

PIOTR KAROLEWSKI, ANDRZEJ M. JAGODZIŃSKI, JACEK GRZEBYTA

Wpływ wieku drzew oraz wieku i lokalizacji igieł w koronie na zawartość związków fenolowych w igłach młodych sosen*

Influence of tree age, needle age and location in the crown on the phenolic compounds content in needles of young Scots pines

ABSTRACT

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.

We studied Scots pine stands differing in age to determine the influence of tree age (6-20-year-old), needle age, and needle location in the crown and on the shoot on total soluble phenolic compounds (TPh) content in needles. These compounds are secondary metabolites, which largely determine the resistance of plants to unfavorable biotic factors such as herbivorous insects and pathogenic fungi. Examining the constitutive resistance of needles (without indications of damage), we found a statistically significant positive effect of needles age (1-3-year) and a negative effect of whorl age on TPh content, but only in older needles. We found that in spite of the large influence of the needle's age, the light conditions have a significant positive influence on the TPh content, as indicated by changes in the level of phenols with whorl age, comparing needles of different ages. The tree's age was important, but only when the cleaning was carried out changing the light conditions of needle growth. Moreover, we revealed that in the oldest needles (3-year), the position on the shoot also has a significant influence on TPh content in the needles. The level of phenols is lower in the needles growing on the bottom part of the shoot, which are shaded by needles growing on the upper side of the shoot.

KEY WORDS

stand age, needle age, light conditions, phenols, *Pinus sylvestris*, tolerance to biotic factors

ADDRESSES

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

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

Jacek Grzebyta ⁽³⁾ – e-mail: jacek.grzebyta@rothamsted.ac.uk

⁽¹⁾ Instytut Dendrologii; Polska Akademia Nauk; ul. Parkowa 5; 62-035 Kórnik

⁽²⁾ Zakład Ochrony Lasu; Uniwersytet Przyrodniczy; ul. Wojska Polskiego 71C; 60-625 Poznań

⁽³⁾ Rothamsted Research; West Common, Harpenden; Hertfordshire, AL5 2JQ; England

Wstęp

Istnieje cały szereg cech roślin, od fizycznych (twardość liści i struktura), morfologicznych (trichomy, lateks), do natężenia procesów fizjologicznych oraz poziomu metabolitów pierwotnych i wtórnych, które wpływają na relacje roślina – owad roślinożerny i decydują o możliwościach obronnych roślin przed zgrzyaniem. W oparciu o metaanalizę danych uwzględniającą

* Praca powstała w ramach projektu badawczego pt. „Środowiskowo-genetyczne uwarunkowania produktywności ekosystemów leśnych na gruntach leśnych i poprzemysłowych”, finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych w Warszawie (2011-2015) oraz w ramach projektu badawczego nr 6 P04G 032 21, finansowanego przez MNiSW.

najnowsze oryginalne wyniki prac na ten temat, Carmona i in. [2011] wykazali, że nie ma jednak żadnej innej cechy roślin, która byłaby tak silnie związana z ich odpornością na zgryzanie przez owady i jednocześnie pozwalała przewidywać stopień podatności na roślinożerców, jak stężenie metabolitów wtórnych. Występującym w roślinach licznym związkom metabolizmu wtórnego przypisuje się właściwości ochraniające przed niekorzystnym wpływem takich czynników biotycznych jak owady roślinożerne [Kaplan i in. 2008], grzyby patogeniczne [Kozłowska 1994; Przybył i in. 2008] czy bakterie [Scalbert 1991; Cowan 1999]. W metabolizmie wtórnym wyróżnia się trzy szlaki: terpenoidowy, azotowy i fenolowy [Harborne 1997]. W przypadku związków fenolowych są to niskocząsteczkowe kwasy fenolowe, skondensowane i hydrolizujące taniny, flawonoidy oraz wysokocząsteczkowe polifenole [Bernays 1981; Salminen, Karonen 2011]. Obok terpenoidów [Keeling, Bohlmann 2006; Zulak, Bohlmann 2010; Sukovata i in. 2010], poziom związków fenolowych jest najczęściej postulowanym wskaźnikiem odporności roślin na wpływ czynników biotycznych, zarówno konstytutywnej, jak i indukowanej [Honkanen i in. 1999; Stevens, Lindroth 2005]. Podwyższony poziom fenoli ma miejsce nawet w układach symbiotycznych i obserwowany jest na przykład w korzeniach w przypadku zasiedlenia ich przez grzyby ektomikoryzowe [Karolewski, Werner 2000].

Podwyższona zawartość związków fenolowych chroni przed fitofagami zarówno liście [Oleksyn i in. 1998; Lokvam, Kursar 2005], jak i korzenie [Rasmann 2011]. Utrzymywanie podwyższonego poziomu wtórnych metabolitów obronnych (odporność konstytutywna) jest bardzo kosztowne [Koricheva i in. 2004; Kaplan i in. 2008]. Mniej kosztowne jest natomiast uaktywnianie syntezy tych związków (odporność indukowana) dopiero w momencie działania szkodliwych czynników biotycznych [Karban, Myers 1989; Karban 2011]. Nie zawsze jednak rośliny inwestują w obronę chemiczną, lecz w intensywny wzrost lub wytwarzanie nowych liści. Zależy to od ich strategii obronnej [Giertych i in. 2006; Imaji, Seiwa 2010]. System obrony roślin bywa jeszcze bardziej skomplikowany. Gatunki, których liście są bardzo podatne na foliofagi, rozmnażają się w dużym stopniu przez odrosty korzeniowe i zabezpieczają swoje przeżycie przez alokację związków fenolowych właśnie do tych organów [Karolewski i in. 2010].

Poza zróżnicowaniem gatunkowym roślin istnieje szereg czynników zewnętrznych i wewnętrznych mających ogromne znaczenie w odporności każdego gatunku na żerowanie foliofagów. Spośród czynników zewnętrznych największe znaczenie mają warunki świetlne. Im wyższe jest natężenie światła, tym wyższa jest zawartość fenoli w liściach, a tym samym większa ich odporność na foliofagi [Brzezińska, Kozłowska 2008; Żmuda i in. 2008]. Z kolei spośród czynników wewnętrznych największe znaczenie w podatności roślin na foliofagi ma stan fizjologicznego rozwoju liści [Żmuda i in. 2008], a w przypadku roślin zimozielonych także wiek liści/igieł [Karolewski, Giertych 1995; Giertych i in. 2007]. Z wiekiem igieł poziom fenoli wzrasta.

U roślin iglastych wpływ światła i wieku igieł na zawartość związków fenolowych jest ze sobą w dużym stopniu powiązany. Z jednej strony starsze igły charakteryzują się wyższą zawartością fenoli, ale z drugiej są zacieniane przez igły młodszych roczników, co powoduje obniżenie poziomu tych związków. Dlatego też postanowiliśmy (1) zbadać wpływ warunków świetlnych wzrostu igieł w różnym wieku na zawartość w nich związków fenolowych. Zakładamy, że nie tylko wiek igieł, ale także wiek drzew może różnicować poziom fenoli w igłach. W drzewostanach o zróżnicowanym wieku panują różne warunki świetlne wzrostu igieł, dlatego też kolejnym naszym celem było określenie (2) na ile wiek drzew wpływa na poziom fenoli w igłach i na ile związane jest to z różnymi warunkami świetlnymi. Nie tylko igły młodszych roczników zacieniają starsze igły. Także igły tego samego rocznika, ale rosnące na wierzchniej części pędu, zacieniają igły rosnące od spodu. Uważamy, że ma to tym większe znaczenie, im igły są osadzone

bardziej wewnątrz koron niż na ich obrzeżach. Na obrzeżach koron natężenie światła jest duże i wzajemne zacielenie się igieł ma prawdopodobnie mniejsze znaczenie, natomiast redukcja światła w głębi koron może mieć już znaczący wpływ na wzrost i rozwój igieł, a tym samym także na poziom wtórnych metabolitów (w tym związków fenolowych). Kolejnym naszym celem stało się (3) poznanie skali wpływu wzajemnego zacielenia się igieł rosnących na tych samych pędach (igieł równowiekowych) na zawartość fenoli. Tego typu wyniki, związane z miejscem poboru igieł, mogą być pomocne w badaniach, w których ze względu na długofalowość i zapewnienie małej inwazyjności pobiera się sukcesywnie do analizy niewielkie liczby igieł, często tylko po jednym krótkopędzie.

Materiał i metody

TEREN BADAŃ I MATERIAŁ ROŚLINNY. Badania wykonano w sześciu litych drzewostanach sosnowych (*Pinus sylvestris* L.), założonych na Górze Kamieńsk koło Bełchatowa (Nadleśnictwo Bełchatów, Leśnictwo Adamów; 51°12' N, 19°25' E). W skład powierzchni doświadczalnych weszły drzewostany w wieku od 6 do 20 lat. W najmłodszym drzewostanie założono dwa poletka o powierzchni 300 m², a w przypadku pozostałych drzewostanów – po jednym o powierzchni 450-550 m². Charakterystykę powierzchni badawczych przedstawiono w pracach Jagodzińskiego i Kałuckiej [2008, 2010].

We wrześniu 2006 roku zmierzono pierśnice drzew na powierzchniach doświadczalnych oraz wysokości wszystkich drzew w drzewostanach 6-11-letnich i co najmniej 20% drzew w drzewostanach starszych (tab. 1). W przypadku najmłodszych nasadzeń, gdy drzewa nie osiągnęły wysokości 1,3 m, zmierzono ich średnice na wysokości 0,5 m. W oparciu o frekwencję drzew w poszczególnych stopniach grubości w każdym z drzewostanów wybrano od 7 do 9 drzew, reprezentujących pełen zakres zmienności pierśnicy i wysokości. Wybierając drzewa modelowe kiero-

Tabela 1.

Średnie zagęszczenie, pierśnica, wysokość, sumaryczne pole przekroju pierśnicowego oraz indeks powierzchni liściowej (LAI) w drzewostanach sosnowych różnego wieku

Average stand density, dbh, height, cross-sectional basal area and leaf area index (LAI) in Scots pine stands of different age

Wiek	Zagęszczenie [szt./ha]	Pierśnica [cm]	Wysokość [m]	Pole przekroju pierśnicowego [m ² /ha]	LAI [m ² /m ²]					
6	6127a (58)	1,44e (0,04)	1,41e (0,02)	0,66d (0,15)	0,81d (0,07)					
9	5744ab (119)	2,78d (0,07)	2,44d (0,04)	4,03d (0,60)	1,15cd (0,11)					
11	5220bc (120)	2,82d (0,06)	2,57d (0,03)	3,67d (0,15)	1,03d (0,01)					
15	5237bc (97)	5,76c (0,08)	4,94c (0,09)	14,83c (1,14)	1,45bc (0,05)					
17	4910c (90)	6,71b (0,09)	5,59b (0,10)	18,91b (0,59)	2,08a (0,07)					
20	4982c (109)	8,29a (0,11)	8,01a (0,17)	29,36a (0,48)	1,59b (0,05)					
ANOVA	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
P>F	21,823	0,0009	332,687	<0,0001	1612,44	<0,0001	323,728	<0,0001	48,0454	<0,0001

Ta sama litera oznacza brak istotnych różnic przy P=0,05 w teście Tukey'a; W nawiasach podano wartości błędów standardowego
The same letters indicate no significant differences at P=0.05 in Tukey's test; Standard error values in parentheses

Tabela 2.

Charakterystyka drzew modelowych
Biometrical characteristics of model trees

Wiek	Liczba drzew modelowych	D _{0,5m} [cm]	D _{1,3m} [cm]	H [m]	Liczba żywych okółków	Długość korony [m]
6	7	0,5-4,9	0,3-3,7	0,57-2,83	3-6	0,55-2,80
9	8	1,2-8,3	0,5-6,8	1,10-4,23	6-8	1,08-4,21
11	7		0,7-6,2	1,53-4,18	8-10	1,40-4,01
15	9		2,4-12,3	2,80-7,40	7-10	2,04-6,25
17	7		1,5-13,0	2,96-7,18	5-10	1,17-5,45
20	8		3,4-16,6	6,96-10,90	7-13	2,96-7,70

wano się również ich wysokością, tak by reprezentowały pełny zakres wysokości drzew w poszczególnych drzewostanach (tab. 2). W badanych drzewostanach przeprowadzano jedynie typowe zabiegi pielęgnacyjne, w tym czyszczenia późne między 11. a 15. rokiem życia drzew.

Wyznaczone w terenie drzewa zostały ścięte we wrześniu 2006 roku. Następnie, bezpośrednio w lesie, rozdzielono je na poszczególne organy, w tym igły, oraz zważono. Charakterystykę biometryczną drzew modelowych przedstawiono w tabeli 2. W dniu zbioru reprezentatywne dla każdego rocznika, okółka i drzewa próbki igieł przechowywano w lodówce. Następnego dnia przewieziono materiał do laboratorium i wysuszono w 65°C do stałej masy w suszarkach z wymuszonym obiegiem powietrza ULE 600 (Memmert GmbH+Co.KG, Niemcy).

ANALIZY CHEMICZNE. Do analiz pobrano po dwie próbki (powtórzenia), reprezentujące każdy z wariantów (rocznik igieł/okółek/drzewo). Przed analizami igły dodatkowo podsuszono (65°C, 24 godz.) i zmielono w młynkach Mikro-Feinmühle-Culatti Mill (IKA Labor Technik Staufen, Niemcy). Proszki (po 0,1 g) poddano dwukrotnej ekstrakcji w 10 ml 96% i 80% wrzącego etanolu, kolejno przez 15 i 10 minut. Zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli (SF) mierzono metodą opisaną przez Johnsona i Schaala [1957], zmodyfikowaną przez Singletona i Rossiego [1965]. Stężenie fenoli określono kolorymetrycznie przy użyciu spektrofotometru (Shimadzu UV-Vis 1700; <http://www.shimadzu.com>), po reakcji z odczynnikiem Folin Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma F – 9252) w 10% roztworze Na₂CO₃, mierząc absorbencję przy $\lambda=660$ nm. Rezultaty przeliczono na μM kwasu chlorogenowego w 1 g suchej masy, którego użyto jako wzorca do sporządzania krzywych standardowych.

ANALIZY STATYSTYCZNE. Wyniki weryfikowano korzystając z programu JMP 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; <http://www.jmp.com>). Weryfikacja statystyczna istotności wpływu wieku drzew, okółka i rocznika igieł na zawartość fenoli oraz interakcji między tymi czynnikami została przeprowadzona przy pomocy analizy wariancji. Dodatkowo zastosowano także test Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

Sumarycznie oznaczana zawartość rozpuszczalnych fenoli (SF) w igłach sosny zwyczajnej w istotnym stopniu zależała od ich rocznika (tab. 3). Wzrost poziomu SF w kolejnych rocznikach igieł (średnio w drzew 6-20-letnich i okółków z pełnym garniturem igieł, tj. 3.-5. okółek) był dodatnio skorelowany z rocznikiem igieł (R). W stosunku do igieł jednorocznych, igły dwuletnie miały o 24%, a trzyletnie o 42% wyższą zawartość fenoli. Taka zależność była oczekiwana i potwierdziła uzyskane wcześniej rezultaty u tego gatunku sosny [Karolewski, Giertych 1995; Giertych i in. 2007]. Wzrost zawartości fenoli wraz z wiekiem igieł jest znaną zależnością u roślin iglastych. Potwierdzają to na przykład wyniki uzyskane u sosny czarnej z dwukrotnie większą

ilością roczników [Giertych i in. 1999]. Są one zgodne także z naszymi badaniami, wykonanymi na: świerku pospolitym, daglezi zielonej i jodle pospolitej (dane niepublikowane).

Mniej znanymi niż wpływ wieku igieł są natomiast zależności między okółkiem a zawartością fenoli w igłach. Poziom fenoli w igłach maleje wraz ze wzrostem numeru okółka (O) licząc od góry i uwzględniając tylko te okółki, które mają wszystkie trzy roczniki igieł (okółki 3.-5.) (tab. 3 i 4). Niewątpliwie decyduje o tym coraz silniejsza redukcja oświetlenia igieł starszych okółków przez rosnące nad nimi igły młodszych okółków. Należy podkreślić bardzo silny wpływ rocznika igieł na zawartość SF i to prawdopodobnie powoduje brak istotnej interakcji O×R. Poszukując przyczyn obniżenia poziomu SF w igłach wraz z wiekiem okółka i jednocześnie biorąc pod uwagę, że w analizie ujęto tylko okółki ze wszystkimi rocznikami igieł, dochodzimy do wniosku, że główną przyczyną takiej zależności jest zróżnicowane oświetlenie. Upewnia nas w tym dodatkowa analiza zróżnicowania zawartości fenoli w igłach z różnych okółków, ale rozpa-

Tabela 3.

Średnia zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli [μM kwasu chlorogenowego/g s.m.] w igłach sosny zwyczajnej w zależności od wieku drzewa, kolejności okółka i wieku igieł

Average content of total soluble phenols [μM chlorogenic acid/g d.m.] in the needles of Scots pine in relation to tree age, the whorl order and age of needles

Suma rozpuszczalnych fenoli		
Wiek drzewa [lata]	6	154,1 (4,1) b
	9	150,5 (3,3) b
	11	162,8 (5,0) b
	15	185,7 (3,7) a
	17	164,1 (4,1) a
	20	159,8 (3,9) b
Okółek od góry	3	168,1 (3,0) a
	4	163,2 (2,9) ab
	5	160,0 (2,9) b
Rocznik igieł [lata]	1	135,0 (2,5) c
	2	166,9 (2,4) b
	3	192,7 (2,7) a

Ta sama litera oznacza brak istotnych różnic przy $P=0,05$ w teście Tukey'a; w nawiasach podano wartości błędu standardowego
The same letters indicate no significant differences at $P=0,05$ in Tukey's test; standard error values in parentheses

Tabela 4.

Wpływ wieku drzewa, kolejności okółka i wieku igieł na średnią zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli w igłach sosny zwyczajnej

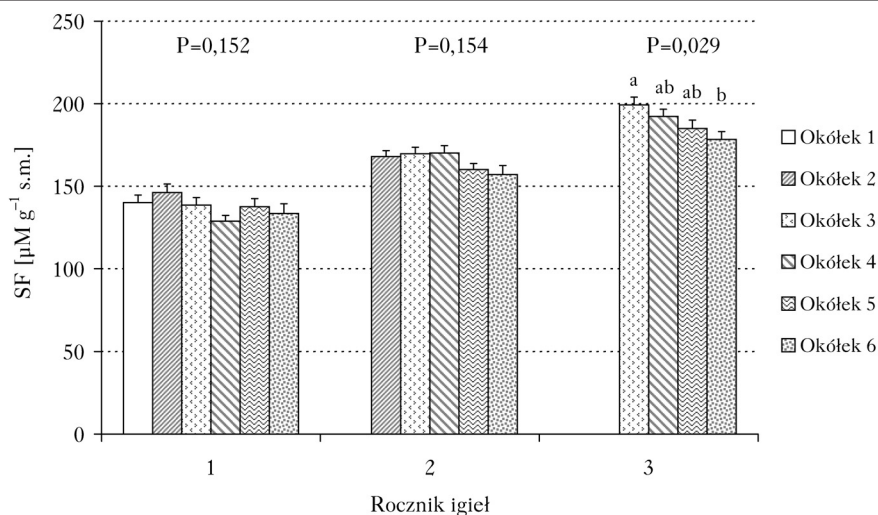
Effect of tree age, the whorl order and age of needles on average content of total soluble phenols in the needles of Scots pine

Źródło zmienności	df	F	P
Wiek drzewa (W)	5	102201,1	<0,0001
Okółek (O)	2	11259,4	0,0169
Rocznik igieł (R)	2	364127,6	<0,0001
W×O	10	17912,9	0,2225
W×R	10	40903,4	0,0011
O×R	4	7852,9	0,2216
W×O×R	20	23913,5	0,6233
Błąd	670	918278,9	
Ogółem	723		

trywanych oddzielnie dla każdego z roczników igieł (ryc. 1). Spośród wszystkich trzech roczników, igły jednoroczne rosną po najbardziej zewnętrznej części, tak całej korony, jak i poszczególnych gałęzi. Dla igieł tego rocznika natężenie oświetlenia jest prawdopodobnie na tyle dostatecznie duże na każdym z sześciu okółków, że w konsekwencji nie ma istotnych różnic w poziomie fenoli. W przypadku igieł dwuletnich, w starszych okółkach zacielenie przez igły młodszych okółków jest większe, ale mimo wyraźnej tendencji, także nie ujawnia się jeszcze istotne zróżnicowanie w zawartości SF. Występuje ono natomiast już u igieł trzyletnich ($P=0,029$), gdzie mamy do czynienia z najbardziej zacielenionymi igłami ze wszystkich roczników.

Podsumowując należy stwierdzić, że istnieje wpływ okółka na zawartość SF, a główną przyczyną tych zależności jest redukcja natężenia oświetlenia igieł niżej położonych okółków, zacielenianych przez igły położonych wyżej okółków młodszych. Intensywność i istotność tego zjawiska (procesu) wzrasta z wiekiem igieł i praktycznie w młodocianym drzewostanie sosny zwyczajnej ma znaczenie dopiero u najstarszych igieł trzyletnich. Należy sądzić, że podobne zależności mogą być obecne, a z pewnością wyraźniejsze, w przypadku innych gatunków sosen i ogólnie drzew iglastych z jeszcze większą ilością roczników igieł.

W pracach dotyczących drzew, w opisach metod podawany jest zawsze ich wiek. Jednak, w odróżnieniu od badań dotyczących wpływu stanu fizjologicznego i wieku liści na zawartość w nich wtórnych metabolitów, brak jest odpowiedzi na pytanie o to, czy i w jakim stopniu wiek drzew determinuje poziom tych związków. Nasze dane wskazują, że w młodych drzewostanach sosnowych wiek drzew ma istotny ($P<0,0001$) wpływ na zawartość fenoli w igłach (średnio dla trzech roczników igieł, rosnących na trzech okółkach (tab. 3)). Sądziłyśmy, że przyczyną tego są różnice w natężeniu oświetlenia i oczekiwaliśmy jednokierunkowej zależności dla całego badanego przez nas zakresu wiekowego drzew (6-20 lat). Ta hipoteza nie sprawdziła się. Na wynik



Ryc. 1.

Wpływ kolejności okółka na zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli w igłach różnych roczników sosny zwyczajnej

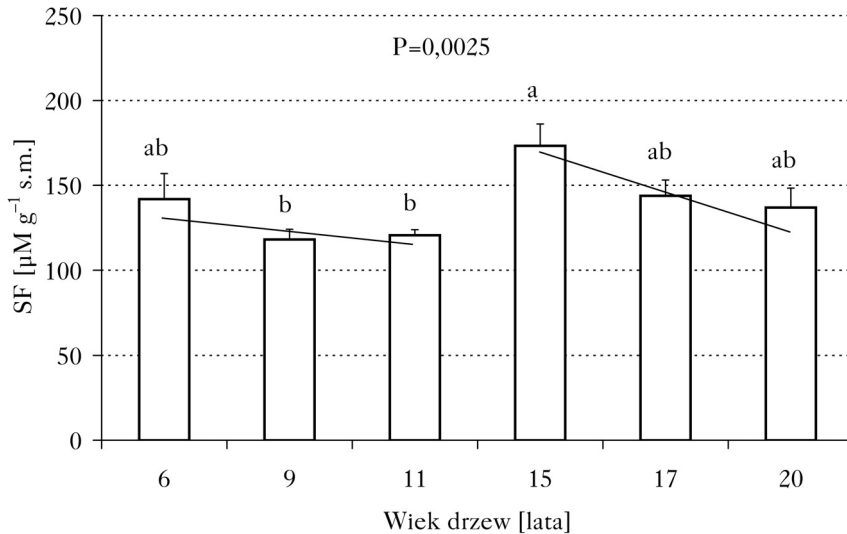
Influence of tree whorl on the content of total soluble phenols in the needles of various ages of Scots pine trees

P – istotność różnicy między igłami tego samego rocznika na różnych okółkach; ta sama litera oznacza brak istotnych różnic przy $P=0,05$ w teście Tukey'a

P – significance of difference between needles of the same age from various whorls; the same letters indicate no significant differences at $P=0,05$ in Tukey's test

mogła mieć wpływ coraz większa redukcja natężenia oświetlenia u starszych roczników igieł wraz z wiekiem drzew, związana ze wzrostem rozmiarów drzew przy jednocześnie zbliżonym zagęszczeniu drzewostanów (tab. 1) [Jagodziński, Oleksyn 2009a-c]. Dlatego też, biorąc pod uwagę brak wpływu okółka na zawartość SF w igłach młodszych roczników (ryc. 1), przeprowadziliśmy analizę wpływu wieku na poziom SF tylko u igieł jednorocznych. Wyniki okazały się jednak podobne. Najbardziej prawdopodobną przyczyną takiego rezultatu jest przeprowadzony między 11. a 15. rokiem życia drzew zabieg czyszczeń późnych. Spowodowało to zwiększenie dostępności światła dla igieł drzew powyżej 15 roku, co uwiadcza analiza wpływu wieku drzew na zawartość SF w jednorocznych igłach, po podziale odpowiednio na drzewa 6-11- i 15-20-letnie (ryc. 2). Dodatkowym potwierdzeniem wpływu czyszczeń późnych są wyniki pomiarów biometrycznych drzew, także różnicujące te dwie grupy wiekowe (tab. 1). Dlatego też nasze wyniki wskazują, że wpływ wieku drzew na zawartość fenoli w igłach ma znaczenie, ale wyłącznie wówczas, gdy w drzewostanach dokonywano zbiegów mających istotny wpływ na zmianę warunków świetlnych wzrostu igieł.

Oświetlenie ma ogromne znaczenie we wpływie na poziom fenoli w igłach, nawet w obrębie jednego pędu. Ma to miejsce szczególnie w warunkach dużego zacinienia, a więc dotyczy igieł starszych roczników. Starzenie się igieł jest nierównomierne i widoczne jest szczególnie u igieł trzyletnich. Igły rosnące na spodniej części pędu starzeją się i opadają wcześniej od rosnących na jego wierzchniej stronie (fot.). W trakcie starzenia się igieł mamy do czynienia z procesem lignifikacji tkanek, w którym prekursorami są związki fenolowe [Sarkanen 1971; Moura i in. 2010]. Stąd też w końcowym etapie życia igieł poziom związków fenolowych obniża się (ryc. 3). Podobnego typu zmiany w poziomie fenoli obserwowali Covelo i Gallardo [2001] wraz z dojrze-



Ryc. 2.

Wpływ wieku drzew na zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli w jednorocznych igłach sosny zwyczajnej
Influence of tree age on the content of total soluble phenols in the 1-year-old needles of Scots pine

P – istotność różnicy między drzewami w różnym wieku; ta sama litera oznacza brak istotnych różnic przy $P=0,05$ w teście Tukey'a; dodatkowo, przedstawiono odcinki prostych równań regresji oddzielnie dla drzewostanów 6-11-letnich ($R^2=0,130$; $P=0,14$) oraz 15-20-letnich ($R^2=0,490$; $P=0,0001$)

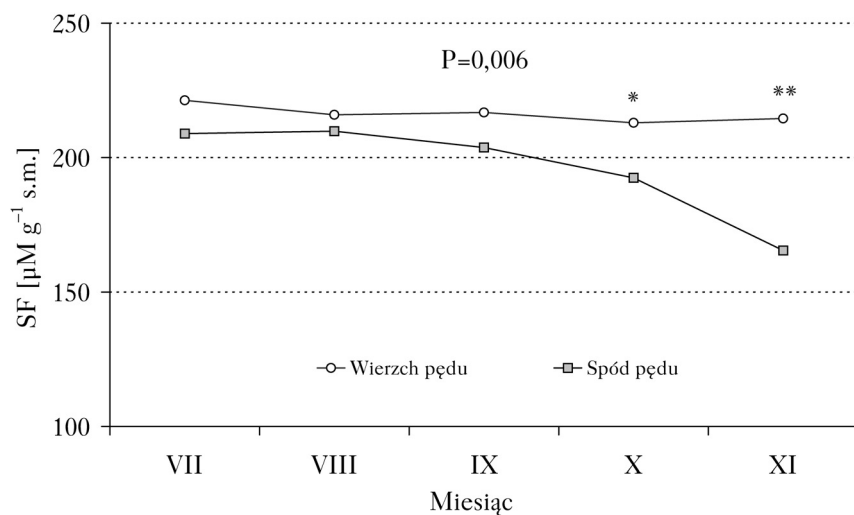
P – significance of difference between trees of different age; the same letters indicate no significant differences at $P=0.05$ in Tukey's test; additionally, we present regression lines separately for 6-11-year-old ($R^2=0.130$, $P=0.14$) and 15-20-year-old stands ($R^2=0.490$, $P=0.0001$)



Fot.

Pęd sosny z trzyletnimi igłami, które starzeją się wcześniej na spodniej (mniej oświetlonej) niż wierzchniej (bardziej oświetlonej) jego części (fot. P. Karolewski)

Scots pine shoot with 3-year-old needles, that age earlier on its bottom (shade conditions) than the upper (light conditions) part (photo: P. Karolewski)



Ryc. 3.

Wpływ lokalizacji igieł na zawartość sumy rozpuszczalnych fenoli w jednorocznych igłach sosny zwyczajnej w sezonie wegetacyjnym

Influence of needle location on the content of total soluble phenols in the 1-year-old Scots pine needles during the growing season

P – istotność różnicy między igłami obydwu części pędu (średnio w sezonie); * różnica między teminami istotna przy P=0,05; ** różnica między teminami istotna przy P=0,01

P – significance of difference between needles of both parts of the shoot (on average in the season); * difference significant at P=0.05; ** difference significant at P=0.01

waniem i starzeniem się liści dębu szypułkowego w zależności od natężenia światła. Ten fakt należy brać pod uwagę pobierając niewielką liczbę igieł/liści, a szczególnie pojedynczych krótkopędów lub pojedynczych igieł/liści do badań nie tylko poziomu fenoli, ale i zawartości innych metabolitów.

Podsumowanie

W niniejszej pracy wskazaliśmy, w jak dużym stopniu natężenie światła ma wpływ na poziom związków fenolowych. Badania wpływu światła na syntezę fenoli w zakresie światła fotosyntezy czynnego już dawno dowiodły jego wpływu na ten proces [Siegelman 1964 i cytowane przez niego prace]. Potwierdziły to również prace dotyczące wpływu światła na wzrost aktywności enzymów syntezy fenoli [Zucker 1965]. Wyniki te dotyczą jednak obserwacji efektu. Natomiast przyczynę podwyższonego poziomu związków fenolowych w warunkach dużego nasłonecznienia przypisuje się strategii obronnej roślin – utrzymywania większego poziomu fenoli w liściach/igłach typu słonecznego. Liście typu słonecznego mają lepsze warunki wzrostu i rozwoju oraz są bogatsze w białka i węglowodany i dlatego są bardziej atrakcyjne dla foliofagów. W myśl postulowanych przez wielu badaczy reguł, dotyczących równowagi C/N (ang. carbon/nutrient balance) oraz „coś za coś” (ang. trade off), część potencjału muszą one inwestować w kosztowną obronę, w tym w syntezę związków fenolowych [Barton, Koricheva 2010].

Na zakończenie trzeba dodać, że analizując zróżnicowanie w zawartości fenoli w liściach/igłach należy również wziąć pod uwagę, że istnieje jeszcze wiele innych przyczyn mających wpływ na poziom tych związków, takich jak warunki siedliskowe i przez to dostępność biogenów [Balsberg-Påhlsson 1992; Kraus i in. 2003; Giertych i in. 2005] czy pochodzenie drzew [Oleszek i in. 2002].

Podziękowania

Dziękujemy dr Izabeli Kałuckiej (Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Algologii i Mikologii) oraz mgr. inż. Pawłowi Horodeckiemu (Instytut Dendrologii PAN w Kórniku) za pomoc w trakcie zbioru materiału roślinnego do badań.

Literatura

- Balsberg-Påhlsson A. M. 1992. Influence of nitrogen fertilization on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Tree Physiology* 10: 93-100.
- 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.
- Bernays E. A. 1981. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. *Ecological Entomology* 6: 353-360.
- Brzezińska E., Kozłowska M. 2008. Effect of sunlight on phenolic compounds accumulation in coniferous plants. *Dendrobiology* 59: 3-7.
- Carmona D., Lajeunesse M. J., Johnson T. J. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology* 25: 358-367.
- Covelo F., Gallardo A. 2001. Temporal variation in total leaf phenolics concentration of *Quercus robur* in forested and harvested stands in northwestern Spain. *Canadian Journal of Botany* 79: 1262-1269.
- Cowan M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Giertych M. J., Bąkowski M., Karolewski P., Żytkowiak R., Grzebyta J. 2005. Influence of mineral fertilization on feed quality of oak leaves and utilization efficiency of feed components by the gypsy moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 117: 59-69.
- 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., 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., 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.

- Harborne J. B. 1997. Ekologia biochemiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Honkanen T., Haukioja E., Kitunen 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.
- 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., Kałucka I. 2008. Age-related changes in leaf area index of young Scots pine stands. *Dendrobiology* 59: 57-65.
- Jagodziński A. M., Kałucka I. 2010. Fine roots biomass and morphology in a chronosequence of young *Pinus sylvestris* stands growing on a reclaimed lignite mine spoil heap. *Dendrobiology* 64: 19-30.
- Jagodziński A. M., Oleksyn J. 2009a. Ekologiczne konsekwencje hodowli drzew w różnym zagęszczeniu. I. Wzrost i rozwój drzewostanu. *Sylvan* 153 (2): 75-85.
- Jagodziński A. M., Oleksyn J. 2009b. Ekologiczne konsekwencje hodowli drzew w różnym zagęszczeniu. II. Produkcja i alokacja biomasy, retencja biogenów. *Sylvan* 153 (3): 147-157.
- Jagodziński A. M., Oleksyn J. 2009c. Ekologiczne konsekwencje hodowli drzew w różnym zagęszczeniu. III. Stabilność drzewostanu, fitoklimat, różnorodność biologiczna. *Sylvan* 153 (4): 219-230.
- Johnson G., Schaal L. A. 1957. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acids in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease and resistance. *American Potato Journal* 34: 200-209.
- 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., Werner A. 2000. Wpływ grzybów ekto- i ektendomikoryzowych na poziom fenoli w korzeniach siewek sosny zwyczajnej rosnących w glebie skażonej przez toksyczne metale. *Sylvan* 144 (4): 69-75.
- 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.
- 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 applanata* (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.
- 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.
- Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. O. F., Dornelas M. C., Mazzafera P. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (4): 360-376.
- 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.
- 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.
- Salminen J.-P., Karonen M. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology* 25: 325-338.
- Sarkanen K. V. 1971. Precursors and their polymerization. W: Sarkanen K. V., Ludwig C. H. [red.]. *Lignins*. Wiley-Interscience, New York-London-Sydney-Toronto. 95-163.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Siegelman H. W. 1964. Physiological studies on phenolic biosynthesis. W: Harborne J. B. [red.]. *Biochemistry of phenolic compounds*. Academic Press, London and New York. 437-456.
- Singleton V. I., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

- Stevens M. T., Lindroth R. L. 2005. Induced resistance in the interminate growth of aspen (*Populus tremuloides*). *Oecologia* 145: 298-306.
- Sukovata L., Kolk A., Karolewski P., Smolewska M., Isidorov V. 2010. Wpływ żerowania owadów roślinożer-nych sosny na skład chemiczny igliwia, ściółki i gleby. *Sylwan* 154 (9): 639-648.
- Zucker M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acids synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40 (5): 779-784.
- Zulak K. G., Bohlmann J. 2010. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 86-97.
- Żmuda M., Karolewski P., Giertych M. J., Żytkowiak R., Bąkowski M., Grzebyta J., Oleksyn J. 2008. The effect of light conditions on leaf injury in underbrush shrubs caused by leaf-eating insects. *Acta Scientiarum Polonorum, Ser. Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria* 7 (3): 47-57.

SUMMARY

Influence of tree age, needle age and location in the crown on the phenolic compounds content in needles of young Scots pines

Phenolic compounds are one group of secondary metabolites in plants. They play a major role in plant resistance to biotic stress factors, such as herbivorous insects and pathogenic fungi. Knowing a plant's phenolic content we can predict the potential response and susceptibility of plants to such factors. In addition to large interspecies variation, the content of phenols in the leaves is significantly affected by plant growth light conditions. The content of phenols in plants growing under high light conditions and sun leaves is higher than in plants growing in shade and shade leaves, respectively. Among the internal factors, plant age and physiological state of leaf development determine to the greatest extent the content of phenols in leaves. We decided to examine how tree age and needle age influences directly and indirectly (due to different lighting) the level of phenols in needles. We investigated the influence of age (6-20-year-old) of Scots pine trees (*Pinus sylvestris* L.), of needles age and their location in the crown (whorls) and on the shoot on the total soluble phenolic compounds content in needles.

In determining the constitutive resistance of needles (no signs of the impact of feeding insects, infestation by pathogenic fungi and other damage), we found a statistically significant positive effect of needle age, and a negative effect of whorl age, but only in older needles. The tree's age was important, but it was not unidirectional and occurred only when the cleaning was conducted affecting the changes in light conditions of needle growth. Our observations also indicate that needles aged unevenly – needles growing in shade on the bottom part of the shoot ageing earlier than needles growing on the upper part of the shoot where light conditions are better. However, this is visible only in the oldest needles (3-year-old) and in the period of the needle fall. This is reflected in the lower level of phenols content in needles growing in the bottom part of the shoot, which is a consequence of the earlier started lignification process of needles.