

УДК 577.19:582.475+581.522.4 (571.1)

ИЗМЕНЧИВОСТЬ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ХВОИ НА КЛОНОВОЙ ПЛАНТАЦИИ *Pinus sylvestris* L.

В. В. Тараканов^{1,2}, Л. Н. Чиндяева³, Н. В. Цыбуля³, И. В. Тихонова⁴

¹ Западно-Сибирское отделение Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – филиал
ФИЦ КНЦ СО РАН
630082, Новосибирск, ул. Жуковского, 100/1

² Новосибирский государственный аграрный университет
630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

³ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

⁴ Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – Обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

E-mail: tarh012@mail.ru, lnikch@yandex.ru, ntsybulya@yandex.ru, selection@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 05.02.2016 г.

Оценена антимикробная активность летучих соединений хвои 23-летних клонов *Pinus sylvestris* L. методом «опарения» штриховых посевов микробных культур в чашках Петри. Исследования проведены 18 и 26 июля 2011 г. на трех тест-объектах – грамположительных бактериях *Staphylococcus epidermidis*, грамотрицательных бактериях *Escherichia coli* и дрожжеподобных грибах *Candida albicans*. Оценка антимикробного действия сосны проводилась в сравнении с контролем по шкале фитонцидной активности в баллах от 0 (отсутствие эффекта) до 4 (сильный эффект). Средний балл фитонцидной активности клонов по отношению к отдельным тест-системам варьировал в пределах 0.00–3.00. Выявлены слабая дифференциация клонов сосны к *Staphylococcus epidermidis* и отсутствие достоверных межклоновых различий по воздействию эфирных масел сосны на остальные микробные тест-объекты. Частота парных сравнений, в которых обнаружены достоверные различия между клонами, составляет менее 5 % для *S. epidermidis* и около 1.5 % для всех тест-микробов. Наряду с этим прослеживались высокодостоверные эффекты времени проведения тестов (календарной даты), вида тест-объекта («патогена») и взаимодействия «дата тестирования – патогены» и «дата тестирования – клоны», на которые в 3-факторном дисперсионном анализе приходится около 23, 33 и 15 % соответственно. Наиболее вероятными причинами этого являются динамика состава летучих соединений хвои и взаимодействие генотип – среда, что должно стать объектом более пристальных исследований. Очень важным в этой связи является вопрос о сезоне, который оптимален для надежного выявления генотипов сосны, отличающихся максимальной фитонцидностью. Выявлена отрицательная межклоновая (генотипическая) корреляция между фитонцидностью сосны к *S. epidermidis* и к *C. albicans*. Возможно, это обусловлено обратной пропорциональной зависимостью между содержанием определенных компонентов в эфирных маслах, которые отвечают за ингибирование различных патогенных организмов. При анализе генетических особенностей протестированных клонов выделяются их совокупности, достоверно различающиеся, с одной стороны, по фитонцидности к стафилококку *S. epidermidis*, с другой – по индивидуальной гетерозиготности аллозимных локусов. Такого рода дифференциация генотипов отмечена впервые и также может быть в фокусе дальнейших исследований.

Ключевые слова: межклоновая изменчивость сосны обыкновенной, антимикробная активность, микробные тест-объекты, метод опарения.

DOI: 10.15372/SJFS20170110

ВВЕДЕНИЕ

Фитонцидные свойства хвойных видов древесных растений изучают со второй половины XX в. Известны работы по исследованию антимикробной активности летучих веществ хвои важнейшей лесообразующей породы России сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. Отечественные авторы отмечают их высокую бактерицидность в отношении золотистого и белого стафилококка (Старовойтова, Лахно, 1967; Протопопов, 1975) и возбудителя дифтерии (Витгефт, 1952). Причем летучие выделения сосны обыкновенной подавляли рост колоний *Staphylococcus albus* в течение всего вегетационного периода (Власюк, 1981). Экспериментально доказано, что наиболее активные фитонциды сосна выделяет в молодом и среднем возрасте на втором году жизни хвои, однако к окончанию вегетационного периода различия в активности молодой и прошлогодней хвои уменьшаются (Григорьева, 2000; Кочергина, 2009). В отношении бактерицидного действия летучих выделений сосны обыкновенной на кишечную палочку имеются противоречивые сведения. По данным В. Н. Власюка (1970), под влиянием раневых фитонцидов сосны обыкновенной колонии этих бактерий полностью погибали. По сообщению А. Н. Пряжникова (1967), опарение культур кишечной палочки выделениями измельченной хвои сосны обыкновенной не оказывало заметного действия на рост бактериальных культур. Выявлено, что сосна обыкновенная в сравнении с другими хвойными (кедр, ель, можжевельник), произрастающими в условиях стационара Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, обладает наибольшей фитонцидностью к эпифитным микроорганизмам *Trichoderma* sp. и *Micrococcus* sp. (Сенашова, Сорокин, 2011). При этом максимум фитонцидной активности (июль) коррелирует с минимальным содержанием бактерий на хвое в этот период.

В работах российских исследователей используются преимущественно методы экспрессной оценки воздействия летучих веществ, естественным образом выделяющихся на микробную тест-систему из цельной или измельченной хвои. В работах зарубежных авторов, выполненных на сосне обыкновенной и других видах хвойных растений, преобладают методы дифференциальной оценки антимикробной активности различных компонентов летучих веществ, прежде всего фенолов и эфирных масел, предварительно экстрагируемых из хвои и других частей расте-

ния (Mimoune et al., 2013; Metsämuuronen, Siren, 2014). При этом выявляются отдельные компоненты, обладающие максимальной активностью к тем или иным патогенным микроорганизмам в сравнении с антибиотиками (Lungu Apetrei et al., 2011, 2013), оценивается их сезонная динамика (Kogica et al., 2015). В некоторых работах сообщается о том, что экстракты из различных частей деревьев сосны обыкновенной обладают различным действием на грамположительные и грамотрицательные бактерии (Yang, Jaakkola, 2012). Методами ассоциативного картирования с ДНК-маркерами выявляются гены, влияющие на устойчивость к патогенам и синтез компонентов эфирных масел (Plomion et al., 1996; Liu et al., 2015).

Каждый из описанных подходов имеет свои сильные и слабые стороны и может применяться на различных этапах исследований. Поскольку генетическая изменчивость антимикробной активности в сибирских популяциях сосны не изучена, на начальном этапе исследований более предпочтительны, на наш взгляд, методы экспрессной оценки фитонцидности хвои с использованием стандартных микробных тест-систем. При этом в качестве объекта исследований наиболее перспективны клоновые плантации сосны, созданные селекционерами (Тараканов и др., 2001). Идентификация клонов, контрастных по антимикробным свойствам, создаст основу для генетического анализа и выведения высокофитонцидных сортов-клонов. Судя по литературе, фитонцидную активность клонов сосны обыкновенной в России, в том числе в Сибири, еще не изучали. Поэтому цель работы заключалась в оценке особенностей изменчивости антимикробной активности хвои у клонов *Pinus sylvestris* в период ее активной вегетации (максимальной фитонцидности) в лесостепи Западной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Качественную оценку антимикробной активности летучих соединений хвои осуществляли на 7 клонах сосны *Pinus sylvestris*, произрастающих на ЛСП 1988 г. закладки в Озерском лесничестве Алтайского края (Тараканов и др., 2001). Клоны являются вегетативными потомками плюсовых деревьев, отобранных на интенсивность роста и качество стволовой древесины в Верхне-Обском лесосеменном районе (Лесосеменное районирование..., 1982). Однолетние побеги с хвоей из средней части южного секто-



Рис. 1. Оценка фитонцидной активности хвои клона на 279 с использованием тест-системы *S. epidermidis* (слева – опыт, справа – контроль).

ра кроны деревьев срезали и помещали в холодильный контейнер. Каждый клон представлен тремя случайно отобранными раметами. Через 6 ч после заготовки образцы охвоенных побегов доставляли в лабораторию Центрального сибирского ботанического сада СО РАН для анализа.

Исследования фитонцидной активности осуществляли 18 и 26 июля 2011 г. с использованием методики «опарения» летучими выделениями хвои посевов микробных тест-культур. Тест-микробами служили грамположительные бактерии *Staphylococcus epidermidis*, грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* и дрожжеподобные грибы *Candida albicans*. Для посева микробных культур применяли питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ-АГАР). В чашку Петри на поверхность питательной среды высевали суточную культуру микроорганизмов микробиологической петлей диаметром 2 мм (посев штрихом), по поверхности нижней чашки-«крышки» равномерно распределяли свежесобранную неизмельченную хвою сосны таким образом, чтобы исключить контакт с питательной средой. В каждую чашку с питательной средой, разделенную на 3 одинаковых сектора, одновременно высевали все 3 тест-объекта (рис. 1).

Опарение микроорганизмов летучими выделениями хвои осуществлялось в течение 4 ч с 12 до 16 часов при комнатной температуре, после чего чашки Петри помещали на 20 ч в термостат с температурой 37 °С (Цыбуля, 2001; Бакулин и др., 2010). Каждый клон испытывали в трех повторностях. Контрольными служили чашки с посевами микробиологических культур без растений. Оценка антимикробного действия лету-

чих выделений сосны проводили в сравнении с контрольными посевами по шкале фитонцидной активности: 0 – отсутствие действия, наблюдается сплошной рост микробной культуры; 1 балл – слабое действие, угнетение роста культуры в средней части посевов (не более 20–30 % длины штриха); 2 балла – умеренное действие (угнетение роста культуры до 40–50 % длины штриха); 3 балла – сильное действие, отмечен незначительный рост культуры только на концах штриха; 4 балла – очень сильное действие, полное отсутствие роста микробной культуры.

Распределения признака «фитонцидная активность», построенные по отклонениям от средних на клон, одномодальны и отличаются незначительной положительной асимметрией (вытянут правый хвост распределения). Учитывая высокую устойчивость t -критерия и дисперсионного анализа к отклонениям от нормальности распределений при фиксированном числе наблюдений (Глотов и др., 1982), статистическую обработку данных осуществляли с использованием этих методов в программе *Excel*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе испытаний ряда видов растений нами разработана шкала фитонцидной активности: 0.4–1.4 – низкая, 1.5–2.0 – умеренная, 2.1–2.5 – высокая, 2.6 балла и выше – очень высокая (Цыбуля, 2001; Бакулин и др., 2010). В целом летучие соединения хвои клонов *Pinus sylvestris* проявили умеренную активность ко всем испытанным микробным тест-объектам (табл. 1). Средний балл фитонцидной активности клонов в первый день тестирования (18.07.2011) варьировал в пределах 0.00–2.33, во второй (26.07.2011) был несколько выше и составлял 1.33–3.00 балла.

При этом различия в оценках между днями тестирования для тест-системы *E. coli* не достоверны ($t = 1.347$; $P = 0.192$; $v = 22$), в то время как для остальных тест-систем они статистически значимы на уровне $P < 0.001$ ($t = 3.969$ и 5.149 для *S. epidermidis* и *C. albicans* соответственно). Причем та же тенденция, хотя и на недостоверном уровне, прослеживается и для клона 517, который тестировали в обе даты. Очевидно, это обусловлено динамикой состава летучих веществ сосны, о которой пишут многие исследователи (Ткачев, 2008; Слепых, 2008; Korica et al., 2015). Учитывая это обстоятельство, мы посчитали целесообразным осуществлять сравнения между клонами с учетом даты тестирования.

Таблица 1. Средний балл фитонцидной активности клонов сосны по отношению к различным микробным тест-объектам. Объем выборки для каждого из вариантов $n = 3$

Клон	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
18 июля			
201	1.33 ± 0.333	2.00 ± 0.000	0.67 ± 0.333
269	1.00 ± 0.000	2.00 ± 0.577	0.33 ± 0.333
510	1.33 ± 0.333	1.33 ± 0.333	0.00 ± 0.000
514	0.67 ± 0.333	1.33 ± 0.333	0.67 ± 0.333
517	1.00 ± 0.577	2.33 ± 0.333	0.67 ± 0.333
Среднее	1.07 ± 0.153	1.80 ± 0.175	0.47 ± 0.133
26 июля			
204	1.67 ± 0.333	1.33 ± 0.333	3.00 ± 0.577
279	3.00 ± 0.000	1.33 ± 0.333	1.33 ± 0.333
517	2.00 ± 0.577	1.67 ± 0.333	2.00 ± 0.577
Среднее	2.22 ± 0.278	1.44 ± 0.176	2.11 ± 0.351

При сравнении средних на клон по t -критерию небольшие по величине, но достоверные различия между клонами наблюдаются лишь для тест-системы *S. epidermidis* в опыте 26 июля – между клонами 279 и 204: 3.00 ± 0.00 и (1.67 ± 0.33) балла соответственно (см. табл. 1) ($t = 4.000$; $P = 0.016$; $\nu = 4$).

Что касается различий между средними на микробную тест-систему, то они более выражены в первом опыте. Максимальное воздействие летучих веществ сосны зафиксировано для *E. coli* (1.80 балла), минимальное – для *C. albicans* (0.47). При этом различия между средними статистически достоверны во всех вариантах сравнений ($t = 2.953...6.070$; $\nu = 28$; $P < 0.01...0.001$). Однако во втором опыте вследствие существенного возрастания фитонцидной активности хвои в отношении к *S. epidermidis* и *C. albicans* (до 2.22 и 2.11 балла соответственно) различия между средними на тест-систему сглаживаются и достигают достоверного уровня лишь в варианте сравнения между *S. epidermidis* и *E. coli* (1.44 балла) ($t = 2.366$; $\nu = 16$; $P < 0.05$).

Многие исследователи тестировали те или иные виды и генотипы (штаммы) *Staphylococcus* sp. и *Escherichia coli* по их устойчивости к экстрактам из фитомассы сосны обыкновенной и близких к ней видов (Слепых, 2008; Kima et al., 2013; Laireiter et al., 2013; Metsämuuronen, Siren, 2014; Vainio-Kailia et al., 2015). Во всех этих работах отмечена высокая фитонцидная чувствительность золотистого стафилококка *S. aureus*, в том числе резистентных к определенным антибиотикам штаммов этого представителя грамположительных бактерий (Vainio-Kailia et al., 2015), а также меньшая чувствительность

E. coli, относящейся к грамотрицательным бактериям. В статье (Metsämuuronen, Siren, 2014) сделан вывод о большей чувствительности к фитонцидам грамположительных бактерий в сравнении с грамотрицательными. В наших экспериментах ранги устойчивости *S. epidermidis* и *E. coli* меняются в зависимости от даты тестирования. В работах, в которых наряду с указанными патогенами тестировали также дрожжеподобные грибы *Candida* sp., получены данные о высокой фитонцидности сосны в отношении бактерий, но данные в отношении грибных патогенов неоднозначны (Janssen et al., 1986; Chao et al., 2000). Это может быть обусловлено различиями как в методиках, так и в географическом происхождении сосны обыкновенной. Однако, если судить по нашим данным, это может быть вызвано и особенностями временной динамики фитонцидных свойств сосны.

Анализ средних значений косвенно свидетельствует о возможных взаимодействиях (неаддитивности) факторов. С целью проверки этого предположения и оценки относительного вклада различных факторов и их взаимодействий в общую дисперсию признака проведен дисперсионный анализ.

Вначале изучили структуру изменчивости признака для каждого из опытов, оценив воздействие двух факторов – «клоны» и «микробные тест-системы» (в табл. 2 и 3 последний фактор для краткости обозначен как «патогены») (табл. 2).

В первом опыте, как и следовало ожидать после анализа средних значений, обнаружено влияние лишь одного источника изменчивости – фактора «патогены», на который приходится около 54 % общей дисперсии признака.

Таблица 2. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа фитонцидной активности сосны, полученные при опарении различных микроорганизмов летучими веществами хвои различных клонов в опытах 18 и 26 июля

Источник изменчивости	Число ст. св.	Средний квадрат	Значение F статистики	Компонент дисперсии	Доля влияния, %
<i>18 июля</i>					
Клоны	4	0.44444	1.250	0.00988	1.3
Патогены	2	6.68889	20.407***	0.42407	53.7
Взаимодействие	8	0.32778	0.922	0.00000	0.0
Остаточный	30	0.35556		0.35556	45.1
Итого	44			0.78765	100.0
<i>26 июля</i>					
Клоны	2	0.03704	0.071	0.00000	0.0
Патогены	2	1.59259	0.878	0.00000	0.0
Взаимодействие	4	1.81482	3.500*	0.43210	45.5
Остаточный	18	0.51852		0.51852	54.5
Итого	26			1.06996	100.0

Примечание. * – $P < 0.05$, *** – $P < 0.001$.

Таблица 3. Характеристика трехфакторного дисперсионного комплекса

Источник изменчивости	Характеристика фактора	Число градаций	Структура среднего квадрата
Дата опыта P	Фиксированный	2	$\sigma^2 + 9\sigma_C^2 \dots + 27\sigma_P^2$
Клоны C	Случайный, иерархический к P	3	$\sigma^2 + 9\sigma_C^2$
Патогены T	Фиксированный	3	$\sigma^2 + \dots + 2\sigma_{CT}^2 + 18\sigma_P^2$
Взаимодействие PT		–	$\sigma^2 + \dots + 2\sigma_{CT}^2 + 9\sigma_{PT}^2$
» CT		–	$\sigma^2 + \dots + 3\sigma_{CT}^2$
Остаточный R		3	σ^2

Во втором опыте аддитивное влияние обоих факторов, в том числе фактора «патогены», совершенно не обнаруживается, однако имеет место достоверное влияние взаимодействия факторов «клоны – патогены», на которое приходится около 46 % общей дисперсии.

Перераспределение относительного вклада компонентов дисперсии во втором опыте косвенно указывает на взаимодействие исследуемых факторов с фактором «даты опыта». Для проверки этого предположения и получения интегральных оценок по структуре изменчивости фитонцидной активности осуществлен трехфакторный дисперсионный анализ. Для создания ситуации полной равномерности дисперсионного комплекса из первого опыта исключили клон 517, который испытывали в обоих опытах, и клон 514. Таким образом, анализ осуществлен в комплексе, включающем 2 опыта, в каждом из которых представлено по 3 клона, испытываемых на трех микробных тест-системах («патогенах») с одинаковым числом повторений в «ячейках» ($n = 3$) (табл. 3).

Отметим, что удаление любых двух других клонов из пяти, представленных в первом опыте, приводит к схожим результатам при оценке структуры изменчивости в трехфакторной схеме. При оценке математических ожиданий средних квадратов использовали рекомендации из работы (Гласс, Стэнли, 1976, с. 426–436).

Как и предполагали на основе результатов предыдущих анализов, значительная часть общей дисперсии (в сумме около 47 %) приходится на статистически значимые эффекты взаимодействий «даты опыта – патогены» и «клоны – патогены», которые максимально выражены в первом варианте взаимодействий (табл. 4).

Из этого следует, что различия в чувствительности к фитонцидам представителей грамположительных (*S. epidermidis*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий не постоянны, а зависят от даты тестирования. Вероятно, это обусловлено динамикой состава эфирных масел (Ткачев, 2008; Korica et al., 2015); другой причиной могут быть взаимодействия «генотип – среда». Оставшаяся часть дисперсии примерно

Таблица 4. Результаты трехфакторного дисперсионного анализа фитонцидной активности сосны, полученные при опарении различных микроорганизмов летучими веществами хвои шести клонов в двух опытах

Источник изменчивости	Число ст. св.	Средний квадрат	Значение F статистики	Компонент дисперсии	Доля влияния, %
Даты опыта P	1	8.9630	37.231***	0.3230	23.0
Клоны C	4	0.2407	0.591	0.0000	0.0
Патогены T	2	1.2407	1.218	0.0123	0.9
Взаимодействие PT	2	5.1296	5.036*	0.4568	32.6
» CT	8	1.0185	2.500*	0.2037	14.5
Остаточный R	36	0.4074		0.4074	29.0
Итого	53			1.4032	100.0

Примечание. * – $P < 0.05$, *** – $P < 0.001$.

поровну распределена между высокодостоверными эффектами дат тестирования и остаточной дисперсией (23 и 29 % соответственно). Аддитивные эффекты клонов и патогенов в объединенном комплексе практически не проявляются (в сумме менее 1 %).

Полученные данные о структуре изменчивости фитонцидной активности сосны, несмотря на небольшой объем выборки клонов, свидетельствуют о значительной экологической лабильности данного признака и представляют несомненный интерес для оценки перспектив выведения сортов-клонов с ингибирующими свойствами по отношению к различным потенциально патогенным микроорганизмам.

Прежде всего, интересен факт незначительной межклоновой изменчивости, которая выявляется с небольшой частотой лишь по отношению к отдельным тест-системам (в нашем случае к *S. epidermidis*). Частота парных сравнений, в которых обнаружены достоверные различия между клонами, составляет менее 5 % для *S. epidermidis* и около 1.5 % в целом для всех тест-микробов. Очевидно, что для поиска выдающихся по антимикробной активности генотипов сосны необходимо, по меньшей мере, резко увеличить число тестируемых клонов. Возможно, что уменьшению «остаточного» компонента дисперсии и лучшему выявлению межклоновых различий будет способствовать переход от качественных (глазомерных) к количественным оценкам фитонцидной активности. Возможно, что степень межклоновых различий также зависит от времени тестирования и оптимального периода вегетации для выявления контрастных генотипов.

На основании полученных данных кажется проблематичным обнаружение «универсальных» генотипов, обладающих повышенной активностью по отношению ко всем потенци-

альным патогенам. В этой связи отметим, что коэффициент межклоновой корреляции между оценками фитонцидной активности, полученными для разных тест-систем, или близок к нулю (в вариантах «*E. coli* – *S. epidermidis*» и «*E. coli* – *C. albicans*»), или отрицателен, составляя для варианта «*S. epidermidis* – *C. albicans*» $r_{xy} = -0.822$ ($v = 5$; $P = 0.025$) (рис. 2). В последней связи расчет обобщенного показателя фитонцидной активности в виде суммы отрицательно скоррелированных оценок (баллов), полученных для каждой из тест-систем, вряд ли имеет смысл.

Возможно, что обратно пропорциональная зависимость на рис. 2 связана с отрицательной корреляцией компонентов эфирных масел (Тихонова и др., 2014), дифференциально влияющих на выживаемость *S. epidermidis* и *C. albicans*. Например, известно, что в монотерпеновой фракции отрицательно коррелируют эфирные масла сосны Δ^3 -карен и α -пинен (Тараканов и др., 2004). При этом, по мнению некоторых исследователей (Чернодубов, Дерюжкин, 1990), первый из компонентов отвечает за устойчивость сосны

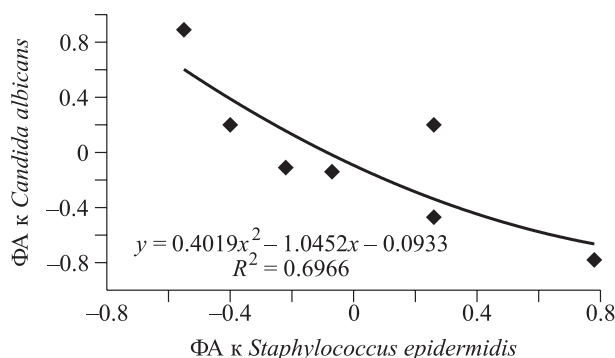


Рис. 2. Связь между показателями фитонцидной активности (ФА) клонов сосны, полученными при опарении тест-объектов *S. epidermidis* и *C. albicans* летучими веществами хвои семи клонов (по отклонениям от средних на опыт).

Таблица 5. Фитонцидная активность совокупностей клонов сосны, различающихся по гетерозиготности аллозимных локусов

Совокупность клонов	Клон	Гетерозиготность	Фитонцидная активность к <i>Candida albicans</i>
Низко-гетерозиготная	517	0.176	- 0.110
	269	0.235	- 0.140
	279	0.235	- 0.780
	510	0.235	- 0.470
	Среднее	0.220 ± 0.015	$- 0.375 \pm 0.158$
Высоко-гетерозиготная	201	0.353	0.200
	204	0.353	0.890
	514	0.412	0.200
	Среднее	0.373 ± 0.017	0.430 ± 0.199
<i>t</i>		6.765	3.168
<i>v</i>		5	5
<i>P</i>		< 0.01	< 0.05

к возбудителю корневой гнили базидиомицетовому грибу *Heterobasidion annosum*. Однако корреляционный анализ между содержанием этих компонентов в хвое и антимикробной активностью изученных клонов не выявил существенной связи между ними.

С другой стороны, обнаружена определенная связь между фитонцидной активностью клонов к *S. epidermidis* и их индивидуальной гетерозиготностью, оцененной по 10 полиморфным аллозимным локусам в совместной работе с лесными генетиками (Зацепина и др., 2014) (табл. 5).

Группа низкогетерозиготных клонов отличается и пониженной фитонцидной активностью, а группа высокогетерозиготных – повышенной. При этом выделенные совокупности отделены друг от друга «хиатусами» в распределениях обоих признаков. Если эта закономерность подтвердится на большем числе клонов, то гетерозиготность может использоваться в качестве своеобразного генетического маркера при диагностике клонов сосны, отличающихся высокой фитонцидной активностью к стафилококку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты оценки антимикробной активности 23-летних клонов сосны обыкновенной, впервые полученные для условий Сибири, в целом подтверждают данные о высокой фитонцидности хвои этого вида, регистрируемые для корнесобственных молодых и средневозрастных деревьев в других регионах.

При этом тестирование клонов сосны на трех микробных тест-системах, осуществленное в разные сроки, выявило ряд особенностей в изменчивости фитонцидной активности.

Наиболее существенное влияние на изменчивость исследуемого признака оказывают дата тестирования, взаимодействия этого фактора с факторами «патогены» (вид микробной тест-системы) и «клоны», на которые по данным трехфакторного дисперсионного анализа приходится около 23, 33 и 15 % соответственно. Наиболее вероятными причинами этого являются динамика состава летучих соединений хвои и взаимодействие генотип – среда, что должно стать объектом более пристальных исследований. Очень важным в этой связи является вопрос о сезоне, который оптимален для надежного выявления генотипов сосны, отличающихся максимальной фитонцидностью.

С учетом данных литературы о высокой генетической изменчивости популяций сосны по самым различным признакам (Семериков и др., 1998; Царев и др., 2002) несколько неожиданным оказался результат низкой межклоновой (генотипической) изменчивости этого вида по антимикробной активности. Частота парных сравнений, в которых обнаружены достоверные различия между клонами, составляет менее 5 % для *S. epidermidis* и около 1.5 % для всех тест-микробов. Это может быть проявлением взаимодействий генотип – среда.

С точки зрения проблемы отбора «универсальных» клонов, отличающихся высокой фитонцидностью к нескольким микробным тест-

системам, информативны полученные данные о существенной отрицательной межклоновой (генотипической) корреляции между фитонцидностью сосны к *S. epidermidis* и к *C. albicans*. Возможно, что это обусловлено обратно пропорциональной зависимостью между компонентами эфирных масел, которые отвечают за ингибирование различных патогенных организмов.

Наконец, при анализе генетических особенностей протестированных клонов выделяются их совокупности, достоверно различающиеся, с одной стороны, по фитонцидности к стафилококку *S. epidermidis*, с другой – по индивидуальной гетерозиготности. Такого рода групповая дифференциация генотипов отмечена впервые и также может быть в фокусе дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакулин В. Т., Чиндяева Л. Н., Цыбуля Н. В. Антимикробная активность листьев тополей и ив (*Salicaceae*) в Сибири // Проблемы региональной экологии. 2010. № 6. С. 60–64.
- Витгефт А. Е. Действие фитонцидов хвойных растений на возбудителя дифтерии // Фитонциды, их роль в природе и значение для медицины. М.: Изд-во АМН СССР, 1952. С. 225–229.
- Власюк В. Н. Фитонцидные и ионизирующие свойства основных древесных пород зеленой зоны г. Москвы: автореф. дис. ... канд. техн. наук. М., 1970. 30 с.
- Власюк В. Н. Фитонциды и средозащитная роль лесов // Фитонциды. Киев: Наук. думка, 1981. С. 146–148.
- Гласс Д., Стэнли Д. Статистические методы в педагогике и психологии. М.: Прогресс, 1976. 476 с.
- Глотов Н. В., Животовский Л. А., Хованов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. Л.: ЛГУ, 1982. 264 с.
- Григорьева М. В. Фитонцидные свойства насаждений лесопарковой части зеленой зоны города Воронежа: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 11.00.11. Воронеж, 2000. 21 с.
- Зацепина К. Г., Экарт А. К., Тараканов В. В., Белоконь М. М., Белоконь Ю. С., Ларионова А. Я., Политов Д. В., Кравченко А. Н. Генетическая изменчивость клоновых и естественных популяций сосны обыкновенной в Алтайском крае // Сб. мат-лов Всерос. науч. конф. «Лесные биогеоценозы бореальной зоны: география, структура, функции, динамика», Красноярск, 16–19 сент. 2014 г. Красноярск: Ин-т леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, 2014. С. 544–547.
- Кочергина М. В. Фитонцидные свойства сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях зеленой зоны г. Воронежа // Мат-лы Междунар. науч.-практ. конф. «Ландшафтная архитектура и садово-парковое строительство: современные проблемы». Воронеж, 2009. С. 121–130.
- Лесосеменное районирование основных лесобразующих пород в СССР. М.: Лесн. пром-сть, 1982. 368 с.
- Протопопов В. В. Средообразующая роль темнохвойного леса. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1975. 328 с.
- Пряжников А. Н. Фитонцидность основных растений кедровой тайги Алтая // Микроорганизмы и зеленое растение. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1967. С. 88–97.
- Сенашова В. А., Сорокин Н. Д. Влияние фитонцидной активности хвойных растений на эпифитные микроорганизмы в условиях Средней Сибири // Вестн. КрасГАУ. 2011. № 3. С. 93–97.
- Семериков Л. Ф., Исаков Ю. Н., Тараканов В. В., Семериков В. Л., Глотов Н. В. О генетико-селекционном аспекте сохранения и улучшения лесов России // Лесохоз. инф. Науч.-техн. информ. сб. М.: ВНИИЦлесресурс. 1998. № 9–10. С. 3–12, 29–40.
- Слепых В. В. Фитонцидная активность сосны и ионизация воздуха // Лесн. хоз-во. 2008. № 6. С. 20–21.
- Старовойтова Т. В., Лахно Е. С. Антимикробные свойства некоторых древесных и кустарниковых пород, применяемых в озеленении г. Киева // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства. Киев: Наук. думка, 1967. С. 82–84.
- Тараканов В. В., Демиденко В. П., Ишутин Я. Н., Бушков Н. Т. Селекционное семеноводство сосны обыкновенной в Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 2001. 230 с.
- Тараканов В. В., Самсонова А. Е., Ильичев Ю. Н. Влияние естественных и антропогенных факторов на генетическую изменчивость сосны в Приобье: состав терпентинных масел хвои // Лесоведение. 2004. № 5. С. 50–57.
- Тихонова И. В., Анискина А. А., Лоскутов С. Р. Коррелированность содержания легколетучих соединений хвои в популяционных выборках сосны обыкновенной на юге Сибири // Экология. 2014. № 4. С. 257–264.
- Ткачев А. В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск: Изд. полиграф. предпр. «Офсет», 2008. 969 с.
- Царев А. П., Погиба С. П., Тренин В. В. Генетика лесных древесных пород. М.: МГУЛ, 2002. 340 с.

- Цыбуля Н. В. Методика определения фитонцидной активности интактных растений // Раст. рес. 2001. Вып. 2. С. 106–115.
- Чернодубов А. И., Дерюжкин Р. И. Эфирные масла сосны: состав, получение, использование. Воронеж: Изд-во Воронежск. ун-та, 1990. 112 с.
- Chao S. C., Young D. G., Oberg C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses // J. Essent. Oil Res. 2000. V. 12. P. 639–649.
- Janssen A. M., Chin N. L. J., Scheffer J. J. C., Baerheim Svendsen A. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. Statistics and correlations // Pharmaceutisch Weekblad. 1986. V. 8. Iss. 6. P. 289–292.
- Kima H., Leeb B., Yunc K. W. Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three *Pinus* species // Industrial Crops and Products. 2013. V. 44. P. 323–329.
- Korica A., Polis O., Spalvis K., Bartkevics V. Quantitative and qualitative seasonal changes of Scots pine and Norway spruce foliage essential oils in Latvia, and the extraction dynamics thereof // Baltic Forestry. 2015. V. 21. N. 1 (40). P. 51–58.
- Laireiter C. M., Schnabel T., Köck A., Stalzer P., Petutschnigg A., Oostingh G. J., Hell M. Active anti-microbial effects of larch and pine wood on bacterial strains // BioResources. 2013. V. 9 (1). P. 273–281.
- Liu Q., Zhou Z., Wei Y., Shen D., Feng Z., Hong S. Genome-wide identification of differentially expressed genes associated with the high yielding of oleoresin in secondary xylem of Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb) by transcriptomic analysis // PLoS ONE. 2015. V. 10 (7): doi:10.1371/journal.pone.0132624.
- Lungu Apetrei C., Şpac A., Brebu M., Tuchiluş C., Miron A. Composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of a full grown tree of *Pinus cembra* L. from the Calimani mountains (Romania) // J. Serb. Chem. Soc. 2013. V. 78 (1). P. 27–37.
- Lungu Apetrei C., Tuchiluş C., Aprotosoai A. C., Oprea A., Malterud K. E., Miron A. Chemical, antioxidant and antimicrobial investigations of *Pinus cembra* L. bark and needles // Molecules. 2011. V. 16. P. 7773–7788.
- Metsämuuronen S., Siren H. Antibacterial compounds in predominant trees in Finland: Review // J. Bioprocess Biotech. 2014. V. 4: doi: 10.4172/2155-9821.1000167.
- Mimoune N. A., Mimoune D. A., Yataghene A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pinus pinaster* // J. Coastal Life Medicine. 2013. V. 1 (1). P. 55–59.
- Plomion C., Yani A., Marpeau A. Genetic determinism of δ^3 -carene in maritime pine using RAPD markers // Genome. 1996. V. 39. N. 6. P. 1123–1127.
- Vainio-Kailia T., Kyyhkynen A., Rautkari L., Siitonen A. Antibacterial effects of extracts of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus pneumoniae* // BioResources. 2015. V. 10 (4). P. 7763–7771.
- Yang G., Jaakkola P. Extractives with Antimicrobial Properties from Scots Pine. BIOTULI project. Saimaa Univ. Appl. Sci. 2012. 18 p. www.biotulihanke.fi/en

VARIABILITY OF NEEDLE ANTIMICROBIC ACTIVITY IN CLONE PLANTATION OF SCOTS PINE *Pinus sylvestris* L.

Tarakanov V. V.^{1,2}, Chindyaeva L. N.³, Tsybulya N. V.³, Tikhonova I. V.⁴

¹ West-Siberian Department of V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch

Zukovsky str., 100/1, Novosibirsk, 630082 Russian Federation

² Novosibirsk State Agrarian University

Dobrolyubov str., 160, Novosibirsk, 630039 Russian Federation

³ Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch

Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090 Russian Federation

⁴ Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch

Solitary Unit V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch

Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: tarh012@mail.ru, lnkch@yandex.ru, ntsybulya@yandex.ru, selection@ksc.krasn.ru

Streak inoculation of microbial test-cultures was treated with volatile emissions of needles of 23-years clones of *Pinus sylvestris* L. The study was conducted in July 2011 on three test-objects – gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis*, gram-negative bacteria *Escherichia coli* and yeast-like fungi *Candida albicans*. Antimicrobial effect of pine volatile emissions was assessed in comparison with the control on 0 (absence of the effect) – 4 (strong effect) scale of antimicrobial activity. The mean marks of antimicrobial activity of clones, calculated in relation to separate test-systems, were within the limits of 0.00–3.00. The weak differentiation of pine clones to *S. epidermidis* is revealed. Frequency of pair comparisons in which statistically significant differences between clones was found to be less than 5 % for *S. epidermidis* and about 1.5 % for all the test-microbes. Alongside with it significant effects of the time of testing (calendar dates), a microbial species («pathogens») and interactions «date of testing-pathogens» and «date of testing-clones» were revealed: in ANOVA their effects amounted to nearly 23, 33 and 15 % of the total dispersion accordingly. The most probable reasons for it are dynamics of structure of essential oils and «genotype-environment» interaction that should become object of future research. In this connection, an important question is what is the season that is optimum for reliable revealing of the pine genotypes with maximal antimicrobial activity? Negative between-clones (between-genotypes) correlations between antimicrobial activity to *S. epidermidis* and to *C. albicans* are revealed. It is probably caused by inversely proportional dependence between concentrations of the components in essential oils, which are responsible for inhibition of various pathogenic organisms. The sample of investigated clones was divided into two sub-samples that sufficiently differed by the levels of both antimicrobial activity to *S. epidermidis* and individual heterozygosity of allozyme's loci. Such differentiation of genotypes is noted for the first time, and can be in focus of further studies.

Keywords: between clonal variability of Scots pine, antimicrobial activity, microbe test objects, the pair method.

How to cite: Tarakanov V. V., Chindyaeva L. N., Tsybulya N. V., Tikhonova I. V. Variability of needle antimicrobial activity in clone plantation of Scots pine *Pinus sylvestris* L. // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2017. N. 1: 95–104 (in Russian with English abstract).