

PIOTR KAROLEWSKI, ANDRZEJ M. JAGODZIŃSKI

Udział węgla w związkach obronnych przed czynnikami biotycznymi u roślin drzewiastych*

Share of carbon in defense compounds against biotic factors in woody plants

ABSTRACT

Karolewski P., Jagodziński A. M. 2013. Udział węgla w związkach obronnych przed czynnikami biotycznymi u roślin drzewiastych. Sylwan 157 (11): 831-841.

In addition to physical defenses, chemical defenses are the most effective way to protect plants from adverse biotic factors (phytophagous insects, other herbivores and pathogenic fungi). This requires extra effort from plants to produce secondary defense metabolites at the expense of production of primary metabolites directly linked to the growth and development of plants. There are three main groups of defensive compounds (alkaloids, phenolic compounds and terpenoids). All defensive compounds are rich in carbon. Depending on the chemical formula, carbon makes up from about 40% to over 85% of the molecular weight of various defense compounds. It is not possible to calculate the total carbon mass accumulation in all defense compounds. In this paper we discuss the content of defensive compounds and carbon with respect to defense strategy of plants, functional groups of woody species (coniferous and deciduous trees), tree species, tree biomass components (leaves, branches, bark, roots, etc.) and many other internal (age of trees, age of leaves, stage of development, origin, etc.) as well as external factors, related to soil and climatic conditions.

KEY WORDS

carbon concentration, defense compounds, woody plants, trees, biotic factors, review

ADDRESSES

Piotr Karolewski ⁽¹⁾ – e-mail: pkarolew@man.poznan.pl

Andrzej M. Jagodziński ^(1, 2) – e-mail: amj@man.poznan.pl

⁽¹⁾ Instytut Dendrologii PAN; ul. Parkowa 5; 62-035 Kórnik

⁽²⁾ Katedra Łowiectwa i Ochrony Lasu; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71d; 60-625 Poznań

Wstęp

Znaczącym rezerwuarem węgla (C) i jego związków na Ziemi jest biomasa roślin, w tym biomasa lasów [Jagodziński i in. 2012]. Węgiel, obok wodoru i tlenu, stanowi główny pierwiastek wchodzący w skład związków organicznych syntetyzowanych przez rośliny. Część materii roślinnej zostaje zjadana przez roślinożerców, jest wykorzystywana przez patogeniczne grzyby, bakterie i mikroorganizmy. W toku ewolucji rośliny wypracowały mechanizmy obronne przed wpływem czynników biotycznych. Najogólniej obronę roślin można podzielić na fizyczną i chemiczną. W pierwszym przypadku związane jest to z występowaniem na powierzchni roślin i liści twardych i ostrych struktur utrudniających ich konsumowanie lub poruszanie się roślinożerców, takich jak

* Praca powstała w ramach projektu badawczego pt. „Bilans węgla w biomacie drzew głównych gatunków lasotwórczych Polski” finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych w Warszawie (2007-2011).

ciernie, kolce i włoski [Agraval, Fishbein 2006; Hanley i in. 2007] oraz gruba i twarda epiderma [Dominy i in. 2003]. Natomiast obrona chemiczna opiera się na wytwarzaniu w tkankach roślin substancji odstrasżających (zapachowo i smakowo), utrudniających trawienie, zaburzących rozwój i toksycznych dla roślinożerców oraz patogenicznych grzybów. Analiza uwzględniająca najnowsze wyniki prac na ten temat wykazała, że nie ma żadnej innej cechy roślin, która byłaby tak silnie związana z ich odpornością na zgryzanie i pozwalała przewidywać stopień podatności na roślinożerców, jak stężenie wtórnych metabolitów [Carmona i in. 2011].

Celem tej pracy jest ukazanie, jak znacząco dużo inwestują drzewa, w tym głównych gatunków lasotwórczych, w węglowe związki obronne, co odbywa się kosztem ich wzrostu i rozwoju. Przedstawiono także różnorodność oraz relacje jakościowe i ilościowe tych związków u drzew w zależności od gatunku, czynników wewnętrznych (pochodzenie, wiek, komponent biomasy drzewa) oraz zewnętrznych, w tym biotycznych i abiotycznych. Opisano również możliwości oszacowania udziału masy węgla w tego typu związkach i w tkankach drzew.

Związki obronne

Momentem uznania, że związki wtórnego metabolizmu nie są substancjami balastowymi, było stwierdzenie możliwości ich wpływu na zachowania żywieniowe owadów przez Fraenkela [1959] oraz Ehrlicha i Ravena [1964]. Aktualnie wiadomo, że znaczna część wtórnych metabolitów pełni funkcje ochraniające przed niekorzystnym wpływem owadów roślinożernych [Kaplan i in. 2008; Carmona i in. 2011], patogenicznych grzybów [Kozłowska 1994; Przybył i in. 2008] i bakterii [Scalbert 1991; Cowan 1999]. Wyróżnia się trzy szlaki metabolizmu wtórnego: terpenoidowy, azotowy i fenolowy [Harborne 1997].

Terpenoidy są to utlenione pochodne terpenów – związków, których wspólnym elementem jest szkielet izoprenowy. Są one składnikami olejków eterycznych, żywic i saponin, a politerpeny znane są jako kauczuk i gutaperka. Ich synteza i przemiany zostały szczegółowo opisane przez Kączkowskiego [1985]. Terpenoidy odgrywają znaczącą rolę w odporności roślin przed roślinożercami [Jason i in. 2005; Keeling, Bohlmann 2006], szczególnie roślin iglastych [Zulak, Bohlmann 2010]. Obok terpenoidów, najczęściej wykorzystywanym wskaźnikiem odporności roślin na wpływ czynników biotycznych jest poziom związków fenolowych [Honkanen i in. 1999; Stevens, Lindroth 2005].

W przypadku fenoli do związków obronnych przed roślinożercami zaliczane są niskocząsteczkowe fenole, głównie kwasy fenolowe, skondensowane i hydrolizujące taniny, flawonoidy oraz wysokocząsteczkowe polifenole [Bernays 1981; Salminen, Karonen 2011]. Kwasy fenolowe, których najprostszym przykładem jest kwas hydroksybenzoesowy, posiadają w swojej budowie grupę karboksylową (–COOH). Najpowszechniej występującymi u roślin związkami fenolowymi z tej grupy są: kwas chlorogenowy, kawowy i galusowy. Proste fenole są składnikami wypełniającymi ligniny. Natomiast takie fenole jak kwas p-kumarowy, kofeinowy, ferulowy i synapinowy są prekursorami bardziej złożonych związków fenolowych: estrów kwasu cynamonowego, kumaryn i flawonoidów oraz lignin. Związki fenolowe chronią przed fitofagami liście [Lokvam, Kursar 2005], łodygi [Harding i in. 2009] i korzenie [Rasmann i in. 2011]. Zidentyfikowana liczba ich struktur wynosi około 200. Do liczniejszej grupy należą flawonoidy. Spośród około 8000 flawonoidów połowa odgrywa istotną rolę w oddziaływaniach roślina-roślinożerca. W znacznie mniejszej liczbie występują, będące w równowadze z utlenioną formą fenoli – chinony (około 800). Fenole w roślinach powstają głównie przez szlak kwasu szikimowego, związany z katabolizmem cukrów, gdzie syntetyzowane są między innymi: kwas hydroksycynamonowy i kumaryny.

Flawonoidy, mimo że są także stosunkowo prostymi związkami fenolowymi, to jednak są już polimerami (polifenolami). Zbudowane są z dwóch pierścieni aromatycznych z grupami hydroksylowymi, połączonymi z heterocyklicznym pierścieniem piranu. Flawonoidy są barwnymi składnikami kwiatów i owoców, a także stanowią elementy strukturalne bardziej złożonych związków fenolowych – garbników. Flawonoidy występują w postaci wolnej (antocyjanidyny) i związanej w postaci estrów metoksylowych lub z cukrami w formie glikozydów (antocyjanów – czerwonych i niebieskich barwników roślinnych). Pod względem budowy chemicznej flawonoidy dzielimy na flawonole, flawony, flawanony, flawanole, izoflawony, katechiny i antocyjanidyny.

Fenole tworzą także bardziej złożone, wysokocząsteczkowe struktury, które ogólnie można podzielić na dwie grupy: taniny (garbniki) i ligniny. Z racji znaczącej roli w obronie roślin przed roślinożercami na szczególną uwagę zasługują taniny [Salminen, Karonen 2011]. Występują one w liściach, łodygach, korzeniach i drewnie, a u niektórych gatunków, szczególnie w dużym stężeniu w korze i owocach oraz w galasach. Ogólnie taniny dzieli się na hydrolizujące i niehydrolizujące (skondensowane, proantocyjanidyny). W centrum cząsteczki tanin hydrolizujących znajduje się monosacharyd lub inny polioliol, kwas szikimowy, chinowy, a nawet pektyna. Garbniki skondensowane są polimerami katechiny i jej izomerów oraz innych pochodnych flawanu. Taniny skondensowane nie są połączone z jednostkami cukrowymi i trudno ulegają hydrolizie. Wyróżnia się też trzecią grupę – tanin katechinowych, które mają charakterystyczny dla tanin skondensowanych szkielet węglowy i nie zawierają reszt cukrowych [Pleszczyńska, Szczodrak 2005].

Znaczącą funkcję polifenoli odgrywiają ligniny. Zbudowane są one z reszt trzech alkoholi: kumarowego, synapinowego i koniferylowego. W przypadku drzew iglastych ostatni z wymienionych alkoholi stanowi znaczącą część, a u niektórych gatunków jest niemal jedynym składnikiem tych związków. Ligniny są podstawowym materiałem budulcowym ścian komórkowych, a przez ścisłe związanie z celulozą tworzą z nią jednorodną warstwę, co nadaje strukturze dużą wytrzymałość mechaniczną. Pełnią one ochronną rolę w przeciwstawianiu się wpływowi niekorzystnych czynników biotycznych [Bennett, Wallsgrave 1994]. Wysoka zawartość lignin w liściach decyduje o ich dużej, konstytutywnej odporności [Clancy, Price 1987; Poorter i in. 2004]. Ligniny biorą też udział w odporności indukowanej, polegającej na tworzeniu tzw. barier ligninowych, utrudniających ekspansję patogenicznych grzybów i żerowanie owadów [Rengel i in. 1994; Glazener 1982; Bruce, West 1989].

Poza terpenoidami i związkami fenolowymi, trzecią klasą wtórnych metabolitów, ważnych ze względu na właściwości ochraniające rośliny przed roślinożercami, są związki azotowe. Należą do nich niektóre aminy, aminokwasy niebiałkowe, glikozydy cyjanogenne oraz glukozynolany, a przede wszystkim alkaloidy. Są to związki odstraszające i zniechęcające roślinożerców ze względu na gorzki smak, a w większości są także trujące. Największą grupę z tej klasy związków stanowią alkaloidy, których liczbę szacuje się na około 10 000. Należy zauważyć, że mimo nazwy „azotowe” są to związki, w budowie których udział węgla nie jest mniejszy niż u wcześniej wymienionych klas węglowych związków obronnych.

Koszty obrony chemicznej u roślin

Podobnie jak wytworzenie wspomnianych już wyżej struktur utrudniających żerowanie roślinożercom wymaga nakładów ze strony roślin, tak też kosztowna jest dla nich produkcja wtórnych metabolitów obronnych. Wymaga to tak wydatkowania energii, jak i inwestowania części węgla pobieranego w postaci CO₂ w związki niezwiązane bezpośrednio ze wzrostem i rozwojem roślin.

Jak podają Gulmon i Mooney [1986; za Harborne 1997], na wyprodukowanie 1 g związków fenolowych zużywane jest około 2,5 g fotosyntetycznego CO₂, a koszt syntezy alkaloidów jest jeszcze dwukrotnie wyższy (około 5 g). W dodatku przy deficycie azotu w glebie może to odbywać się kosztem innych związków (aminokwasów i białek). W efekcie część węgla w każdym z komponentów roślin (liściach, łodygach, korze, korzeniach itp.) lokowana jest w związki obronne, a nie w materiały budulcowe i zapasowe.

Chemiczna obrona roślin wymaga znacznych nakładów, co odbywa się kosztem ich wzrostu i rozwoju. Dlatego też znaczna część badań nawiązuje do hipotezy równowagi wzrostowo-różnicującej (ang. growth-differentiation balance) i reguły „coś za coś” (ang. trade-off). W myśl takiego podejścia różnicowanie rozumiane jest jako zwiększona produkcja wtórnych metabolitów obronnych, kosztem inwestowania w metabolity pierwotne, związane bezpośrednio ze wzrostem i rozwojem roślin [Agrawal 2006; Barton, Koricheva 2010]. Ogólnie dzieli się gatunki roślin na charakteryzujące się dużym i intensywnym wzrostem, ale w niedużym stopniu inwestujące w obronę chemiczną, i rośliny o niedużym i wolnym wzroście, ale inwestujące w metabolity wtórne na poziomie zapewniającym im skuteczną ochronę przed roślinożercami. Na ogół u roślin preferowany jest tylko jeden z typów związków: alkaloidów, związków fenolowych lub terpenoidów. Na przykład głównymi związkami obronnymi liści dębów są skondensowane taniny [Forkner i in. 2004], natomiast u drzew iglastych – terpenoidy [Manninen i in. 1998].

Koszty obrony chemicznej zależą od rodzaju odporności i strategii obronnej roślin. Na ogół rośliny rosnące w wolnym tempie, niewytwarzające nowych liści i elementów strukturalnych utrudniających żerowanie, utrzymują stały i wysoki poziom metabolitów obronnych [Koricheva i in. 2004; Kaplan i in. 2008]. Mówimy wówczas o dużej odporności konstytutywnej (statycznej). Odwrotnie jest w przypadku roślin, które szybko rosną i wytwarzają duże masy liści. U takich roślin nawet duży uszczerbek masy liściowej nie odbija się w znaczącym stopniu negatywnie na ich ogólnym wzroście. Rośliny reprezentujące ten typ strategii inwestują w metabolity obronne, ale dopiero w momencie żerowania roślinożerców lub działania innych szkodliwych czynników biotycznych [Karban, Myers 1989; Karban 2011]. Jest to tzw. odporność indukowana. Dobrym przykładem reprezentującym ten typ strategii jest olsza szara [Oleksyn i in. 1998]. Indukcja odporności może być natychmiastowa (RIR, ang. rapidly induced resistance) lub opóźniona (DIR, ang. delayed induced resistance) [Haukioja 1990]. Opóźnienie może następować w zgryzionych liściach, a także w młodych, nowo powstałych liściach, lub ujawniać się dopiero w kolejnym sezonie wegetacyjnym [Kainulainen i in. 1998; Metlen i in. 2009].

Inną formą obrony jest pozbywanie się zaatakowanych liści przez szybsze ich zrzucanie [Giertych i in. 2006]. Nie zawsze rośliny, inwestując w obronę chemiczną lub we wzrost, są w stanie przeciwstawić się inwazji szkodników i jedną z możliwości przeżycia jest wyłącznie wytworzenie nowych liści [Leather, Lehti 1982]. Wymaga to od takich roślin ponownego inwestowania węgla w związki niezbędne do ich budowy i w substancje obronne.

Węglowe związki obronne u roślin drzewiastych

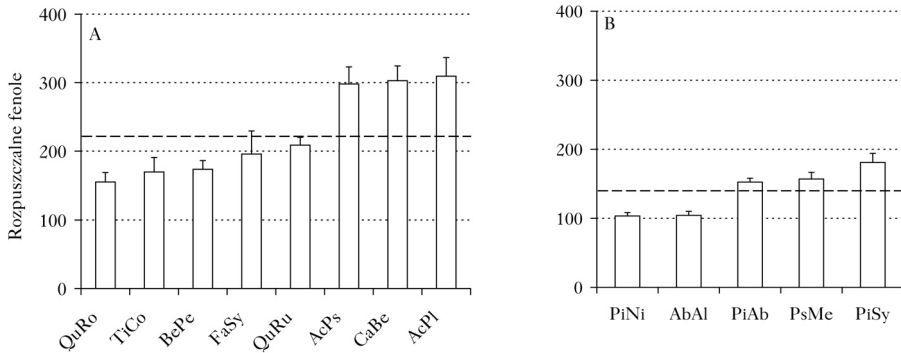
Wszystkie związki obronne z opisanych powyżej grup są bogate w węgiel. W zależności od budowy udział wagowy węgla wynosi w nich od około 40% do ponad 85%. Jednak trudno jest precyzyjnie oszacować ilość węgla ulokowanego ogółem w związkach obronnych. Na ogół określa się zawartości związków reprezentujących poszczególne grupy (rozpuszczalne i/lub związane fenole, flawonoidy, hydrolizujące i/lub skondensowane taniny, terpenoidy, alkaloidy itp.). Dla skwantyfikowania tych wielkości stosuje się pojedyncze substancje wzorcowe, będące związkami występującymi w przewodzie w danej grupie. Na przykład w ilościowym oznaczaniu

rozpuszczalnych i związanych fenoli jest to kwas chlorogenowy lub kawowy, w przypadku tanin – katechina lub kwas galusowy, flawonoidów – flawon, a antocyjanin – cyjanidyna. Jako wzorce stosuje się też ekstrakty związków obronnych, które są charakterystyczne, ale wyłącznie dla danych gatunków roślin [Forkner i in. 2004]. Obydwie te metody służą jedynie do względnego porównywania zawartości związków obronnych w tkankach roślinnych. Pozwalają one na bardzo przybliżone określenie zawartości substancji obronnych, a tym samym udziału węgla. W przypadku stosowania pojedynczych wzorców, mimo wspomnianej nieprecyzyjności, łatwo można obliczyć udział C w tych związkach. Na przykład średnia zawartość rozpuszczalnych związków fenolowych w igłach wynosi około 140 μM kwasu chlorogenowego/g suchej masy (s.m.; ryc. 1B). Przy uwzględnieniu masy molowej kwasu chlorogenowego – 354,31 g/M i udziału w nim masy C wynoszącego 54,2%, węgiel w tej grupie związków stanowi 2,69% s.m. igieł. W przypadku drzew liściastych udział węgla w związkach obronnych jest znacznie większy. Przy wzięciu za przykład wyników średnich dla gatunków drzew liściastych przedstawionych na rycinie 1A (225 μM/g s.m.), wynosi on już 4,32%. W liściach gatunków roślin silnie atakowanych przez foliofagi, na przykład czeremch, zawartość tanin dochodzi do 800 μM/g s.m. w przeliczeniu na katechinę [Karolewski i in. 2013]. Przy uwzględnieniu masy molowej tego związku – 101,11 g/M i udziału masy C w katechinie, który wynosi aż 87,2%, węgiel stanowi już 7,05% s.m. liści. Z ww. przykładowych obliczeń wynika, że w puli rozpuszczalnych fenoli i skondensowanych tanin, występujących w silnie zgrzyzionych przez foliofagi liściach czeremch, udział węgla wynosi około 10%. Udział [% s.m.] węgla w związkach obronnych można obliczyć ze wzoru:

$$C = A \times M \times C$$

gdzie:

- A – liczba moli substancji użytej jako wzorzec,
- M – masa cząsteczkowa wzorca,
- C – udział węgla w cząsteczce wzorca [%].



Ryc. 1.

Zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli (μM kwasu chlorogenowego/g suchej masy) w liściach

The content of total soluble phenolics (expressed on μM of chlorogenic acid/g dry weight) in leaves

A: *Quercus robur* (QuRo); *Tilia cordata* (TiCo); *Betula pendula* (BePe); *Fagus sylvatica* (FaSy); *Q. rubra* (QuRu); *Acer pseudoplatanus* (AcPs); *Carpinus betulus* (CaBe); *A. platanoides* (AcPl) oraz w igłach B: *Pinus nigra* (PiNi); *Abies alba* (AbAl); *Picea abies* (PiAb); *Pseudotsuga menziesii* (PsMe); *P. sylvestris* (PiSy). Liście i igły (średnie z trzech roczników) pochodziły z 30-letnich drzew (średnie z oświetlonej i zacienionej części korony). Gatunek istotnie różnicował zawartość fenoli u drzew liściastych i iglastych ($P < 0.05$). Przerywaną linią oznaczono wartości średnie dla drzew liściastych i iglastych, a pionowymi odcinkami wartości błędów standardowego (\pm SE).

A: *Quercus robur* (QuRo); *Tilia cordata* (TiCo); *Betula pendula* (BePe); *Fagus sylvatica* (FaSy); *Q. rubra* (QuRu); *Acer pseudoplatanus* (AcPs); *Carpinus betulus* (CaBe); *A. platanoides* (AcPl) and needles of B: *Pinus nigra* (PiNi); *Abies alba* (AbAl); *Picea abies* (PiAb); *Pseudotsuga menziesii* (PsMe); *P. sylvestris* (PiSy). Leaves and needles (mean for three cohorts) were harvested from 30-yr-old trees (mean for sun and shaded parts of the crown). TPh content in leaves and needles differed significantly among tree species studied ($P < 0.05$). Dashed line indicates mean values for deciduous and coniferous tree species, respectively; the vertical lines on each bar show standard errors (\pm SE).

W podobny sposób można obliczyć udział masy węgla w przypadku stosowania jako wzorca: kwasu kawowego (M=180,16; C=53,29%), kwasu galusowego (M=170,12; C=49,38%), flawonu (M=222,24; C=80,99%), cyjanidyny (M=287,24; C=62,66%) i innych wzorcowych substancji.

Obrona u drzew iglastych i liściastych jest różna. W odróżnieniu od drzew liściastych ochrona przed owadami roślinożernymi i patogenami u drzew iglastych opiera się głównie na utrzymaniu podwyższonego poziomu terpenoidów [Manninen i in. 1998; Keeling, Bohlmann 2006; Zulak, Bohlmann 2010]. Jednak na przykład Honkanen i in. [1999] twierdzą, że u sosny zwyczajnej w odporności konstytutywnej najważniejszą rolę odgrywają terpenoidy, ale odpowiedzialną na defoliację (obrona indukowana) jest przede wszystkim wzrost poziomu fenoli. Nasze badania, z ośmioma gatunkami drzew liściastych i pięcioma iglastych, również potwierdzają fakt wyższego poziomu obrony konstytutywnej z wykorzystaniem związków fenolowych przed foliofagami u drzew liściastych niż iglastych (ryc. 1). Jednak w porównaniu do gatunków liściastych drzewa iglaste charakteryzują się szerszą gamą występujących u nich związków fenolowych [Stolter i in. 2010] i terpenoidów [Keeling, Bohlmann 2006]. Autorzy ci dowodzą, że drzewa iglaste, jako długo żyjące organizmy i utrzymujące igły przez wiele lat, muszą cały czas odpierać atak zróżnicowanych gatunkowo i dużych liczebnościowo szkodników.

Poziom obrony chemicznej różnych komponentów drzew (liści, łodyg, korzeni) jest zróżnicowany i zależy od rodzaju tych substancji oraz typu strategii obronnej roślin. Na przykład badania przeprowadzone u topoli wskazują, że zawartość glikozydów fenolowych u szybko i wolno rosnącego klonu oraz skondensowanych tanin u wolno rosnącego klonu jest w liściach znacznie większa niż w korzeniach [Harding i in. 2009]. Z drugiej strony rośliny, których liście są silnie atakowane przez foliofagi, a jednocześnie rozmnażają się głównie przez odrosty korzeniowe, zabezpieczają sobie przeżycie przez alokację związków fenolowych właśnie do korzeni [Karolewski i in. 2010]. Ponadto, jak twierdzą Dyer i in. [1991], gdy zgryzane są liście, to roślina alokuje węgiel do korzeni i tym samym zapobiega uszczuplaniu całkowitej puli C w roślinie.

Wpływ czynników wewnętrznych

Obrona liści i igieł przed foliofagami i grzybami patogenicznymi z wykorzystaniem związków węglowych zmienia się wraz ze stanem fizjologicznego rozwoju liści, a w przypadku gatunków iglastych także z wiekiem (rocznikiem) igieł. W sezonie wegetacyjnym wraz z rozwojem liści wzrasta w nich zawartość związków obronnych, w tym rozpuszczalnych i związanych ze ścianami komórkowymi fenoli oraz skondensowanych [Riipi i in. 2002; Karolewski i in. 2013] i hydrolizujących tanin [Ossipov i in. 1997]. Także z wiekiem igieł (rocznikiem) poziom fenoli wzrasta, na przykład u sosny zwyczajnej [Karolewski, Giertych 1995; Giertych i in. 2007] i czarnej [Giertych i in. 1999]. Zawartość związków obronnych wzrasta też z wiekiem siewek [Barton, Koricheva 2010]. Wyniki badań dotyczących zmian zawartości związków obronnych w liściach w trakcie sezonu wegetacyjnego nie są jednak tak jednoznaczne. Na przykład McArthur i in. [2009] stwierdzili, że w liściach eukaliptusa, mimo wzrostu poziomu fenoli, zawartość niektórych terpenoidów (α -pinenu) ulega dużym fluktuacjom. Wzrost poziomu fenoli może też mieć miejsce wyłącznie na początku sezonu wegetacyjnego. U modrzewia japońskiego stwierdził to Niemann [1976], a u świerka pospolitego Strack i in. [1989]. W odróżnieniu od wieku liści i igieł, wiek drzew nie wpływa na zawartość związków obronnych, ale jest niewiele badań tych zależności. Na przykład stwierdziliśmy, że u różnowiekowych drzewostanów sosnowych w zakresie 6-20 lat nie ma istotnych różnic w zawartości fenoli w igłach [Karolewski i in. 2011].

Zróżnicowanie w poziomie węglowych związków obronnych zależy też od pochodzenia drzew. Zwrócił już na to uwagę Forrest [1975], który stwierdził duże różnice w zawartości fla-

wonoidów w igłach, a jeszcze większe stilbenów w lodygach *Picea sitchensis*. Poziom związków obronnych jest w ścisłej relacji z różnorodnością i liczebnością roślinożerców oraz powodowanymi przez nie szkodami. Analiza, jakiej dokonali Coley i Barone [1996], wskazała, że zgryzienia przez owady są większe na niższych szerokościach geograficznych, czyli w rejonach o wyższej temperaturze i w tym kierunku notowane jest zwiększenie poziomu związków obronnych. Także my wykazaliśmy, że igły sosny zwyczajnej populacji pochodzących z niższych szerokości geograficznych zawierały większe ilości flawonoidów [Oleszek i in. 2002]. Jednak Adams i Zhang [2009] stwierdzili odwrotną do powszechnie przyjmowanej zależność między szerokością geograficzną i stopniem zgryzienia liści kilku gatunków drzew. Badając w gradiencie siedemnastu stopni szerokości geograficznej, autorzy stwierdzili, że procent zgryzienia liści rósł w kierunku z południa na północ. W takim razie powinno się stwierdzać wzrost poziomu substancji obronnych w kierunku większych szerokości geograficznych. Wyniki doświadczeń typu „common garden” [Karolewski, Giertych 1995] wskazały na większą zawartość związków fenolowych w igłach sosny zwyczajnej u populacji pochodzącej z północy (Szwecji) niż z centralnej części zasięgu tego gatunku (Polski). Z przytoczonych powyżej badań wynika ogólny wniosek, że wpływ szerokości geograficznej pochodzenia populacji na różnego typu związki obronne nie jest jednakowy.

Wpływ czynników zewnętrznych

Stosunkowo pełna i aktualna analiza wpływu czynników zewnętrznych w odporności roślin przed roślinożercami została opublikowana przez Endara i Coleya [2011]. Spośród nich największe znaczenie mają warunki świetlne. Im wyższe jest natężenie światła, tym większa jest zawartość w liściach związków obronnych, a tym samym większa jest ich odporność na roślinożerców i grzyby patogeniczne. Wskazują na to wyniki badań zarówno u roślin liściastych [Karolewski i in. 2013], jak i u iglastych [Karolewski i in. 2011] oraz zestawienie uwzględniające różne typy roślin [Roberts, Paul 2006]. U roślin iglastych z jednej strony starsze igły charakteryzują się wyższą zawartością fenoli, ale z drugiej igły starszych roczników są zacieniane przez igły młodszych roczników, co powoduje obniżenie poziomu tych związków [Karolewski i in. 2011]. Wpływ światła na poziom metabolitów obronnych zależy także od wymagań świetlnych roślin. To wiąże się z wyborem inwestowania w związki obronne lub we wzrost i dotyczy szczególnie gatunków roślin światłolubnych, a więc rosnących w warunkach silnej konkurencji z innymi gatunkami roślin [Imaji, Seiwa 2010]. W takim przypadku obrona chemiczna jest minimalizowana na rzecz intensywnego wzrostu.

O syntezie substancji obronnych przez rośliny w znacznym stopniu decyduje dostępność biogenów oraz zdolność roślin do ich pobierania. Teoria próbująca wyjaśnić mechanizmy obronne roślin dotyczy równowagi między węglem i innymi składnikami pokarmowymi, głównie azotem (CNB, ang. carbon-nutrient balance) [Bryant i in. 1983]. Według niej poziom obronnych metabolitów węglowodnorodnych jest dodatnio skorelowany z zaopatrzeniem w węgiel niezbędny do ich syntezy, natomiast ujemnie skorelowany z dostępnością azotu dla roślin. Konsekwencją niedostatku N w glebie jest zahamowanie wzrostu roślin. Przy małej masie asymilacyjnej roślina „nie może pozwolić sobie” na jeszcze większy jej ubytek spowodowany przez roślinożerców lub patogeniczne grzyby i broni się wzmocnieniem syntezy związków obronnych [Kraus i in. 2003].

Dane literaturowe wskazują na małą jednoznaczność wyników dotyczących wpływu podwyższonej lub obniżonej temperatury na zawartość węglowych związków obronnych. Na przykład Holopainen i Kainulainen [2004] stwierdzili, że temperatura w zakresie 20-28°C nie różnicowała zawartości monoterpenu ani też rozpuszczalnych fenoli w igłach i korzeniach siewek sosny

zwyczajnej. Z kolei Forrest [1975] stwierdził duże zróżnicowanie w poziomie wolnych fenoli i polifenoli w igłach i lodygach szczepek *Picea sitchensis* testowanych w temperaturze 8 i 20°C. Wykazał on, że w obydwu tych organach wyższa temperatura faworyzuje syntezę polifenoli, natomiast niska – zwiększa akumulację obydwu tych grup. Są też prace wskazujące na różny wpływ temperatury zależnie od gatunku drzew [Sallas i in. 2003]. Podwyższona temperatura wpływała na wzrost poziomu rozpuszczalnych fenoli w igłach sosny zwyczajnej, a obniżenie zawartości tych związków u świerka pospolitego.

Podsumowanie

Celem niniejszej pracy było omówienie zagadnień związanych z udziałem węgla zawartego w związkach obronnych u różnych gatunków i w poszczególnych komponentach drzew. Udział wagowy węgla w tych związkach mieści się w granicach 40-85%. Jednak określenie zawartości C związków obronnych w tkankach jest praktycznie niemożliwe, ze względu na dużą różnorodność oraz zmienność jakościową i ilościową tych substancji. Trudnością jest też stosowanie różnych metod analitycznych i standaryzacji wyników w tego typu badaniach. Dodatkowo wyniki wielu prac dowodzą istotnego wpływu szeregu wewnętrznych oraz zewnętrznych czynników, a w szczególności wpływu niekorzystnych czynników biotycznych, na zawartość węglowych związków obronnych. Jednak w niektórych przypadkach możliwe jest przybliżone obliczenie zawartości C w związkach obronnych, ale na ogół wyłącznie dla danego gatunku i komponentu i z zastrzeżeniem, że dotyczy to jedynie uwzględnionych w badaniach substancji. Możliwa jest natomiast ocena kierunku i ilościowych relacji inwestowania węgla w różne związki obronne lub ich rodzaje między różnymi gatunkami drzew i wpływu lub interakcji z niektórymi czynnikami wewnętrznymi i zewnętrznymi.

U gatunków drzew preferujących strategię obrony chemicznej wysoki poziom związków obronnych i zawartość w nich węgla wynika z silnej, konstytutywnej obrony lub odporności indukowanej w warunkach wpływu niekorzystnych czynników. Mimo przytoczonych powyżej przykładów rozbieżności wyników i ich interpretacji, można jednak przyjąć, że wraz ze wzrostem i rozwojem roślin oraz większą dostępnością światła zawartość węglowych związków obronnych wzrasta. Natomiast lepsze zaopatrzenie w składniki mineralne (głównie w azot) przyczynia się do zmniejszenia ich poziomu. Należy wziąć pod uwagę, że jednoczesny wpływ wielu czynników zewnętrznych oraz zmiany następujące ze wzrostem i rozwojem drzew utrudniają ocenę inwestowania węgla w ich ochronę i obronę.

Literatura

- Adams J. M., Zhang Y. 2009. Is there more insect folivory in warmer temperate climates? A latitudinal comparison of insect folivory in eastern North America. *Journal of Ecology* 97 (5): 933-940.
- Agrawal A. A. 2006. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (2): 103-109.
- Agrawal A. A., Fishbein M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87 (7) Suppl. S132-149.
- Barton K. E., Koricheva J. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta-analysis. *American Naturalist* 175 (4): 481-493.
- Bennett R. N., Wallsgrove R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.
- Bernays E. A. 1981. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. *Ecological Entomology* 6: 353-360.
- Bruce R. J., West C. A. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by specific fragments in suspension cultures of castor bean. *New Phytologist* 91: 889-897.
- Bryant J. P., Chapin F. S. III, Klein D. R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivore. *Oikos* 40: 357-368.
- Carmona D., Lajeunesse M. J., Johnson T. J. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology* 25: 358-367.

- Clancy K. M., Price P. W. 1987. Rapid herbivore growth enhances enemy attack: sublethal plant defences remain a paradox. *Ecology* 68 (3): 733-737.
- Coley P. D., Barone J. A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 305-335.
- Cowan M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Dominy N. J., Lucas P. W., Wright S. J. 2003. Mechanics and chemistry of rain forest leaves: canopy and understorey compared. *Journal of Experimental Botany* 54: 2007-2014.
- Dyer M. I., Acra M. A., Wang G. M. 1991. Source-sink carbon relations in two *Panicum coloratum* ecotypes in response to herbivory. *Ecology* 72 (4): 1472-1483.
- Ehrlich P. R., Raven P. H. 1964. Butterflies and plants: a study in co-evolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Endara M.-J., Coley P. D. 2011. The resource availability hypothesis revisited: a meta-analysis. *Functional Ecology* 25: 389-398.
- Forkner R. E., Marquis R. J., Lill J. T. 2004. Feeny revisited: condensed tannins as anti-herbivore defences in leaf-chewing herbivore communities of *Quercus*. *Ecological Entomology* 29: 174-187.
- Forrest G. I. 1975. Polyphenol variation in Sitka spruce. *Canadian Journal of Forest Research* 5: 26-37.
- Fraenkel G. S. 1959. The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129: 1466-1470.
- Giertych M. J., Karolewski P., De Temmerman L. O. 1999. Foliage age and pollution alter content of phenolic compounds and chemical elements in *Pinus nigra* needles. *Water, Air, and Soil Pollution* 110 (3/4): 363-377.
- Giertych M. J., Karolewski P., Grzebyta J., Oleksyn J. 2007. Role of chemical composition of *Pinus sylvestris* needles in the feeding behavior and performance of *Neodiprion sertifer* larvae. *Forest Ecology and Management* 242: 700-707.
- Giertych M. J., Karolewski P., Żytkowiak R., Oleksyn J. 2006. Differences in defence strategies against herbivores between two pioneer tree species: *Alnus glutinosa* Gaertn. and *Betula pendula* Roth. *Polish Journal of Ecology* 54 (2): 181-187.
- Glazener J. A. 1982. Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell walls of young tomato fruits after incubation with *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 20: 11-25.
- Gulmon S. L., Mooney H. A. 1986. Costs of defense and their effects on plant productivity. W: Givnish T. J. [red.]. *On the economy of plant form and function*. University Press, Cambridge 681-698.
- Hanley M. E., Lamont B. B., Fairbanks M. M., Rafferty C. M. 2007. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8 (4): 157-178.
- Harborne J. B. 1997. *Ekologia biochemiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Harding S. A., Jarvie M. M., Lindroth R. L., Tsai C.-J. 2009. A comparative analysis of phenylpropanoid metabolism, N utilization, and carbon partitioning in fast- and slow-growing *Populus* hybrid clones. *Journal of Experimental Botany* 60 (12): 3443-3452.
- Haukioja E. 1990. Induced of defence in trees. *Annual Review of Entomology* 36: 25-42.
- Holopainen J. K., Kainulainen P. 2004. Reproductive capacity of the grey pine aphid and allocation response of Scots pine seedlings across temperature gradients: a test hypotheses predicting outcomes of global warming. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 94-102.
- Honkanen T., Haukioja E., Kuitunen V. 1999. Responses of *Pinus sylvestris* branches to simulated herbivory are modified by tree sink/source dynamics and by external resources. *Functional Ecology* 13: 126-140.
- Iason G. R., Lennon J. J., Pakeman R. J., Thoss V., Beaton J. K., Sim D. A., Elston D. A. 2005. Does chemical composition of individual Scots pine trees determine the biodiversity of their associated ground vegetation. *Ecology Letters* 8: 364-369.
- Imaji A., Seiwa K. 2010. Carbon allocation to defense, storage, and growth in seedlings of two temperate broad-leaved tree species. *Oecologia* 16: 273-281.
- Jagodziński A. M., Jarosiewicz G., Karolewski P., Oleksyn J. 2012. Zawartość węgla w biomacie pospolitych gatunków krzewów podszycia leśnego. *Sylwan* 156 (9): 650-662.
- Kainulainen P., Ruohomäki K., Ossipov V., Haukioja E., Pihlaja K. 1998. Delayed induced changes in the biochemical composition of host plant leaves during an insect outbreak. *Oecologia* 116: 182-190.
- Kaplan I., Halitschke R., Kessler A., Sardaneli S., Denno R. F. 2008. Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues. *Ecology* 89 (2): 392-406.
- Karban R. 2011. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology* 25: 339-347.
- Karban R., Myers J. H. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 331-348.
- Karolewski P., Giertych M. J. 1995. Changes in the level of phenols during needle development in Scots pine populations in a control and polluted environment. *European Journal of Forest Pathology* 25 (6-7): 297-306.
- Karolewski P., Giertych M. J., Żmuda M., Jagodziński A. M., Oleksyn J. 2013. Season and light affect constitutive defenses of understory shrub species against folivorous insects. *Acta Oecologica* 53: 19-32.
- Karolewski P., Jagodziński A. M., Grzebyta J. 2011. Wpływ wieku drzew oraz wieku i lokalizacji igieł w koronie na zawartość związków fenolowych w igłach młodych sosen. *Sylwan* 155 (12): 797-807.

- Karolewski P., Zadworny M., Mucha J., Napierała-Filipiak A., Oleksyn J. 2010. Link between defoliation and root vitality in five understory shrubs with different resistance to insect herbivores. *Tree Physiology* 30: 969-978.
- Kączkowski J. 1985. Związki terpenowe i ich pochodne. W: *Biochemia roślin. t. II. Metabolizm wtórny*. PWN, Warszawa. 97-167.
- Keeling C. I., Bohlmann J. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist* 170: 657-675.
- Koricheva J., Nykänen H., Gianoli E. 2004. Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defenses: are plants jacks-of-all-trade, masters of all? *The American Naturalist* 163 (4): E64-E75.
- Kozłowska M. 1994. Phenolic composition of red raspberry canes in relation to *Didymella appplanata* (Niessl) Sacc. response. *Acta Physiologiae Plantarum* 16 (3): 211-215.
- Kraus T. E. C., Zasoski R. J., Dahlgren R. A. 2003. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil* 262 (1/2): 95-109.
- Leather S. R., Lehti J. P. 1982. Abundance and distribution of *Yponomeuta evonymellus* (Lepidoptera, Yponomeutidae) in Finland during 1981. *Notulae Entomologicae* 62 (3): 93-96.
- Lokvam J., Kursar T. A. 2005. Divergence in structure and activity of phenolic defences in young leaves of two co-occurring *Inga* species. *Journal of Chemical Ecology* 31 (11): 2563-2580.
- Manninen A.-M., Vuorinen M., Holopainen J. K. 1998. Variation in growth, chemical defense, and herbivore resistance in Scots pine provenances. *Journal of Chemical Ecology* 24 (8): 1315-1331.
- McArthur C., Loney P. E., Davies N. W., Jordan G. J. 2009. Early ontogenetic trajectories vary among defence chemicals in seedlings of a fast-growing eucalypt. *Austral Ecology* 35 (2): 157-166.
- Metlen K. L., Aschehoug E. T., Callaway R. M. 2009. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant, Cell and Environment* 32: 641-653.
- Niemann G. J. 1976. Phenolics from *Larix* needles. XII. Seasonal variation of main flavonoids in leaves of *L. leptolepis*. *Acta Botanica Neerlandica* 25 (5): 349-359.
- Oleksyn J., Karolewski P., Giertych M. J., Żytkowiak R., Reich P. B., Tjoelker M. G. 1998. Primary and secondary host plants differ in photosynthetic response to herbivory: evidence from *Alnus* and *Betula* grazed by the alder beetle, *Agelastica alni*. *New Phytologist* 140 (2): 239-249.
- Oleszek W., Stochmal A., Karolewski P., Simonet A. M., Macias F. A., Tava A. 2002. Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of different origin grown for nearly a century at the same area. *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (10): 1011-1022.
- Ossipov V., Loponen J., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. 1997. Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 493-504.
- Pleszczyńska M., Szczodrak J. 2005. Taniny i ich rozkład enzymatyczny. *Biotechnologia* 68 (1): 152-165.
- Poorter L., van de Plassche M., Willems S., Boot R. G. A. 2004. Leaf traits and herbivory rates of tropical tree species differing in successional status. *Plant Biology* 6: 746-754.
- Przybył K., Karolewski P., Oleksyn J., Łabędzki A., Reich P. B. 2008. Fungal diversity of Norway spruce litter: effects of site conditions and premature leaf fall caused by bark beetle outbreak. *Microbial Ecology* 56: 332-340.
- Rasmann S., Bauerle T. L., Poveda K., Vannette R. 2011. Predicting root defence against herbivores during succession. *Functional Ecology* 25: 368-379.
- Rengel Z., Graham R. D., Fedler J. F. 1994. Time-course of biosynthesis of phenolics and lignin in roots of wheat genotypes differing in manganese efficiency and resistance to take-all fungus. *Annals of Botany* 74: 471-477.
- Riipi M., Ossipov V., Lempa K., Haukioja E., Koricheva J., Ossipova S., Pihlaja K. 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry; are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecologia* 130: 380-390.
- Roberts M. R., Paul N. D. 2006. Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist* 170: 677-699.
- Sallas L., Luomala E.-M., Utriainen J., Kainulainen P., Holopainen J. K. 2003. Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. *Tree Physiology* 23: 97-108.
- Salminen J.-P., Karonen M. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology* 25: 325-338.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Stevens M. T., Lindroth R. L. 2005. Induced resistance in the interminate growth of aspen (*Populus tremuloides*). *Oecologia* 145: 298-306.
- Stolter C., Ball J. P., Niemelä P., Julkunen-Tiitto R. 2010. Herbivores and variation in the composition of specific phenolics of boreal coniferous trees: a search for patterns. *Chemoecology* 20: 229-242.
- Strack D., Heilemann J., Wray V., Dirks H. 1989. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry* 28 (8): 2071-2078.
- Zulak K. G., Bohlmann J. 2010. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 86-97.

SUMMARY

Share of carbon in defense compounds against biotic factors in woody plants

Chemical defense against the adverse effects of biotic factors (phytofagous insects, other herbivores and pathogenic fungi) requires additional investments in the production of defensive secondary metabolites by plants. In general, only one of the three types of secondary compounds (alkaloids, phenolics and terpenoids) is preferred. It is estimated that to produce 1 g of phenolic compounds, about 2.5 g of photosynthetic CO₂ is consumed, while the cost of alkaloid synthesis is even higher, ca. 5 g CO₂. All defensive compounds are rich in carbon. Depending on the chemical formula, carbon content for various defense compounds ranges from ca. 40% to over 85% of molecular weight. However, it is difficult to precisely estimate the total amount of carbon invested in all defensive compounds, or even in the three main groups of these compounds. In this paper we give examples of the approximate carbon content in particular defensive compounds. Based on our findings regarding molecular weight of standard substance (chlorogenic acid) for total soluble phenolic compounds (TPh) and carbon content in the chlorogenic acid, we calculated that the carbon content in this group of defensive compounds was 2.7% of the dry weight of pine needles. In a similar way we have calculated that TPh carbon content accounts for 4.3% of dry leaf weight for several species of deciduous trees. Similarly, we calculated that in the leaves of plants strongly attacked by folivorous insects, carbon content in condensed tannins (catechin was used as a standard) was 7.0% of the dry weight of leaves, whereas carbon content in both groups (i.e. TPh and condensed tannins) was as high as ca. 10%. The content of defensive compounds, and carbon in them, is dependent primarily on the defense strategy of plants, tree group (coniferous vs. deciduous trees), tree species and biomass component of a tree (leaves, branches, bark, roots, etc.) and a number of internal (age of trees, age of leaves, development stage, origin, etc.) and external (availability of elements, light conditions) factors.