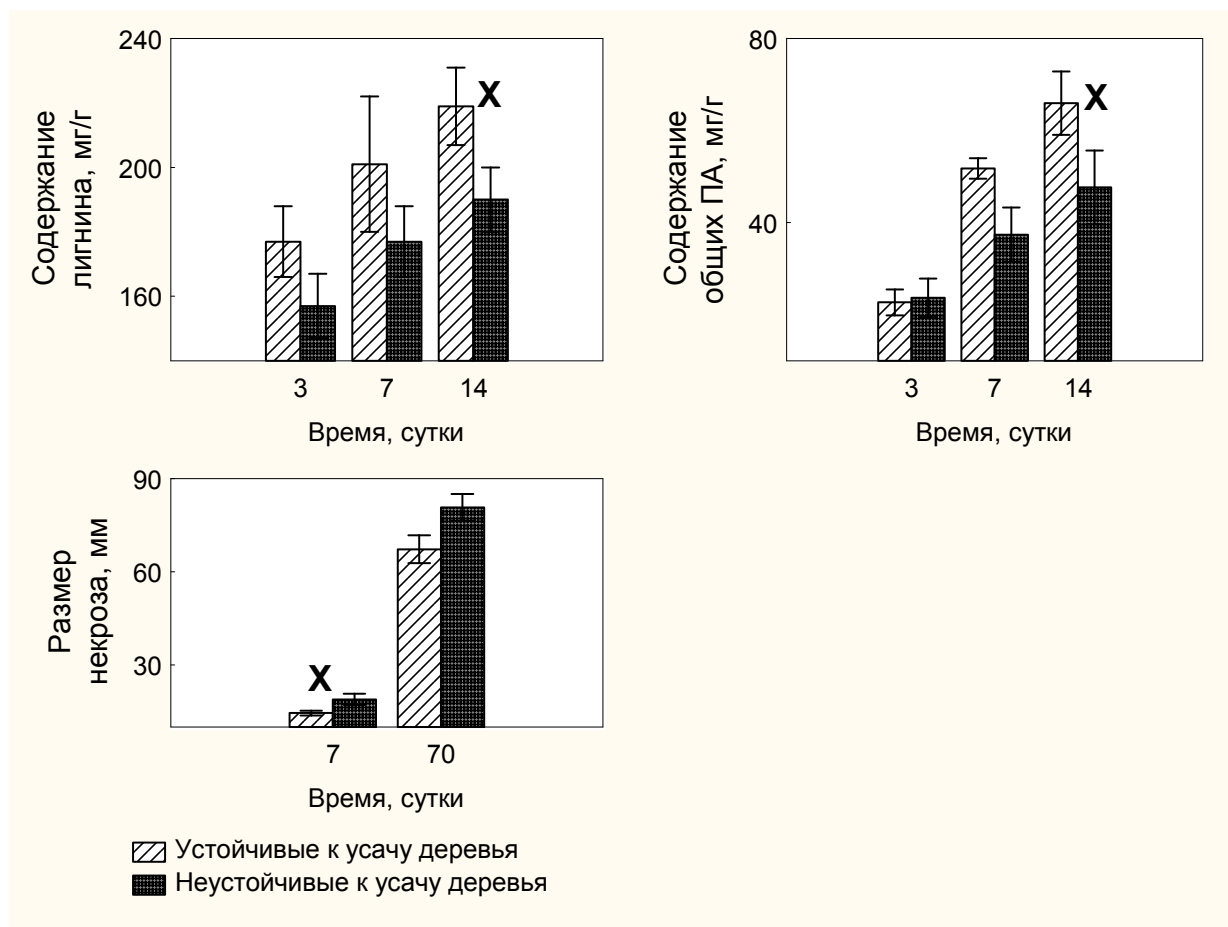


Рис. 4. Параметры ответа флоэмы через различное время после инокуляции ствола мицелием *Ophiostoma* sp. у пихты сибирской, различающейся по устойчивости к усачу. «X» отмечены параметры достоверно различающиеся у неустойчивых и устойчивых к усачу деревьев при $P>0,95$.

Измерение характеристик реакции в разные фенофазы летнего периода показало большую активность накопления лигнина и смолы в середине сезона вегетации, характеризующегося более высоким уровнем сахаров в столовой флоэме по сравнению с июньской фенофазой – в период активного роста побегов и высокой камбиальной активности (рис. 5). Результаты согласуются с концепцией снижения активности защиты в период активного роста.

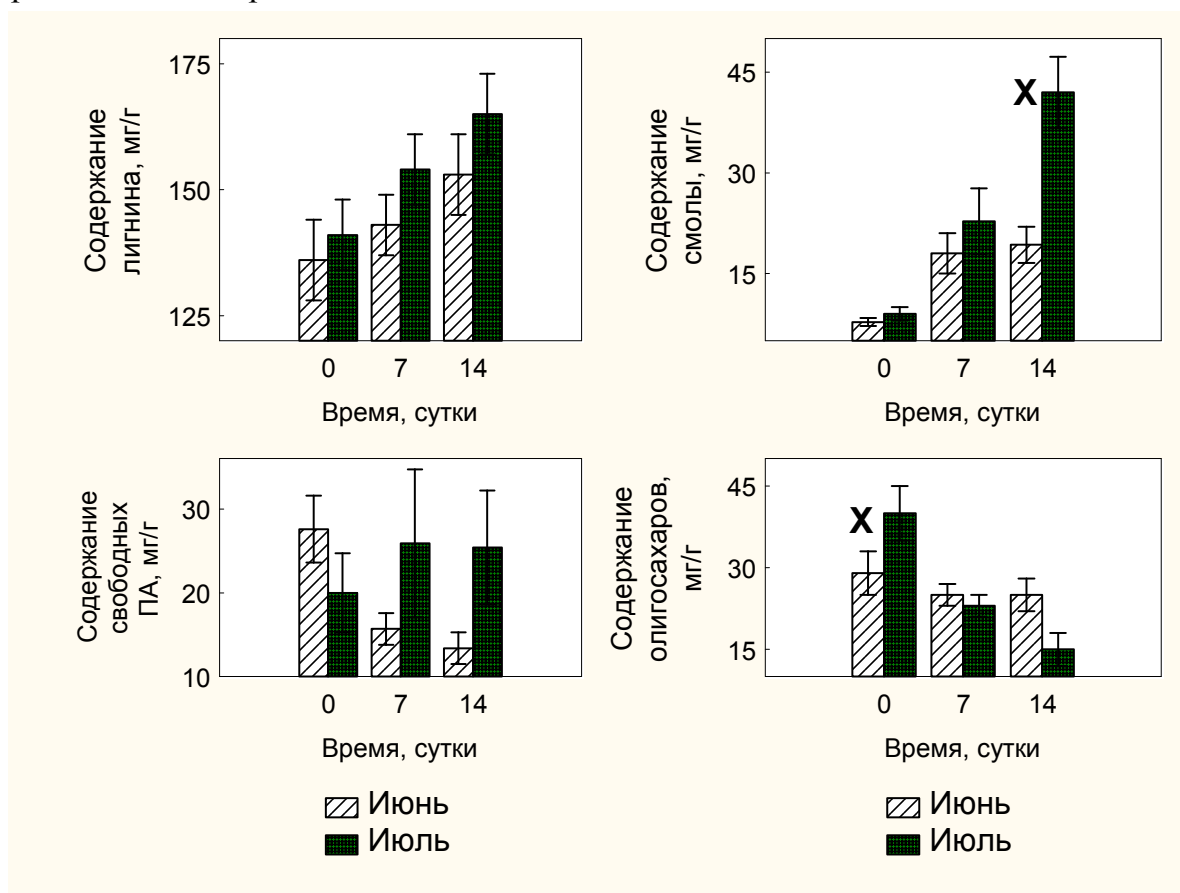


Рис. 5. Параметры ответа флоэмы пихты сибирской через 7 и 14 суток после инокуляции ствола грибом *Ophiostoma* sp. в разные фенофазы вегетационного периода. «X» отмечены параметры, различающиеся в июне и июле при $P > 0,95$.

При заражении проростков сосны обыкновенной спорами *Fusarium sporotrichiella* содержание лигнина и ПА было существенно выше у проростков устойчивых к фузариозу по сравнению с восприимчивыми растениями в 4,3, 1,4 раза соответственно ($P > 0,95$). Воздействие экстрактивных веществ из мицелия разных видов рода *Fusarium* на каллусы сосны обыкновенной показало, что через 2 суток после обработки содержание лигнина в растительной ткани обратно коррелировало с патогенностью грибов, из которых были выделены экстракты ($P > 0,95$) (рис. 6). Патогенность грибов была определена предварительно по доле отпада семян сосны обыкновенной при их заражении разными видами грибов рода *Fusarium*.

$$R = -0,72; P = 0,96; y = 97 - 0,3 \cdot x$$

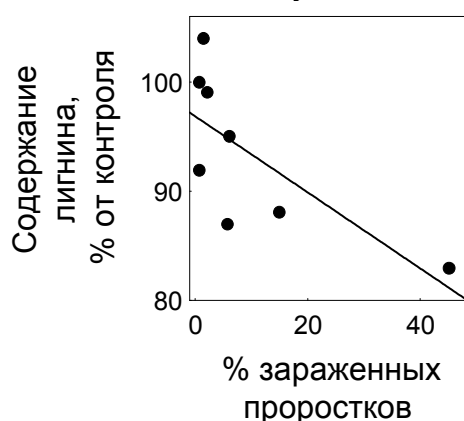


Рис. 6. Корреляция между содержанием лигнина в каллусах сосны обыкновенной через 2 суток после обработки экстрактом из мицелия разных видов *Fusarium* и патогенностью грибов, оцененной по проценту заражения проростков сосны обыкновенной разными видами грибов рода *Fusarium*.

Таким образом, опыты на деревьях и проростках хвойных доказывают протекторную функцию лигнина и ПА.

Глава 4. Элиситорная активность высокомолекулярных экстрактивных веществ из мицелия офиостомовых грибов в опытах на деревьях и каллусах хвойных

Внесение грибного экстракта, как и живого мицелия, в отверстие, высеченное во флоэме ствола, вызывало увеличение некроза луба по сравнению с контрольным некрозом от поранения у разных хвойных видов (табл. 3).

Таблица 3. Длина некроза в лубе через 4 недели после инокуляции ствола хвойных 0,5 мг грибного экстракта, либо мицелием офиостомового гриба

Вид гриба	Вариант инокуляции					α_3
	Контроль	Грибной экстракт	α_1	Живой мицелий	α_2	
Лиственница сибирская						
–	14,3 ± 0,6	–	–	–	–	–
<i>C. laricicola</i>	–	18,0 ± 1,1	0,004	22,2 ± 2,0	0,000	0,064
<i>O. minus</i>	–	18,0 ± 0,9	0,002	35,2 ± 3,0	0,000	0,000
<i>C. polonica</i>	–	20,9 ± 2,0	0,001	19,6 ± 0,8	0,000	0,669
<i>L. sibirica</i>	–	18,4 ± 1,6	0,011	26,4 ± 2,9	0,000	0,020
<i>Ophiostoma</i> sp.	–	18,5 ± 1,6	0,010	33,4 ± 3,3	0,000	0,001
Сосна обыкновенная						
–	23,3 ± 1,6	–	–	–	–	–
<i>C. laricicola</i>	–	38,5 ± 4,3	0,004	77,8 ± 15,3	0,000	0,002
<i>O. minus</i>	–	42,0 ± 6,3	0,001	98,6 ± 9,2	0,000	0,000
<i>C. polonica</i>	–	45,3 ± 7,5	0,001	52,0 ± 7,9	0,000	0,586
<i>L. sibirica</i>	–	49,6 ± 10,6	0,004	47,4 ± 6,7	0,000	0,895
<i>Ophiostoma</i> sp.	–	42,3 ± 4,1	0,000	70,4 ± 7,0	0,000	0,003
Ель сибирская						
–	17,4 ± 1,5	–	–	–	–	–
<i>C. laricicola</i>	–	22,6 ± 2,3	0,068	20,6 ± 1,6	0,274	0,629
<i>O. minus</i>	–	19,8 ± 1,4	0,276	44,2 ± 4,2	0,000	0,000
<i>C. polonica</i>	–	28,2 ± 4,1	0,011	18,6 ± 1,7	0,679	0,149
<i>L. sibirica</i>	–	25,8 ± 3,7	0,028	28,6 ± 4,2	0,005	0,658
<i>Ophiostoma</i> sp.	–	27,3 ± 3,0	0,004	56,4 ± 10,7	0,000	0,004
Кедр сибирский						
–	23,0 ± 1,8	–	–	–	–	–
<i>C. laricicola</i>	–	27,7 ± 2,2	0,115	33,0 ± 6,1	0,045	0,334
<i>O. minus</i>	–	26,8 ± 2,9	0,255	42,0 ± 5,9	0,001	0,029
<i>C. polonica</i>	–	32,6 ± 2,6	0,005	42,0 ± 2,5	0,000	0,077
<i>L. sibirica</i>	–	27,7 ± 2,9	0,164	43,3 ± 7,8	0,001	0,038
<i>Ophiostoma</i> sp.	–	37,9 ± 4,5	0,003	44,0 ± 4,6	0,000	0,481

Примечание. Приведены средние значения и их ошибки для 5–7 деревьев. α_1 , α_2 – уровни значимости отличия от контроля; α_3 – уровень значимости различия длины некрозов, вызванных действием экстракта и мицелия одного и того же вида гриба. Полужирным шрифтом отмечены достоверные различия при $\alpha < 0,05$ ($\alpha = 1 - P$).

На примере пихты сибирской и лиственницы сибирской было показано, что грибной экстракт вызывал изменение содержания фенольных соединений во флоэме аналогичное их изменению при действии живого мицелия (рис. 7, приведены данные для лиственницы). Отмечено накопление лигнина.

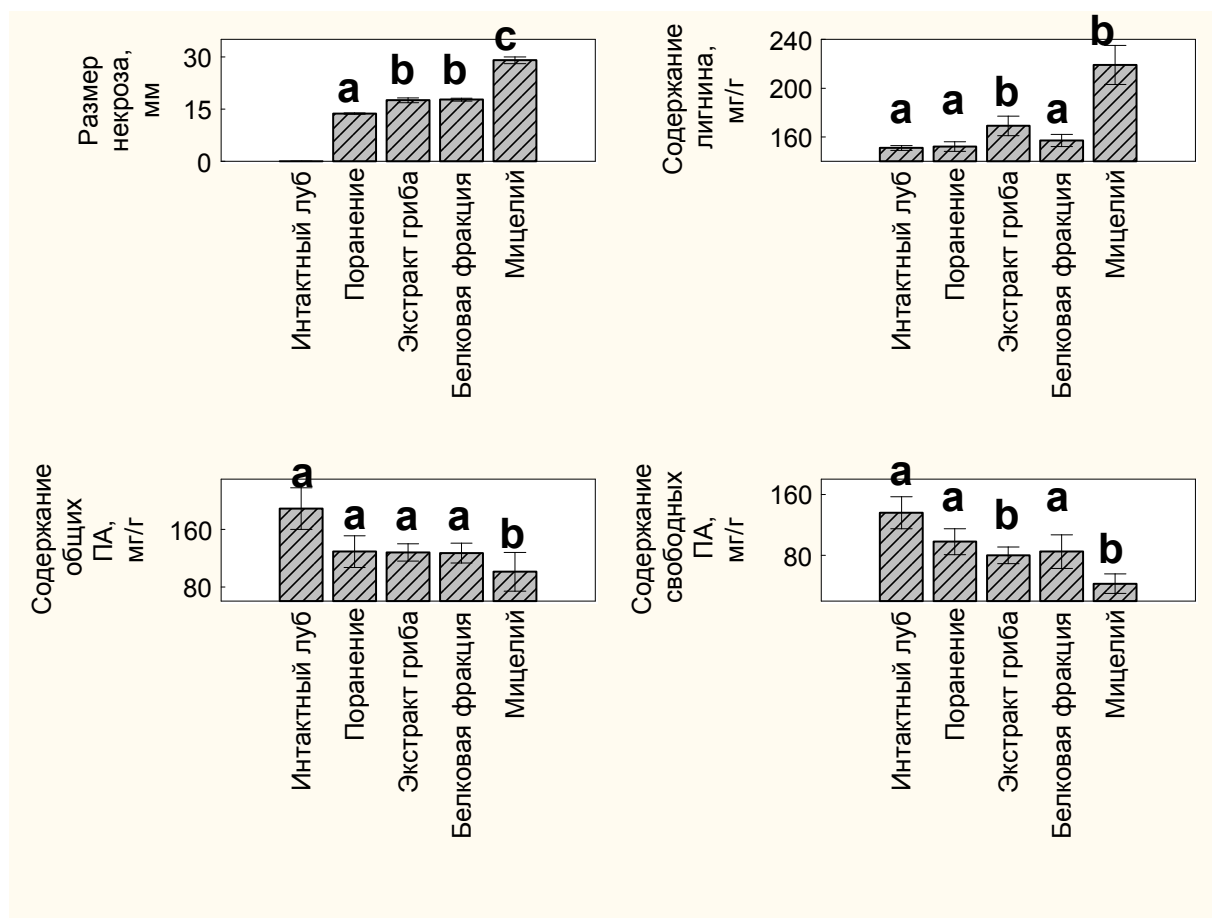


Рис. 7. Размер некроза ($n=10$), содержание лигнина и ПА ($n=3$) в зоне ответа луба лиственницы сибирской через 14 суток после инокуляции ствола индукторами гриба *Ophiostoma* sp. Разными буквами отмечены значения достоверно отличающиеся друг от друга при $P>0,95$.

Лиственница сибирская в отличие от пихты сибирской после инокуляции ствола мицелием и его экстрактом в середине июля характеризовалась резким снижением содержания свободных ПА во флоэме (рис. 7). У пихты уменьшение содержания ПА отмечено только в случае грибной инокуляции 15 июня (рис. 5), когда уровень сахаров во флоэме ствола был понижен. Результаты позволяли предположить возможность катаболизма ПА, как дыхательного субстрата при синтезе протекторного соединения – лигнина. Отрицательная корреляция между содержанием свободных ПА и лигнином свидетельствуют в пользу этого предположения (рис. 8).

$$R = -0,70; P=0,99; y=215-0,5*x$$

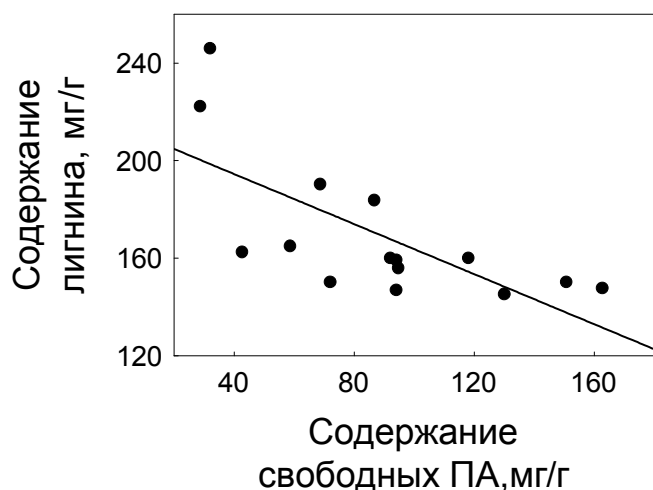


Рис. 8. Корреляция между содержанием свободных ПА во флоэме через 14 суток после инокуляции ствола лиственницы сибирской грибными индукторами – грибным экстрактом, его белковой фракцией, мицелием *Ophiostoma* sp.

Для выявления физиологических механизмов увеличения размера опытного некроза, вызванного грибным экстрактом, по сравнению с контрольным некрозом от поранения сравнивали анатомические и биохимические параметры зоны ответа стволовой флоэмы сосны на опытное и контрольное повреждение луба. В обоих вариантах отмечено формирование изолирующей перидермы, разделяющей живые и некротизированные ткани, а также каллусного валика по периметру раны. Оба вида повреждения луба уже через 2 суток вызвали накопление смолы в сердцевинных лучах, в норме заполненных углеводами и выполняющих транспортную и запасную функцию.

В стенках ситовидных клеток флоэмы уже через 1 сутки после поранения отмечено накопление лигнина в норме не свойственного флоэме (рис. 9). В опытном варианте с использованием грибного экстракта накопление лигнина начиналось позднее, чем при механическом поранении луба, что доказывает ингибирование синтеза лигнина грибными метаболитами и присутствие в мицелиальном экстракте супрессоров фитозащиты.

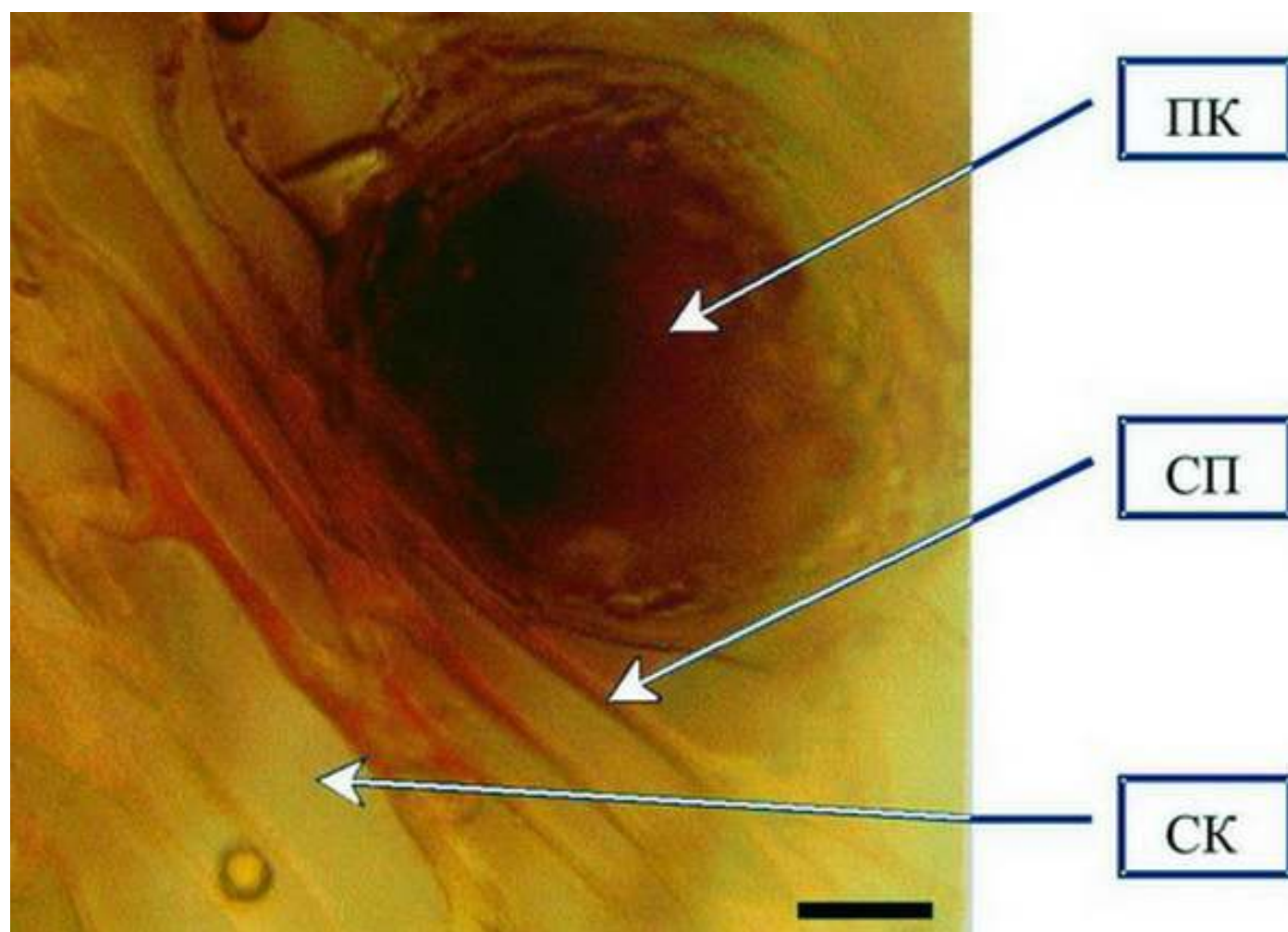


Рис. 9. Поперечный разрез зоны реакции луба ствола сосны обыкновенной через 1 сутки после поранения при окрашивании флороглюцином. Накопление лигнина началось в срединных пластинках (СП) ситовидных клеток (СК). ПК – паренхимная клетка. Масштаб 10 мкм.

Биохимические параметры ответа в опыте и контроле различались количественно, но направление изменения было одинаковым – лигнин, связанные ПА, смолистые вещества существенно накапливались, а содержание свободных ПА, низкомолекулярных сахаров, "целлюлозы" (нелигниновых компонентов клеточной стенки) достоверно снижалось (рис. 10). Факторный дисперсионный анализ показал, что изменение содержания лигнина, смолы, свободных ПА и сахаров происходит более активно в

варианте опыта с обработкой луба грибным экстрактом по сравнению с контрольным

вариантом – поранением луба (табл. 4). Таким образом, грибные элиситоры включают синтез протекторных веществ – лигнина и смолы.

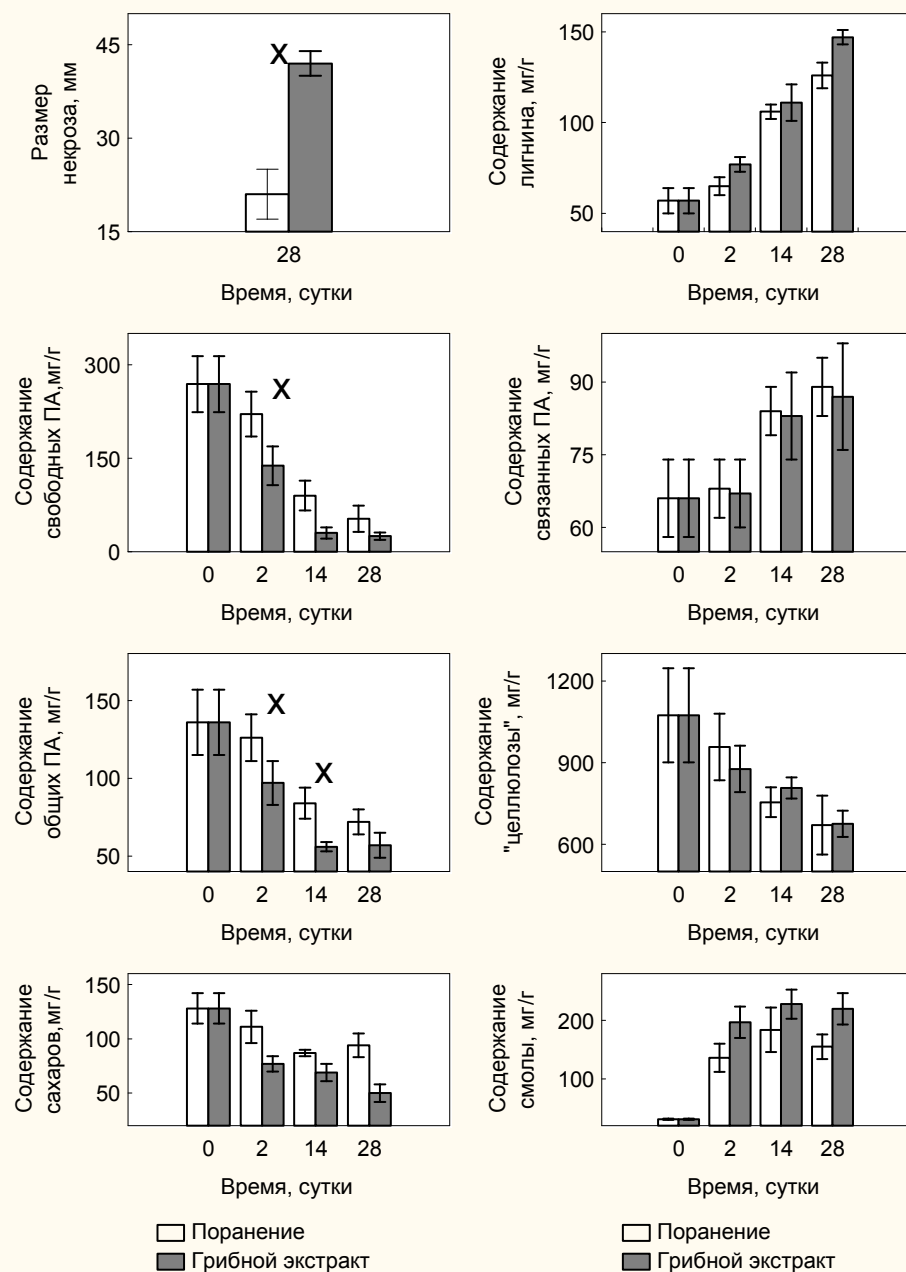


Рис. 10. Влияние экстракта гриба *C. laricicola* на параметры раневой реакции флоэмы ствола сосны обыкновенной. "X" отмечено различие параметров при разных вариантах обработки флоэмы (поранение и поранение в сочетании с действием 0,5 мг грибного экстракта) по *t*-критерию при $P > 0,95$. "Целлюлоза" – нелигниновые компоненты клеточной стенки.

Таблица 4. Достоверность изменения содержания проанализированных

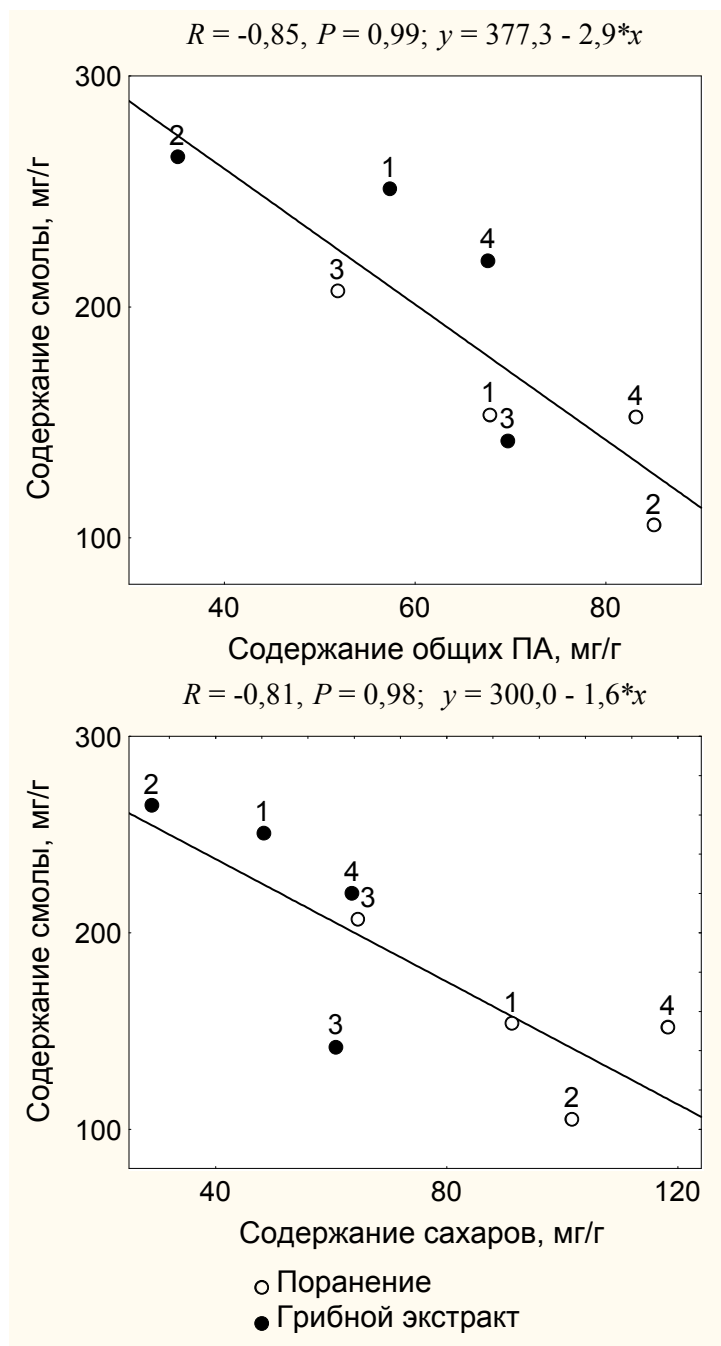
веществ во флоэме ствола сосны в зависимости от варианта опыта (1 – поранение или 2 – инъекция экстракта *C. laricicola*) и времени после воздействия на флоэму (0, 2, 14, 28 суток)

Источник изменчивости параметров реакции (фактор)	Статистическая значимость факторного воздействия ($P=1-p$)						
	Лигнин	"Целлюлоза"	Связанные ПА	Свободные ПА	Общие ПА	Смола	Низкомолекулярные углеводы
Вариант опыта (1 и 2)	0.975	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.992	0.988	0.979	0.999
Время после начала опыта	0.999	0.999	0.980	0.999	0.999	0.999	0.999

Примечание. Число повторностей – 4. Лигнин, "целлюлозу" и связанные ПА оценивали по концентрации в неэкстрагируемом остатке, свободные ПА – в экстрагируемом остатке, смолу и низкомолекулярные углеводы – в полном образце. Критерий *p* рассчитан в программе STATISTICA, ANOVA. *ns* – влияние фактора не значимо.

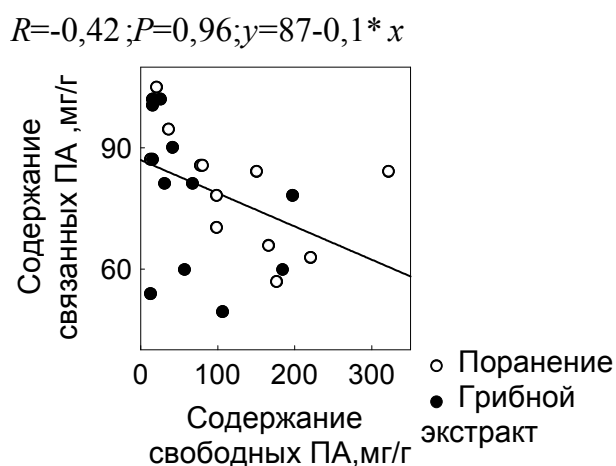
О возможности использования ПА как субстрата при синтезе защитных веществ свидетельствует выявленная отрицательная корреляция между содержанием смолы и ПА, смолы и сахаров, в зоне некроза ($P > 0,95$) (рис. 11).

Рис. 11. Корреляция между содержанием смолы и общих ПА (верхний график), и содержанием смолы и низкомолекулярных углеводов (нижний график) в лубе ствола сосны обыкновенной через 28 суток после поранения или обработки луба 0,5 мг экстракта гриба *C. laricicola*. Указаны номера 4 деревьев.



Была выявлена достоверная связь снижения свободной формы и накопления связанной формы ПА в лубе, после поранения и действия грибного экстракта ($P > 0,95$), что свидетельствует о возможности перехода свободных ПА в связанную форму и участии этих соединений в защитной трансформации клеточной стенки (рис. 12).

Рис. 12. Отрицательная корреляция между содержанием свободных и связанных ПА в зоне реакции луба на поранение и инокуляцию ствола сосны обыкновенной 0,5 мг экстракта *C. laricicola*.



Проведение опытов на каллусах позволило исключить влияние фактора поранения растительной ткани, что было актуальным в связи с неспецифичностью ответа на оба вида повреждения луба – поранение и инъекцию грибного экстракта. Грибной экстракт наносили на поверхность каллуса, в отличие от опытов на деревьях, в которых для обеспечения контакта экстракта и живой растительной ткани необходимо предварительное поранение луба. В каллусах хвойных после воздействия на них грибными экстрактами было отмечено накопление полимерных фенольных соединений (лигнина, связанных ПА) и мономерного фенольного соединения (*n*-оксибензойной кислоты в свободной и связанной форме) (рис. 13-15).

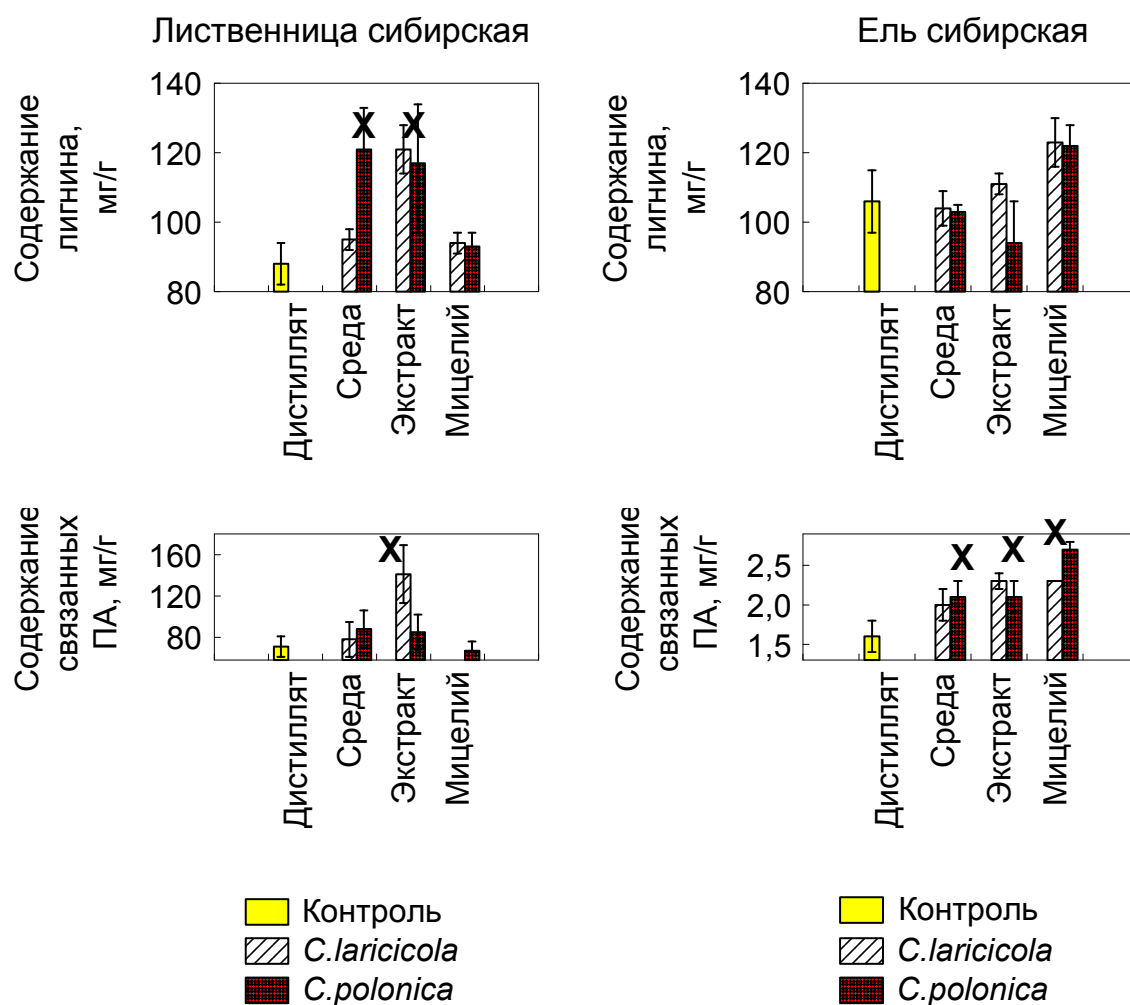


Рис. 13. Содержание лигнина и связанных ПА в каллусах хвойных через 48 часов после действия грибов *Ceratocystis laricicola* и *C. polonica* и их метаболитов. По оси абсцисс обозначены варианты обработки каллусов: "Дистиллят" – дистиллированной водой, "Среда" – культуральной средой после выращивания гриба, содержащей грибные экзометаболиты, "Экстракт" – грибным экстрактом, "Мицелий" – живым мицелием. «X» отмечены значения достоверно отличающиеся от контроля ("Дистиллят") при $P > 0,95$.

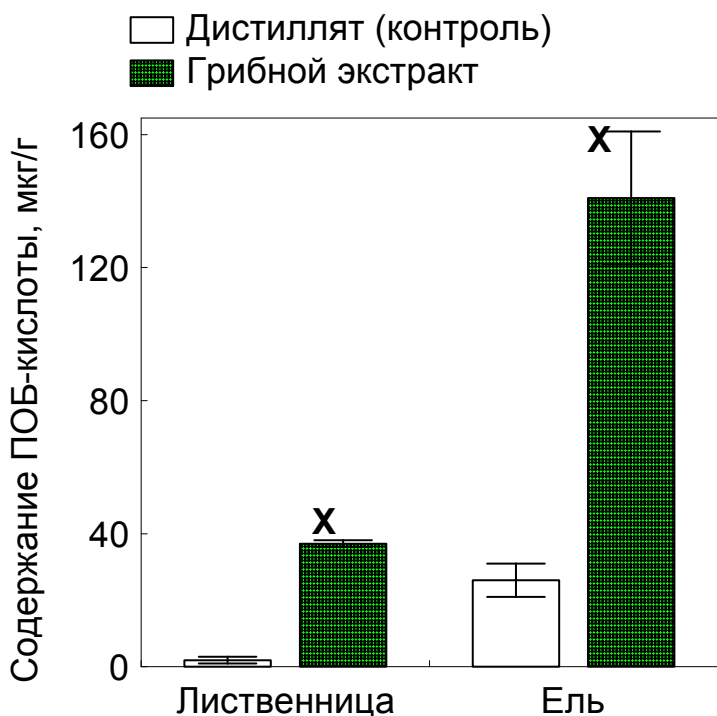


Рис. 14. Накопление свободной *p*-оксибензойной кислоты в каллусных культурах лиственницы сибирской и ели сибирской через 48 часов после действия экстрактов из мицелия гриба *C. laricicola*, мг/г сухого каллуса. «X» отмечены значения, отличающиеся от контроля при $P > 0,99$.

Увеличение содержания связанной *p*-оксибензойной кислоты указывает на возможность участия этого протекторного соединения в укреплении клеточной стенки во время защитной реакции растения на инфекцию (рис. 15).

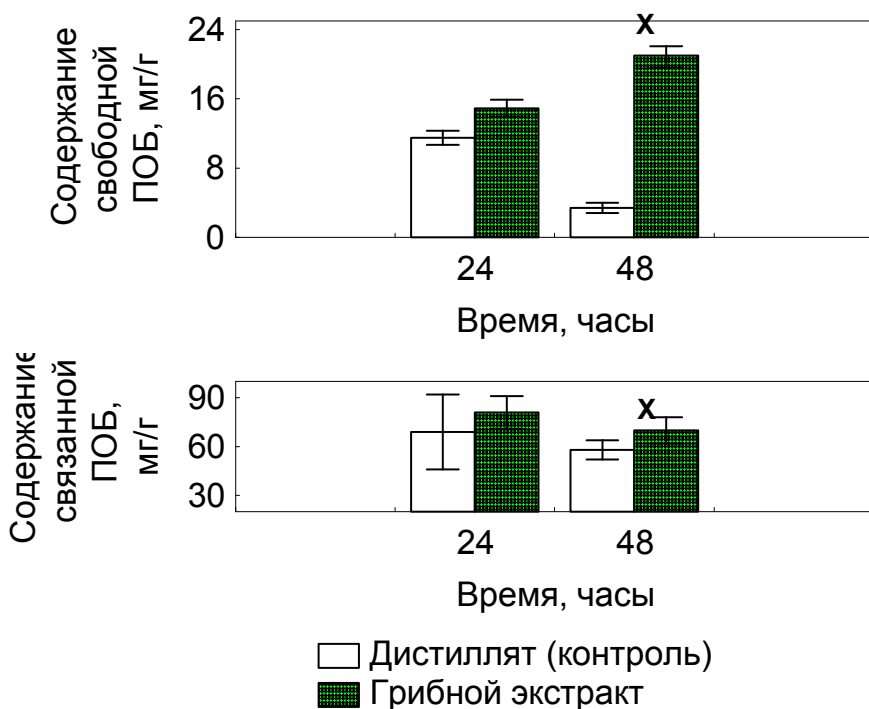


Рис. 15. Содержание свободной и связанной форм *p*-оксибензойной кислоты в каллусе лиственницы сибирской после обработки экстрактом *C. laricicola*, мг/г сухого каллуса. «X» отмечены значения, отличающиеся от контроля при $P > 0,95$.

Таким образом, модельные опыты на каллусах хвойных подтвердили элиситорную активность метаболитов офиостомовых грибов – их способность активировать синтез протекторных веществ в тканях хвойных.

Известно, что оксибензойные кислоты (C_6-C_1 – соединения) в растениях могут синтезироваться по фенилпропаноидному пути из оксикоричных (C_6-C_3 – соединений), которые также являются предшественниками лигнина и ПА, и из промежуточного продукта шикиматного пути – дегидрошикимовой кислоты (Осипов, Шеин, 1990, Запрометов, 1993, с. 113) (рис. 16). В опытах с обработкой каллусов лиственницы

сибирской и ели сибирской грибным экстрактом активность накопления монофенольного соединения – *n*-оксибензойной кислоты (C_6-C_1) в растительной ткани была в несколько раз выше по сравнению с полифенольными соединениями (лигнином и ПА) (рис. 13, 19). Эти результаты указывают на активацию синтеза оксибензойных кислот из промежуточных продуктов шикиматного пути – хинной и шикимовой кислот, которые образуют резервные фонды у хвойных (Осипов, Шеин, 1990).

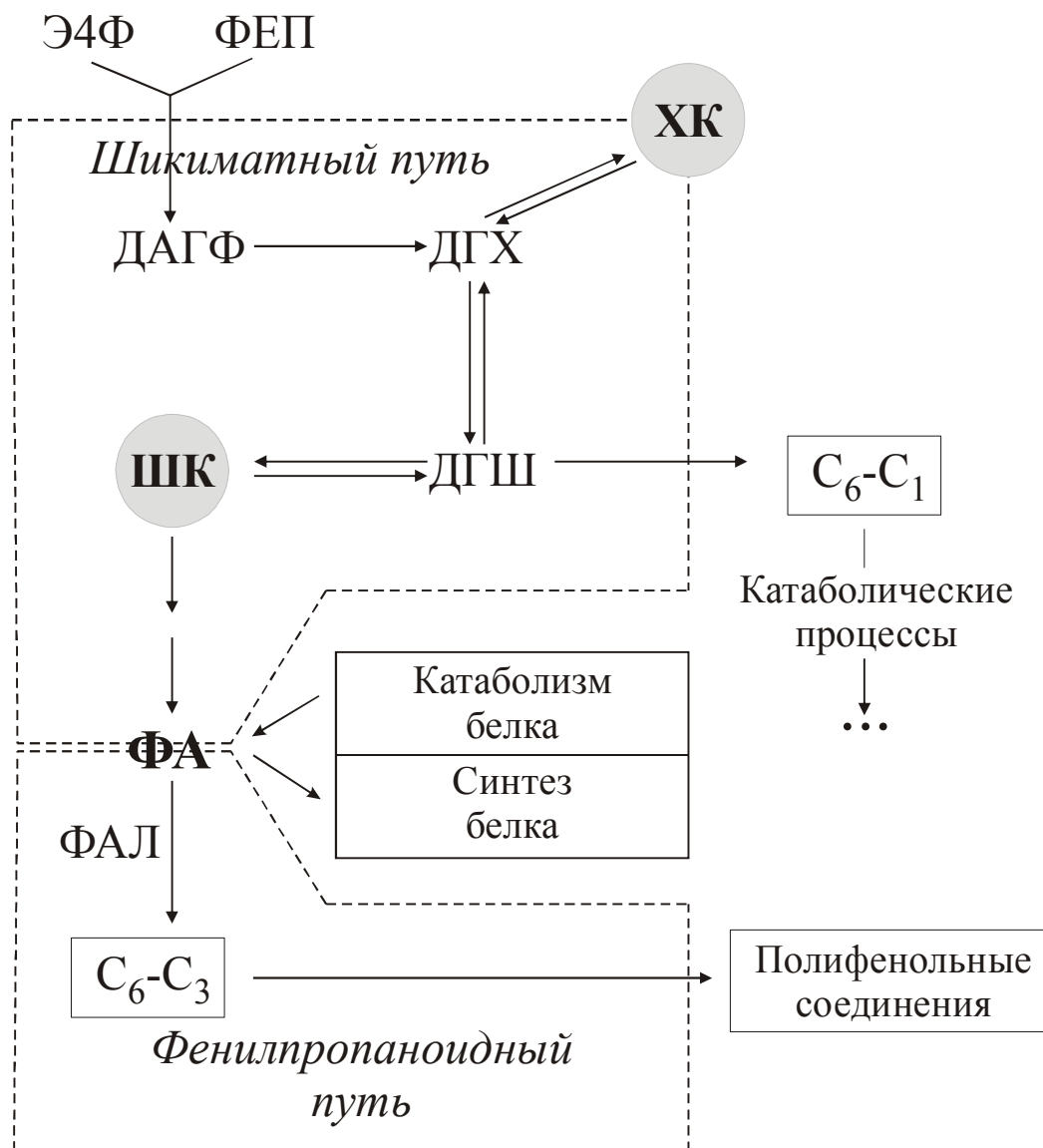


Рис. 16. Схема синтеза монофенольных (C_6-C_1 и C_6-C_3) и полифенольных соединений у хвойных. Э4Ф – эритрозо-4-фосфат; ФЭП – фосфоенолпируват; ДАГФ – 3-дезоксид-Д-арабиногептулозонат-7-фосфат; ДГХ – дегидрохинат; ДГШ – дегидрошикимат; ХК – хинная кислота; ШК – шикимовая кислота; ФА – *L*-фенилаланин; C_6-C_1 – оксибензойные кислоты; C_6-C_3 – оксикоричные кислоты; ФАЛ – *L*-фенилаланинаммиакиаза; затемненные области показывают способность хинной и шикимовой кислот образовывать резервные фонды (Шеин и др., 2001).

Глава 5. Сравнительная оценка защитной реакции хвойных на грибную инфекцию в норме и при стрессе

Защитная реакция флоэмы ствола ели сибирской на действие офиостомового гриба характеризовалась накоплением лигнина и смолы и снижением содержания ПА и сахаров. Подтопление ослабило эти процессы и вызвало увеличение некроза флоэмы (рис. 17), что

соответствует данным о снижении устойчивости подтопленных долинных лесов к грибным заболеваниям и насекомым-вредителям (Рахов, 1965, Яновский, 1991). Исходный уровень сахаров во флоэме ствола деревьев, стрессированных подтоплением, достоверно ниже, чем в норме (рис. 17), что, вероятно, вызвано анаэробнозом корневой системы и активацией гликолиза в растительных тканях.

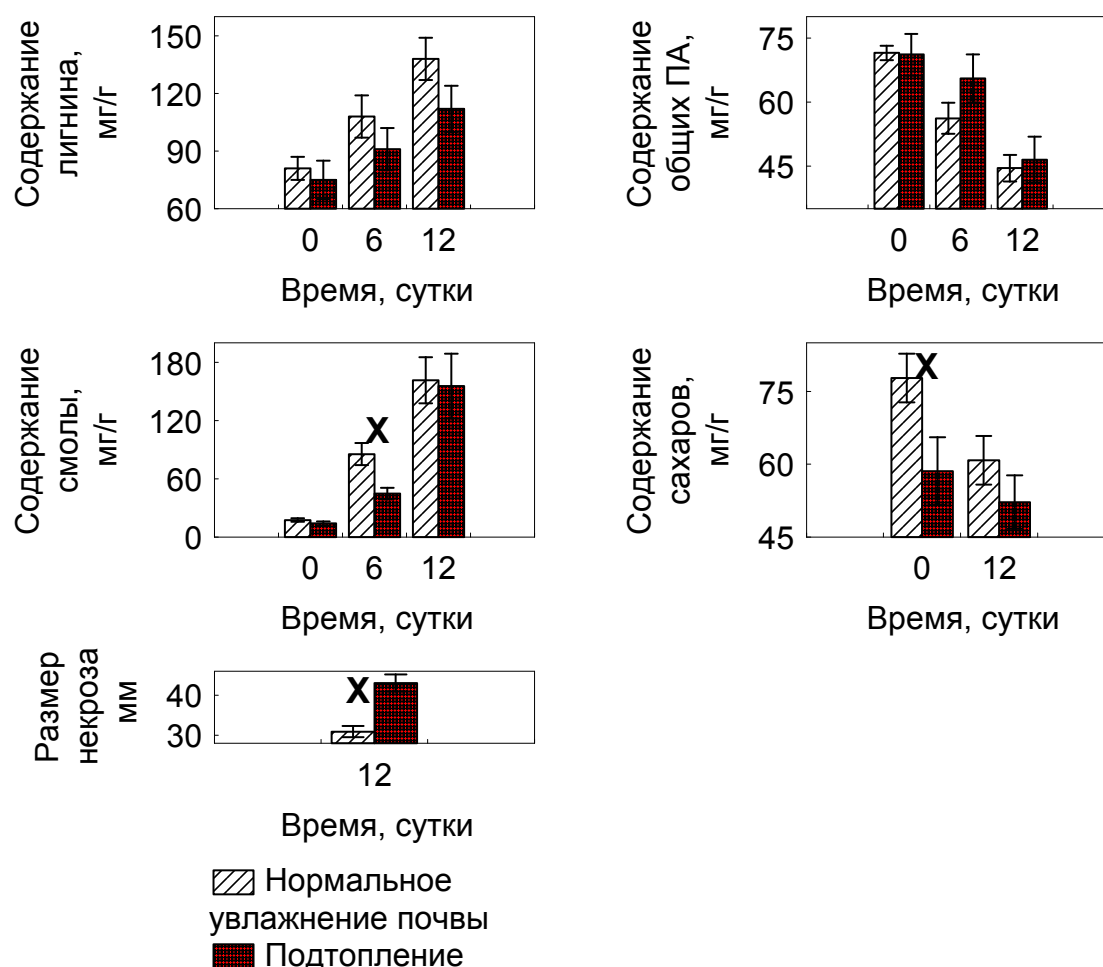


Рис. 17. Влияние водного режима почвы на параметры ответа флоэмы ели сибирской, вызванного инокуляцией ствола мицелием *Ophiostoma* sp. Знаком «X» отмечены параметры достоверно различающиеся у деревьев с разным режимом увлажнения почвы при $P > 0,95$.

В лубе подтопленных деревьев была выявлена тесная связь между снижением общих ПА и накоплением лигнина и смолы через 12 суток после начала опыта (рис. 18). У деревьев с нормальным водным режимом почвы и уровнем сахаров в лубе ствола такой корреляции не было обнаружено. Эти данные согласуются с выдвинутым ранее предположением о резервной функции ПА, как дыхательного субстрата, при синтезе защитных веществ.

О протекторной функции лигнина свидетельствует отрицательная корреляция между содержанием лигнина и размером некроза во флоэме ствола ели после инокуляции *Ophiostoma* sp. (рис. 19).

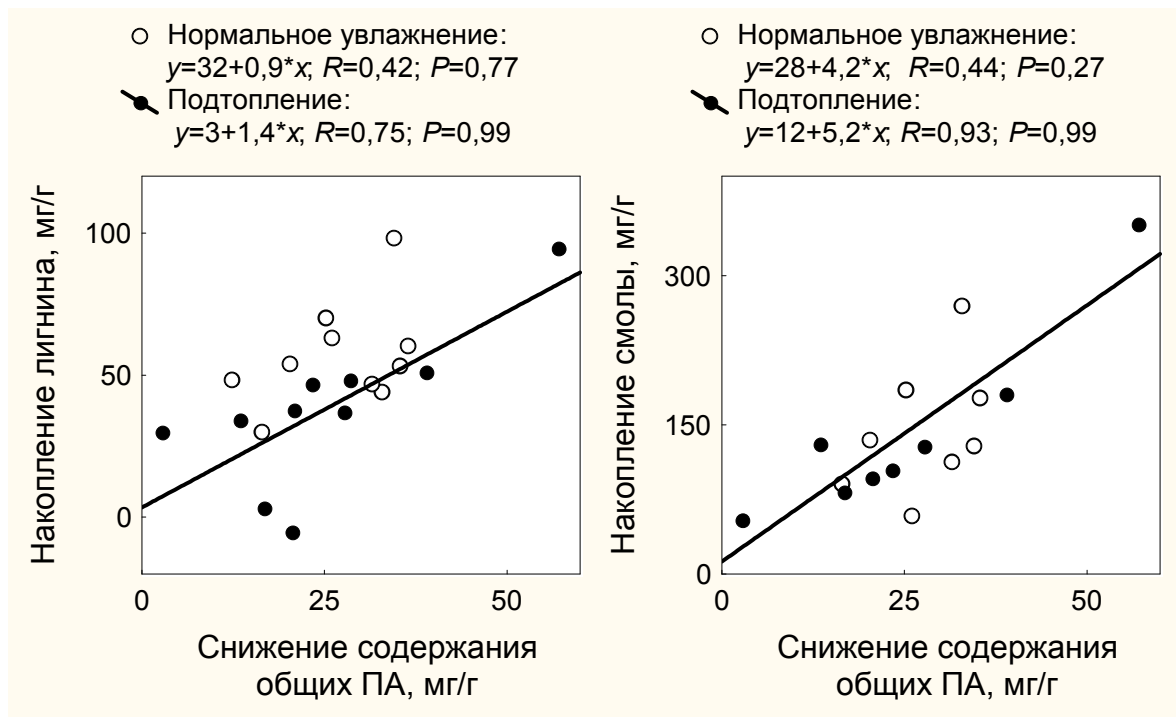


Рис. 18. Накопление лигнина и смолы в связи со снижением содержания общих ПА через 12 суток после инфицирования флоэмы ели сибирской грибом *Ophiostoma sp.* при разном увлажнении почвы. По осям указана разность между содержанием вещества во флоэме до и после инфицирования.

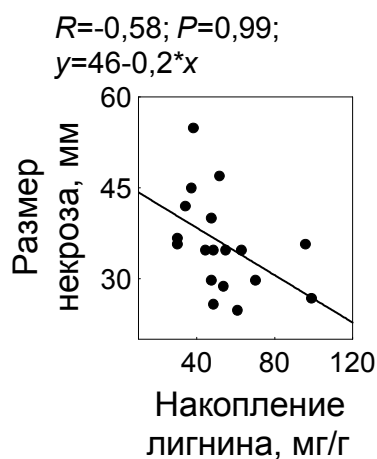


Рис. 19. Размер некроза в связи с накоплением лигнина во флоэме ствола ели сибирской через 12 суток после инокуляции грибом *Ophiostoma sp.*

В хроническом очаге лиственничной чехликовой моли (чехлоноски) *Coleophora sibiricella* Falk. (*Lepidoptera*; *Coleophoridae*) было проведено сравнение параметров реакции флоэмы ствола на действие мицелия и экстракта офиостомового гриба *C. laricicola* у контрольных неповрежденных деревьев лиственницы сибирской и деревьев, подверженных хронической частичной дефолиации чехлоноской (табл. 5).

Изменение содержания общих ПА в зоне реакции флоэмы ствола на действие офиостомовых грибов и их метаболитов у лиственницы в очаге отличалось от такового у деревьев вне очага (рис. 7, табл. 5). Неповрежденный древостой характеризовался снижением ПА во флоэме ствола после действия на нее грибного агента – мицелия или его экстрактивных веществ. В отличие от этого, у лиственниц в очаге зарегистрировано накопление ПА, индуцированное действием на флоэму офиостомового гриба и его экстракта, что, вероятно, является проявлением стрессированности лиственницы в очаге насекомого-вредителя.

Действие биотического фактора (повреждение хвои лиственницы чехлоноской) активизирует защитные механизмы в неповрежденных тканях дерева. В пользу системной устойчивости деревьев свидетельствуют исходно высокое содержание дубильных веществ в тканях флоэмы ствола, активизация накопления лигнина в зоне защитной реакции флоэмы ствола на действие грибных инокулятов (табл. 5), а также высокая устойчивость таких деревьев к стволовым вредителям, известная по литературным данным (Плешанов, 1982).

Таблица 5. Характеристика реакции флоэмы ствола лиственницы сибирской на инокуляцию мицелия и экстракта гриба *C. laricicola* в хроническом очаге лиственничной чехликовой моли *C. sibiricella* у деревьев, без признаков повреждения и частично дефолиированных вредителем

Вариант опыта	Время после начала опыта, сут	Состояние деревьев	
		неповрежденные	хвоя повреждена молью
Величина некроза, мм			
Мицелий <i>C. laricicola</i>	14	38,3±3,2 А	41,7±2,0 А
Общие ПА, мг/г сухой массы образца			
Контроль	0	114±5 аА	147±5 аВ
Экстракт <i>C. laricicola</i>	7	125±5 аА	154±6 аА
»	14	157±11 abA	150±5 аА
Мицелий <i>C. laricicola</i>	7	124±5 аА	148±8 аА
»	14	146±4 bA	167±6 аА
Лигнин, мг/г сухой массы неэкстрагируемого остатка			
Контроль	0	133±5 аА	117±3 аВ
Экстракт <i>C. laricicola</i>	7	147±9 bA	135±4 bA
»	14	132±4 abA	159±9 сВ
Мицелий <i>C. laricicola</i>	7	142±7 bA	140±5 bA
»	14	128±4 abA	155±8 bВ
Удельная масса инфицированной флоэмы, мг/см ² камбия			
Контроль	0	73,8±6,6 аА	96,3±10,1 аА
Экстракт <i>C. laricicola</i>	7	74,8±4,1 аА	76,4±5,6 аА
»	14	77,1±7,1 аА	55,9±4,6 bВ
Мицелий <i>C. laricicola</i>	7	74,8±5,0 аА	80,4±8,6 аА
»	14	74,3±3,0 аА	51,6±5,2 bВ

Примечание. Приведены средние значения для 7 деревьев и их ошибки. Для каждого параметра одинаковыми буквами отмечены средние значения, достоверно не отличающиеся друг от друга по критерию Вилкоксона ($P > 0,95$) внутри столбцов (строчные буквы – а, b, с) и внутри строк (заглавные буквы – А, В). Для расчета удельной массы инфицированной флоэмы массу образца луба делили на его площадь.

Дефолиированные деревья отличаются от контрольных 2-кратным снижением массы флоэмы в зоне реакции (табл. 5). Это вызвано, вероятно, истощением ресурсов, которые снижаются после повреждения чехлоносской хвои, нарушения работы фотосинтетического аппарата и ослабления транспорта ассимилятов в зону повреждения ствола.

Содержание лигнина и дубильных веществ в зоне ответа флоэмы на действие живого мицелия изменялось аналогично изменению этих фенольных соединений при действии грибных экстрактивных веществ. Дефолиация одинаковым образом изменяет характер реакции в этих двух вариантах опыта с разными грибными индукторами – мицелием и грибным экстрактом. Результаты подтверждают элиситорную активность грибного экстракта, а также влияние стрессового биотического фактора (дефолиации) на параметры иммунного ответа флоэмы ствола.

Глава 6. Иммунодиагностика состояния сосняков на ранней стадии снижения устойчивости при техногенном и пирогенном повреждении

В пригородных сосняках близкого возраста на постоянных пробных площадях проводили многолетние наблюдения – ежегодную регистрацию параметров защитной реакции флоэмы ствола выбранных деревьев на инъекцию раствора с экстрактом мицелия офиостомового гриба для ранней диагностики состояния древостоев. Предварительно

было показано, что некроз луба, вызванный действием грибного экстракта, возрастал при увеличении диаметра деревьев (рис. 20), что, вероятно, обусловлено снижением защитных функций у деревьев с более интенсивным ростом. В связи с этим на каждой ПП размер некроза измеряли у 20-25 случайно выбранных деревьев, что позволяло учесть деревья разной толщины. Длина некроза зависела от возраста ($F=23,3$ и $p=0,0001$), поэтому иммунодиагностика осуществляется на ПП 1-4,7 в древостоях близкого возраста (в средневозрастных сосняках – 60-70 лет), различающихся по экологической ситуации – техногенному загрязнению и повреждению низовым пожаром (табл. 2).

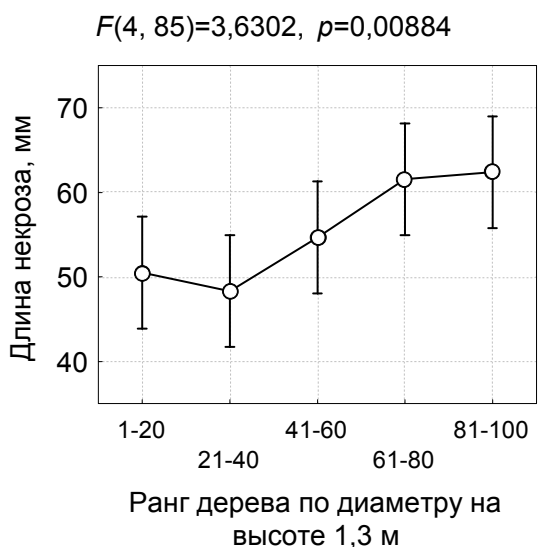


Рис. 20. Длина некроза флоэмы после инокуляции ствола 0,5 мг экстракта *C. laricicola* в связи с рангом дерева по диаметру (на высоте 1,3 м) в средневозрастных сосняках.

Категория состояния деревьев, визуально оцениваемая по 6-балльной шкале Санитарных правил РФ (1998), достоверно (на 5%-ном уровне) не различалась в загрязненных и фоновых древостоях весь период 8-летних наблюдений (рис. 21, приведены данные для средневозрастных древостоев на ПП 1-4,7).

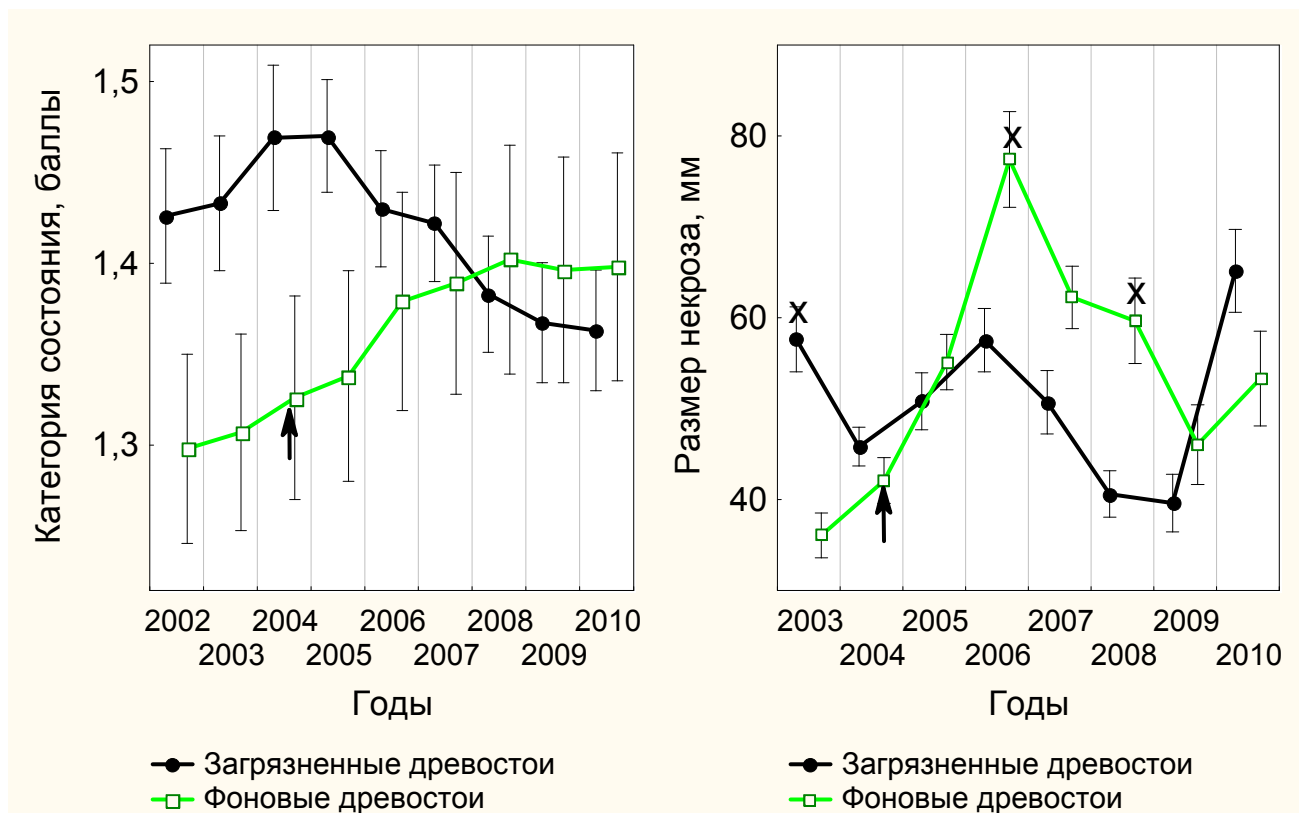


Рис. 21. Категория состояния и размер некроза в лубе через 4 недели после внесения 0,5 мг экстракта гриба *C. laricicola* в проводящие ткани ствола сосны на ПП в средневозрастных сосняках. "X" отмечены значения, различающиеся в фоновых (ПП 3-4) и загрязненных (ПП 1, 2, 7) древостоях ($P>0,95$), стрелкой – действие пожара. Указаны средние и ошибки. Средние значения рассчитаны, как средневзвешенные по объему стволов. Категорию состояния оценивали у всех деревьев (по 200-300 деревьев на ПП), размер некроза – у 20-25 деревьев на каждой ПП.

Отмечен тренд к улучшению категории состояния в загрязненных древостоях и, напротив, к ее ухудшению в фоновых насаждениях. Согласно 6-балльной шкале к I категории относят деревья без признаков ослабления, II – ослабленные, III – сильно ослабленные, IV – усыхающие, V – усохшие в текущем году, (свежий сухостой), VI – старый сухостой.

В 2003 г. некроз флоэмы в фоновых древостоях был существенно меньше, чем некроз в загрязненных сосняках, в 2004-2005 гг. различия не достоверны, в 2006-2008 гг. некроз в фоновых сосняках был больше, чем в загрязненных (рис. 21), В 2009 г. – величина некрозов не различалась, в 2010 г. соотношение размера некроза вернулось к исходному, наблюдаемому в начале мониторинга в 2003 г. Причиной снижения активности индуцированной реакции (увеличения размера некроза) в фоновых древостоях, явился, очевидно, низовой пожар весной 2004 г. (рис. 3).

После пожара был зарегистрирован 2-летний период достоверного увеличения некроза и его «смещения» вверх по стволу относительно раневого отверстия (рис. 1, 22). Для послепожарной реабилитации древостоя – восстановления этих некротических показателей до прежнего уровня – понадобился 4-5-летний период.

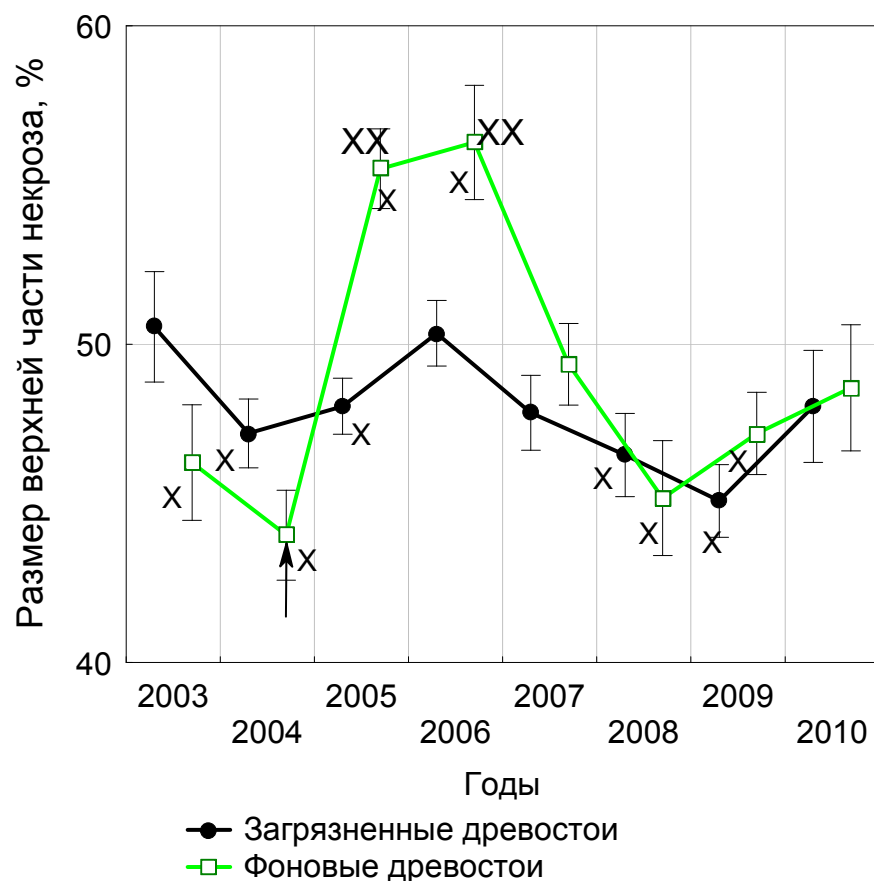


Рис. 22. Размер верхней части некроза (в % от всего размера) в лубе через 4 недели после внесения 0,5 мг экстракта гриба *C. laricicola* в проводящие ткани ствола сосны на ПП в сосняках. Знаками "XX" отмечены значения, различающиеся в фоновых (ПП 3-4) и загрязненных (ПП 1, 2, 7) древостоях ($P>0,95$), "x" – отличия размера верхней и нижней части некроза ($P>0,95$), стрелкой – действие низового пожара. Указаны средние и ошибки, рассчитанные по "смещению" некроза у 20-25 деревьев на каждой ПП.

Увеличение некроза и «дрейф» зоны некроза вверх по стволу, по-видимому, обусловлены, нарушением нормального нисходящего транспорта ассимилятов по стволу, ведущим к ослаблению индуцированной защиты. Корреляция между величиной некроза и его смещением вверх по стволу подтверждает это предположение (рис. 23). Транспорт ассимилятов в крону может быть вызван повреждением хвои горячим воздухом и необходимостью ее регенерации. После ослабления лиственницы низовым пожаром отмечено достоверное двукратное перераспределение сахарозы из нижней части ствола в верхнюю ($P>0,95$) (Гирс, 1967).

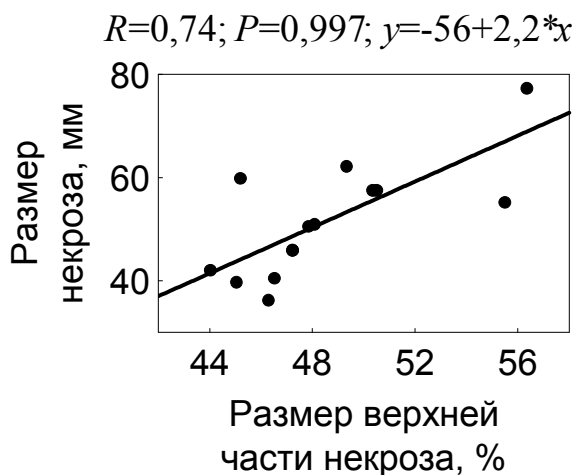


Рис. 23. Корреляция между длиной некроза флоэмы (через 4 недели после инокуляции ствола экстрактом *C. laricicola*) и размером верхней части некроза, выраженным в процентах, у деревьев сосны обыкновенной.

В случае более коротких некрозов, отмеченных в загрязненном древостое в 2006 г., исходное содержание лигнина, а также активность накопления связанных ПА согласно результатам факторного дисперсионного анализа, были достоверно выше по сравнению с фоновыми параметрами ($P>0,95$), что доказывает протекторную функцию этих соединений (рис. 24).

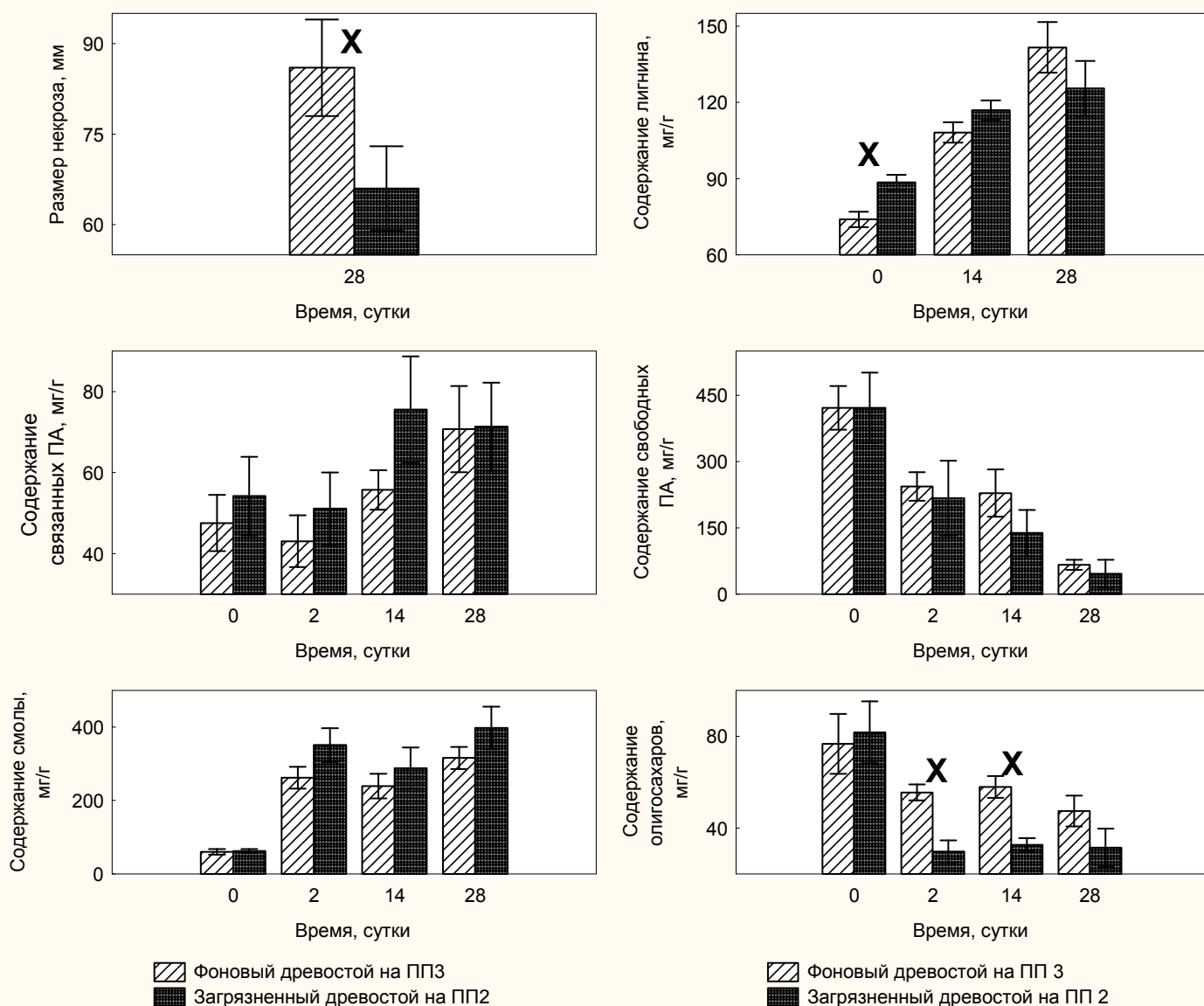


Рис. 24. Величина некроза и динамика биохимических параметров в зоне реакции луба после инокуляции ствола сосны обыкновенной 0,5 мг экстракта из мицелия *C. laricicola* в сосняках разной степени загрязнения в 2006 г. Указаны средние и ошибки для 7 средних деревьев. «X» отмечены достоверные различия в фоновом и загрязненном древостоях при $P>0,95$ по *t*-критерию.

Высокая концентрация лигнина, отмеченная в начале опыта (0 суток) в сосняке, испытывающем стресс техногенной нагрузки, указывает на высокий уровень конститутивной устойчивости в этом древостое, а более активное накопление связанных ПА и смолы – на активную индуцированную устойчивость древостоя по сравнению с фоновым сосняком. В то же время динамика сахаров свидетельствует о дефиците энергетических ресурсов в тканях загрязненных деревьев. Если в начале опыта содержание сахаров существенно не различалось у деревьев, то уже через 2 суток после инъектирования грибного экстракта отмечено достоверное уменьшение сахаров в лубе загрязненных деревьев по сравнению с фоном. Через 14 и 28 суток такое различие динамики сахаров сохранялось. Это согласуется с эффектом снижения годичного прироста луба деревьев при загрязнении.

Таким образом, характеристики иммунного ответа флоэмы ствола отражают изменение физиологического состояния деревьев при действии экологических факторов. Параметры сверхчувствительной некротической реакции в лубе, вызванной действием грибного экстракта, оказались более чувствительными характеристиками по сравнению с баллом категории состояния и таксационными показателями. При этом информативны не только биохимические, но и визуально определяемые характеристики иммунитета – величина и "смещение" локального некроза ствольной флоэмы, вызванного действием грибного экстракта.

Выводы

1. Неспецифичность иммунной реакции хвойных на инокуляцию ствола офиостомовыми грибами, различающимися по специализации к хвойному растению и насекомому-переносчику, проявляется в сверхчувствительной некротической реакции инфицированных клеток флоэмы, накоплении в ней лигнина, связанной формы конденсированных дубильных веществ, смолистых веществ, формировании перидермы, разделяющей некроз и живые ткани.
2. Нарушение защитной трансформации клеточных стенок флоэмы метаболитами офиостомового гриба, инокулированного в проводящие ткани ствола, обуславливает агрессивность патогена – его способность вызывать некрозы большего размера по сравнению с менее агрессивными грибами.
3. Увеличение содержания связанной формы ПА и *n*-оксибензойной кислоты в тканях хвойных, вызванное действием элиситоров офиостомового гриба, указывает на участие этих фенольных соединений, подобно лигнину, в защитной трансформации растительной клеточной стенки.
4. Данные свидетельствуют о резервной функции свободных ПА – их расходовании во время синтеза лигнина и смолистых веществ в зоне защитной реакции флоэмы на действие грибных метаболитов в условиях пониженного содержания низкомолекулярных сахаров. Вместе с тем, наряду с катаболическими процессами, грибные элиситоры включают в растительной ткани синтез ПА.
5. Активность накопления *n*-оксибензойной кислоты на ранней стадии защитной реакции, вызванной действием метаболитов офиостомового гриба, во много раз выше по сравнению с полифенольными соединениями (лигнином и ПА). В этом случае накопление *n*-оксибензойной кислоты, вероятно, обеспечивается резервными фондами хинной и шикимовой кислоты, характерными для хвойных.
6. Зарегистрированный эффект ингибирования метаболитами офиостомового гриба ранней стадии лигнификации стенок ситовидных клеток флоэмы, вызванной ее механическим поранением, позволил предложить гипотезу о причине возникновения ассоциации "насекомые-ксилофаги – офиостомовые грибы", согласно которой подавление

фитоиммунитета грибными супрессорами является выгодным для обоих партнеров короедно-грибного комплекса и содействует их поселению в тканях хвойных.

7. Результаты указывают на двоякое действие метаболитов офиостомового гриба – элиситацию и супрессию фитозащиты, что не противоречит природе взаимоотношения растения-хозяина и паразита. Стратегия первого направлена на распознавание грибных элиситоров и включение защитных процессов, в том числе синтез лигнина, а второго – на преодоление фитозащиты, что проявляется в ингибировании раннего этапа лигнификации.

8. Стрессовое воздействие экологического фактора, снижающее устойчивость хвойных деревьев к офиостомовым грибам, характеризуется снижением активности защитных процессов в зоне ответа флоэмы на вторжение патогена (накопление лигнина, связанных ПА, смолистых веществ), следствием чего является увеличение размера сверхчувствительного некроза флоэмы ствола.

9. Нарушение защитного ответа флоэмы ствола хвойных на действие метаболитов офиостомового гриба может рассматриваться как индикатор для прогнозирования вспышек массового размножения насекомых-ксилофагов.

10. Характеристики флоэмы в зоне ответа на инъекцию экстракта из мицелия офиостомового гриба в проводящие ткани ствола позволяют регистрировать изменения физиологического состояния хвойных древостоев в изменяющейся экологической ситуации на ранних стадиях при отсутствии визуальных признаков ослабления деревьев.

Основные публикации по теме диссертации

Монографии

1. Иммунная реакция хвойных пород Сибири / Г.Г. Полякова, В.И. Поляков, Н.В. Пашенова, И.В. Шеин, В.П. Ветрова, В.В. Стасова, Г.К. Зражевская, О.Н. Зубарева; отв. ред. Г.Ф. Антонова. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008. 110 с.

Статьи в рецензируемых журналах, соответствующих списку ВАК

2. Полякова Г.Г., Ветрова В.П., Пашенова Н.В., Осипов В.И. Участие проантоцианидинов и лигнина в защитной реакции пихты на инфицирование микромицетами // Физиология растений. 1995. Т. 42. № 4. С.622-628.

3. Ветрова В.П., Полякова Г.Г., Пашенова Н.В., Осипов В.И. Защитная реакция на инфекцию – индикатор устойчивости пихты сибирской к черному пихтовому усачу и связанным с ним микромицетам // Лесоведение. 1995. № 6. С.34-42.

4. Ветрова В.П., Матренина Р.М., Полякова Г.Г., Пашенова Н.В. Метаболиты патогенных деревоокрашивающих микромицетов как индукторы защитных реакций хвойных // Микология и фитопатология. 1995. Т. 29. Вып. 2. С.33-38.

5. Полякова Г.Г., Ветрова В.П., Пашенова Н.В. Снижение активности противомикробной защиты ели при подтоплении // Лесоведение. 2000. № 2. С. 23-29.

6. Шеин И.В., Полякова Г.Г., Зражевская Г.К., Пашенова Н.В., Ветрова В.П. Накопление фенольных соединений каллусными культурами хвойных как реакция на грибы синевы древесины // Физиология растений. 2001. Т.48. № 2. С. 251-256.

7. Полякова Г.Г. Физиологические механизмы противомикробной защиты пихты // Лесоведение. 2002. № 4. С. 25-30.

8. Шеин И.В., Шибистова О.Б., Зражевская Г.К., Астраханцева Н.Г., Полякова Г.Г. Содержание фенольных соединений и активность ключевых ферментов их синтеза в гипокотиле сосны обыкновенной при фузариозе // Физиология растений. 2003. Т.50. №4. С.581-586.

9. Шеин И.В., Андреева О.Н., Полякова Г.Г., Зражевская Г.К. Изменение содержания фенольных соединений в каллусе сосны в ответ на элиситацию *Fusarium* разной степени патогенности // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 5. С. 710-715.

10. Поляков В.И., Полякова Г.Г., Пашенова Н.В., Стасова В.В. Применение грибных метаболитов для оценки состояния сосновых древостоев в условиях промышленного загрязнения // Известия РАН. Сер. биол. 2005. №4. С.506-512.

11. Полякова Г.Г., Пашенова Н.В., Поляков В.И., Зражевская Г.К. Индуцирование иммунной реакции хвойных метаболитами фитопатогенных грибов // Физиология растений. 2008. Т. 55. №4. С. 496-502.

12. Пашенова Н.В., Полякова Г.Г., Афанасова Е.Н. Изучение грибов синевы древесины в хвойных лесах Центральной Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2009. Т.26. №1. С. 22-28.

13. Полякова Г.Г., Стасова В.В., Пашенова Н.В. Защитная реакция флоэмы ствола сосны на поранение и действие экстракта из мицелия *Ceratocystis laricicola* // Физиология растений. 2011. Т. 58. №5. С. 702-710.

Другие публикации в рецензируемых журналах, соответствующих списку ВАК

14. Полякова Г.Г., Пашенова Н.В., Поляков В.И., Стасова В.В. Иммунный метод изучения состояния сосновых древостоев // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. №1. С. 97-98.

15. Пашенова Н.В., Полякова Г.Г. Коллекция культур деревоокрашивающих грибов, связанных со стволовыми вредителями хвойных пород // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. №1. С. 45-46.

16. Полякова Г.Г., Кукина Т.П., Пашенова Н.В., Сальникова О.И., Стасова В.В. Применение мицелиальных экстрактов для изучения механизмов устойчивости хвойных к офиостомовым грибам // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. №1. С. 124.

Статьи в рецензируемых иностранных журналах

17. Polyakova G.G., Polyakov V.I., Pashenova N.V., Stasova V.V., Zubareva O.N., Skripal'shichova L.N. Physiological method for evaluation of vigor state of pine stands // Eurasian J. For. Res. 2010. 13. N1. P. 19-24.

Материалы докладов международных конференций

18. Vetrova V.P., Polyakova G.G., Matrenina R.M., Pashenova N.V., Osipov V.I. Accumulation of condensed tannins and lignin in fir and larch phloem induced by blue-stain fungi and their elicitors // Bark Beetles, Blue-stain Fungi, and Conifer Defence Systems. Int.Symp. Norway. 1995. P. 18-19.

19. Pashenova N.V., Vetrova V.P., Polyakova G.G. Tolerance of blue-stain fungi to plant defensive chemicals // 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.261-274.

20. Polyakova G.G., Pashenova N.V., Vetrova V.P., Stasova V.V., Zrazevskaya G.K., Shein I.V., Konstantinov M.Yu. Perspectives of using blue-stain fungi for assessment of conifer tree vigor and resistance to insects-vectors and associated pathogens. In: "New Horizon of Bioscience in Forest Products Field"/ Proceedings of The 2rd Int. Symp. Korea. Cheongju. Chungbuk National University. 2000. P. 26-42.