БИОХИМИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ НА БУКОВИ ЛИСТА ПОВРЕДЕНИ ОТ *ORCHESTES FAGI* L.

Петя Димитрова-Матева[1], Елена Шопова[2], Сергей Иванов[3], Павел Керчев[4], Люба Митева[5], Вера Алексиева[2]
[1]Лесотехнически университет, София, България
[2]Институт по физиология на растенията и генетика, България
[3]Център по биология на храните, България
[4]Ghent University, Belgium
[5]Ресбиомед ООД, България

Резюме

Обикновеният бук *Fagus sylvatica* L. е един от основните лесообразуватели в България. Хоботникът *Orchestes fagi* L. е най-често срещаното листоминиращо насекомо по бука и се наблюдава в ежегодния мониторинг на горските екосистеми. В настоящото проучване е направена биохимична и физиологична характеристика на някои защитни реакции на растенията в нападнати от буковия скокльо листа на бук. Изследването е извършено в периода 2005-2006 г. и е пионерно за България. То спомага за по-дълбокото разбиране на механизмите за повишаване на устойчивостта на горско-дървесните видове към биотичен стрес. В нападнатите листа на бук отсъства увеличение в нивата на маркерите за оксидативни увреждания, но се установява покачване в количествата на фенолите и иминокиселината пролин и изменения в активностите на основните антиоксидантни ензими. Въз основа на получените резултати може да се твърди, че хоботникът причинява физиологичен и биохимичен стрес в нападнатите букови листа и активира специфични защитни реакции.

Ключови думи: *Orchestes fagi* L., биотичен стрес, устойчивост.

Key words: *Orchestes fagi* L., biotic stress, sustainability

JEL: Q560.

Увод

През последните няколко години в България се засили интересът към листоминиращите насекоми. Повредите от тях са свързани с унищожаване на част от паренхимната тъкан на листата като епидермисът остава незасегнат. Така няма загуба на листна площ, но се редуцира фотосинтезиращата повърхност и годишният прираст намалява.

Един от основните лесообразуващи видове в България е обикновения бук *Fagus sylvatica* L. В Европа, където е естествения ареал на обикновения бук са регистрирани дванадесет вида листоминиращи насекоми (Hering, 1957). Единственият вид от разред Coleoptera е буковият скокльо *Orchestes fagi* Linnaeus, fam Curculionidae. Неговата биоекология е проучена от много автори (Bale, 1978; Nielsen, 1966, Сталев, 1990; 2011 и др.).

Устойчивостта на растенията към патогени и насекоми е свързана с адаптацията на растенията към тези стресори и изработването на активна защита срещу тях. Биологичните стресови фактори, какъвто е буковия скокльо, винаги са съпроводени с развитие на свободнорадикалови реакции, т.е. оксидативен стрес в засегнатите гостоприемници. В хода на еволюцията растенията са развили ендогенни защитни системи, намаляващи увреждания, предизвикани от оксидативния стрес. Най-общо антиоксидантните системи могат да се разделят на ензимни и неензимни. От неензимните в нашето изследване бяха включени водоразтворимото тиолсъдържащо съединение глутатион; някои продукти от вторичния метаболизъм на клетките – феноли и иминокиселината пролин. Към защитните ензими се причисляват белтъци, способни директно да обезвреждат активните кислородни форми (АКФ) или такива, участващи в детоксификацията на увредените от АКФ молекули. Например, супероксидните радикали се редуцират до водороден пероксид от ензима супероксиддисмутаза. От своя страна, водородният пероксид се обезвреждa до вода и кислород от каталазата и пероксидазите. Много изследвания показват, че устойчивостта на растенията към абиотичен и биотичен стрес корелира с количествата на антиоксидантните съединения и активността на съответните ензими.

Настоящето изследване е първия опит за изучаване на ролята на антиоксидантната защита на бука спрямо нападание от листоминиращото насекомо *Orchestes fagi.* За постигането на тази цел е изработена оригинална моделна постановка и в дългосрочен план (5 месеца) са проследени измененията в редица биохимични показатели в здрави и повредени от буковия скокльо листа.

1. Обект и методи на работа

Изследването е извършено в периода 2005–2006 г. в УОГС "Петрохан" и е пионерно за България. Не са открити други подобни изследвания свързани с горско-дървесни видове и листоминиращите насекоми по тях.

1.1. Теренна работа

Теренната работа включва събиране на листа от *Fagus sylvatica* L. за лабораторен анализ. Обикновеният бук е вид, твърде взискателен към условията на месторастене. Добре понася ниските температури. Той понася добре и високите температури, но при условия на висока въздушна и почвена влажност. Най-добре расте на леки, проветриви, умерено влажни и богати почви. Буковите дървета, от които са взети листа, се намират в УОГС „Петрохан" при оптимални за развитието на вида условия. Листните проби са взети през месеците април и май, когато ларвите на насекомото са 2-3 възраст; и през месец август – за да се проследят промените при храненето от възрастните индивиди. За извеждане на експериментите са подбирани последователни двойки листа, които са на относително еднаква възраст, фаза на развитие и са се формирали при еднакви условия на околната среда. Единият лист от всяка такава двойка е здрав, без видими анатомо-морфологични увреждания и той беше използван като контрола. Вторият лист е нападнат от ларвата на *O. fagi* и върху него има характерната за този вид повреда. Всяка подбрана съобразно тези критерии двойка листа е маркирана, номерирана и откъсната заедно с клонката, на която расте. Клонките са потопени в пластмасови съдове с чешмяна вода и се съхраняват във фитостатна камера с контролирани условия (фотопериод 12 светло/12 часа тъмно; температура 25 °C; осветеност 90 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$; относителна влажност 60–70%). Анализите са извършени на минимум 6 двойки листа.

1.2. Лабораторна работа

Лабораторната работа включва биохимични анализи на буковите листа, в т.ч. измененията в нивата на оксидативни увреждания в мембраните, количествата на някои ендогенни защитни съединения (пролин, общи феноли и глутатион), както и активностите на основните антиоксидантни ензими (каталаза, неспецифични пероксидази, супероксиддисмутаза и глутатион редуктаза). Методите, които са използвани са:

- Определяне на *степента на липидно пероксидиране* (малондиалдехид – МДА), по метода на Dhindsa et al. (1981)
- Отчитане на ендогенните концентрации на следните защитни съединения: съдържание на *свободен пролин* (по метода на Bates (1973); *общи феноли* (по метода на Swain и Goldstein (1964); *глутатион* (по метода на Gronwald и др. (1987).
- Отчитане на активностите на основните антиоксидантни защитни ензими: *каталаза* (по метода на Aebi (1983), обща *пероксидазна активност* (по метода на Dias и Costa (1983); *супероксиддисмутаза* – по метода на Beauchamp и Fridovich (1971); *глутатион редуктаза* - по Smith и колектив (1988);
- Измерване съдържанието на разтворими белтъци – Bradford (1976).

1.3. Статистически анализ

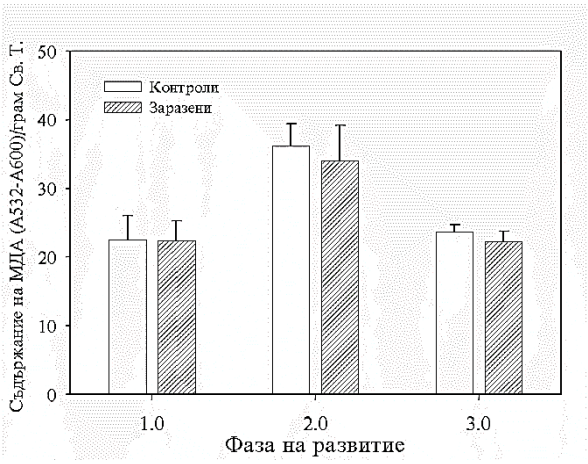
Получените резултати са подложени на статистическа обработка, съобразно t-теста на Student.

Данните, представени на фигурите, са средни стойности от минимум 2 независими експеримента, всеки в 2–4 повторения.

2. Резултати и обсъждане

2.1. Влияние на нападението от Orchestes fagi L. върху степента на увреждания на мембраните

Малондиалдехидът (МДА) е краен продукт на окислението на ненаситените мастни киселини влизащи в състава на липидите. Този показател се използва като индикатор за степента на увреждания в клетъчните мембрани [12]. Ендогенните концентрации на МДА се увеличават при растения подложени на въздействието на редица неблагоприятни фактори на околната среда – хербициди, засоляване на почвите, воден дефицит, високи температури и др. [3, 18]. Първоначалните експерименти показаха увеличение в нивото на МДА в растенията нападнати от *Orchestes fagi* L. Последващите изследвания обаче не потвърдиха тази тенденция с достатъчна статистическа достоверност. От данните, получени при анализите през 2006 г. и представени на фигура 1 се вижда, че нападението от насекомото не променя значително количеството на МДА в листата, т.е. не се развива окислителен стрес.



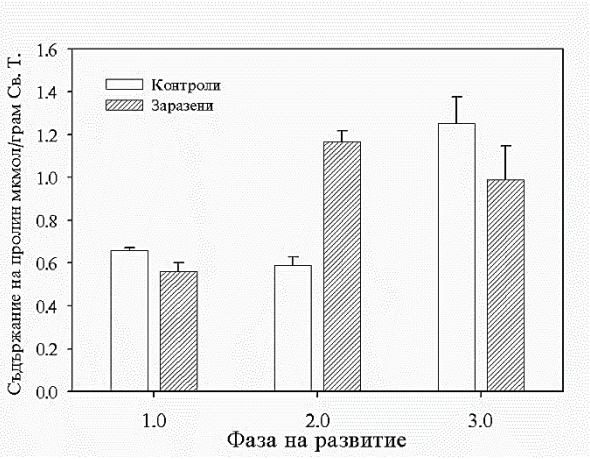
Фиг. 1. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху количеството на малондиалдехида (МДА). Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

Разбира се този резултат е валиден при определяне на съдържанието на МДА в цялата листна петура. На локално ниво, около мините на ларвата, количеството на МДА е повишено, но това очевидно не се отразява на останалите незасегнати тъкани от листа. На базата на този резултат ние считаме, че растенията най-вероятно развиват механизъм за локализиране на увреждания от буковия скокльо и така предпазват здравите части от листата.

2.2. Изменения в ендогенните нива на защитните съединения пролин, феноли и глутатион.

Известно е, че съдържанието на иминокиселината **пролин** в растенията се повишава в резултат на различни стресови въздействия. Все по-често функциите на пролина в клетката се свързват с обезвреждане на АКФ (активните кислородни форми).

Нашите изследвания показват, че нападението от *Orchestes fagi* води до интересни изменения в съдържанието на пролин (Фиг. 2).

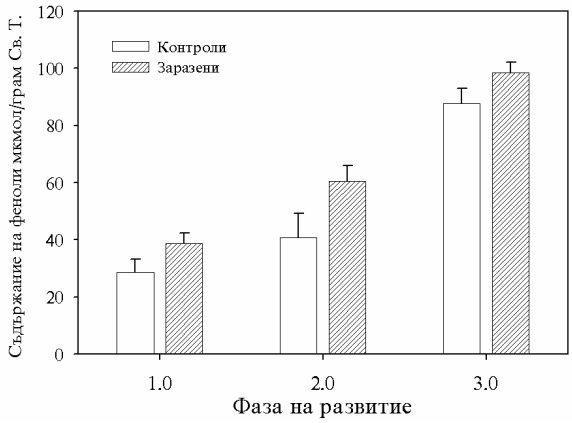


Фиг. 2. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху количеството на свободния прролин. Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

При първото измерване (месец април) се наблюдава леко понижение в количеството му, последвано от силно повишение няколко седмици по-късно (3-ра възраст на ларвата; май). Тъй като ларвите в първа и втора възраст правят сравнително малки мини, растението е в състояние да се справи с индуцирания стрес. В трета ларвна възраст, обаче, повредената площ е значително по-голяма. Стресовото въздействие е значително по-силно, което води до покачване в нивата на пролина, който изпълнява ролята на осмопротектант, предпазващ растенията от загуба на тургур и дехидратация.

През август, когато няма активна ларва в листата на бука, не се отчитат статистически значими изменения в съдържанието на пролин в нападнати и здрави листа. Това ни дава основание да приемем, че в нашата експериментална система пролинът има защитно действие, проявяващо се при по-големи по площ листни увреждания.

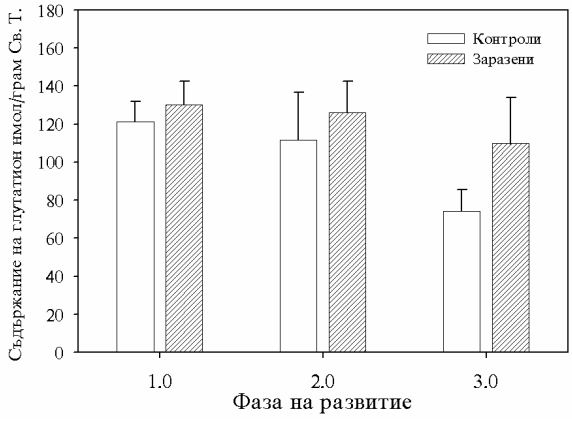
Фенолните съединения са вторични метаболити, изпълняващи разнообразни функции в растенията. Редица изследвания демонстрират, че фенолите са мощни антиоксиданти и участват в предпазването на клетките от оксидативни увреждания [2]. Много феноли се синтезират специфично в отговор на заразяване от патогени. Като цяло, фенолите се приемат като едно от основните "оръжия" на растителните клетки в борбата с инвазията на вируси, бактерии, гъби и насекоми. Нападението от буковият скокльо води до увеличение в количеството на общите фенолни съединения (Фиг. 3).



Фиг. 3. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху количеството на общите феноли. Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

Изразено в проценти спрямо контролите повишението е съответно с 35,4% (1-во измерване, април) и с 12% (3-то измерване, август). Тенденцията за увеличение на фенолното съдържание в листата заразени с *O. fagi* е очевидна, въпреки че в абсолютни стойности това покачване не е драстично. Най-вероятно клетките синтезират в отговор на нападението специфични фенолни съединения.

Глутатионът е основен нискомолекулен тиол в растенията. Той е част от глутатион-аскорбатния цикъл - основният механизъм за обезвреждане на водородния пероксид [10] Най-общо, освен глутатиона, в него се включват аскорбата (витамин С) и няколко ензима – аскорбат пероксидаза, глутатион редуктаза, монодехидроаскорбат редуктаза и дрехидроаскорбат редуктаза Всяка промяна в количествата му е достоверен индикатор за развитието на оксидативни процеси в растителните тъкани [16]. В нашите експерименти не се наблюдават статистически значими изменения в съдържанието на глутатион (Фиг. 4). Това показва, че нападението на буковия скокльо не води до свръхпродукцията на АКФ и съответно, до активацията на глутатион-аскорбатния цикъл.

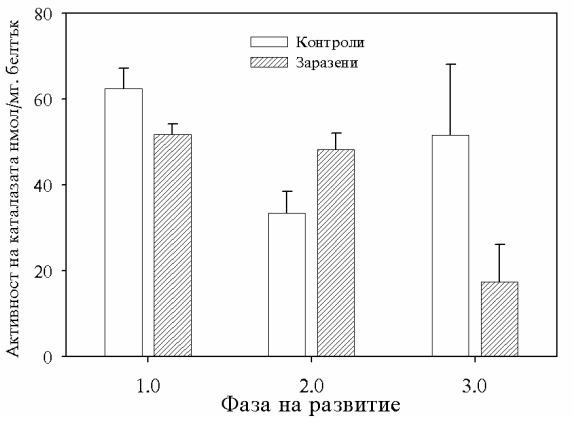


Фиг. 4. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху количеството на тоталния глутатион. Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

2.3. Влияние на нападението от Orchestes fagi върху активностите на основните антиоксидантни ензими.

В хода на еволюцията растенията са придобили комплекс от ензими, способни да разграждат АКФ и токсичните продукти от тяхното действие. Измененията във функциите на тези ензими са сигурен показател за състоянието на клетъчната антиоксидантна защита.

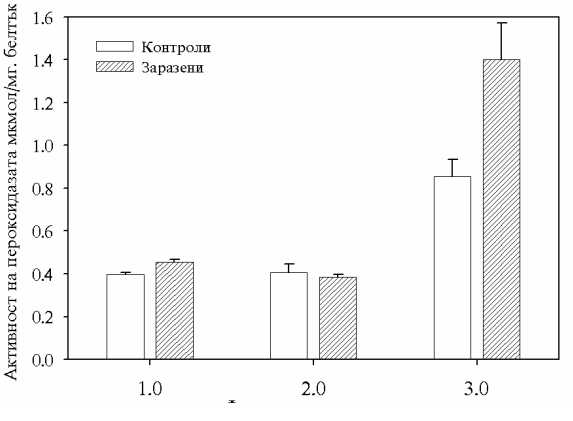
Каталазата и пероксидазите са основните ензими детоксификиращи водородния пероксид. Каталазата разгражда водородния пероксид до вода и кислород директно, без да използва допълнителни субстрати като донори на електрони. Резултатите от определянето на активността на каталазата в листа от бук нападнати от *Orchestes fagi* са представени на Фиг. 5.



Фиг. 5. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху активността на каталазата. Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

Първоначално (1-во измерване, април) в заразените листа се наблюдава инхибиция на ензима. При второто определяне обаче е установено покачване с 35% над контролите. В края на сезона (август), след напускане на имагото, в увредените листа каталазната активност е силно редуцирана.

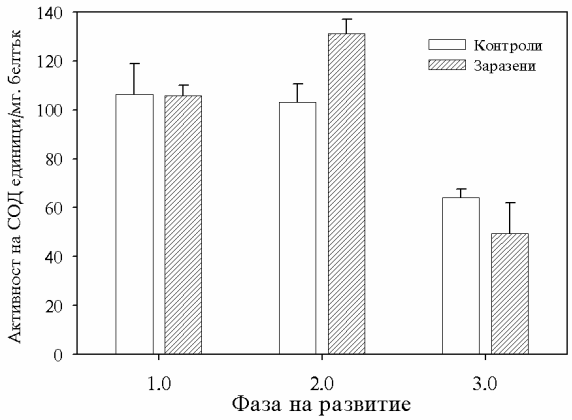
Подобно на каталазата, **пероксидазата** обезвреждa водородния пероксид [17]. За разлика от първата обаче, пероксидазата изисква наличието на донор на електрони. Това изискване я поставя в зависимост от функционирането на редица вторични метаболитни процеси в растителните клетки. Освен това в растенията пероксидазата изпълнява и други функции – например в лигнификацията на клетъчните стени в тъкани атакувани от фитопатогени. Поради тази причина нашите очаквания бяха, че нападението от *O. fagi* ще доведе до силно активиране на ензима. Изненадващо, при първите два опита, през април и май, ние не установихме по-съществени изменения в активността на пероксидазата (Фиг. 6).



Фиг. 6. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху активността на пероксидазата. Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

При третото измерване обаче, в листата на букът изгризани от имагото се наблюдава силно активиране на пероксидазата. Резултатът съвпада с данните получени от аналогичния опит проведен през август 2005 г. Този пост-травматичен ефект от развитието на насекомото е заинтригуващ. Възможно е активирането на пероксидазите да е следствие на механизъм, водещ до локализирането на увредените тъкани от листата чрез лигнификация на граничните клетъчни стени. При всеки случай не е ясно защо активирането на пероксидазата се наблюдава чак след напускане на листата от имагото. Възможно е насекомото да отделя вещества блокиращи клетъчния отговор. Разбира се увеличаването на пероксидазната активност може да има и друго обяснение. Често механичните уреждания на растителните тъкани водят до гъбни и бактериални инфекции, а изгризванията, предизвикани от имагото, са идеални ареали за развитието на вторични патогенни инвазии.

Супероксиддисмутазата (СОД) е единствения познат в биологичните обекти ензим способен да редуцира изключително реактивоспособните супероксидни радикали до по-малко токсичния водороден пероксид. Негови изоформи са локализирани в хлоропластите, митохондриите и цитозола. В растенията, продуцирания от СОД водороден пероксид се обезвреждa впоследствие от каталазите, пероксидазите и глутатион-аскорбатния цикъл [12]. В нашите експерименти активността на СОД остава непроменена при първото (април) и третото измерване (август), но подобно на каталазата (Фиг. 5), се наблюдава повишение в опита проведен през месец май (Фиг. 7).

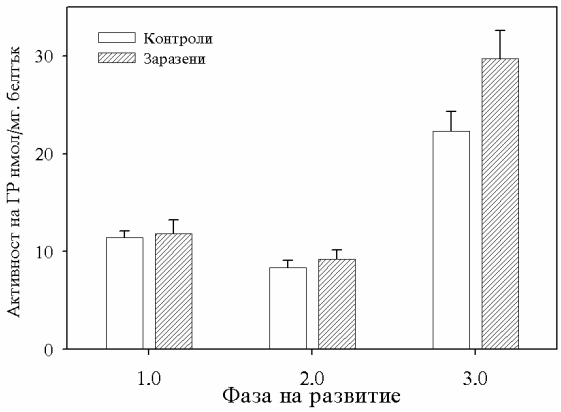


Фиг. 7. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху активността на супероксиддисмутазата (СОД). Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

Интересно е, че активностите и на двата антиоксидантни ензима (каталаза и СОД) се увеличават при второто измерване. Това свидетелства за развитието на оксидативни процеси в растителните тъкани, но както отбелязахме по-горе, тези процеси не водят до детектеруеми увреждания (освен в областите директно изгризани от насекомото) в листната петура (повишаване на МДА, фиг. 1). Следователно, нивото на генерираните АКФ в атакуваните от *O. fagi* листа е достатъчно ниско за да не предизвика увреждания в мембраните и в същото време е достатъчно, за да активира два от основните антиоксидантни ензими на растенията.

Глутатион редуктазата (ГР) е ключов ензим от глутатион-аскорбатния цикъл [15]. Нивото на експресия и активността на ГР са критерий за способността на глутатион-аскорбатния цикъл да обезвреждa водороден пероксид като цяло. В нашите експерименти активността на ГР не се изменя статистически достоверно при първите две измервания (април и май) (Фиг. 8).

Известно повишение (с 33% над контролите) се наблюдава единствено в опита проведен през август. Като цяло, липсата на значителни промени в ГР корелира с аналогичния резултат, получен по отношение на ендогенната концентрация на глутатиона. Двата показателя се изменят в синхрон, като слабо статистическо значимо покачване се наблюдава само при последното измерване.



Фиг. 8. Ефект от нападението на *Orchestes fagi* върху активността на глутатион редуктазата (ГР). Фази на развитие: 1. 2–3 възраст на ларвата (април); 2. 3-та възраст (май); 3. Изгризване на имагото (август)

Изводи

Настоящето изследване показва, че нападението от листоминиращото насекомо не води до развитие на „типичен“ оксидативен стрес в засегнатите букови листа. Не се установява повишение в нивата на оксидативни увреждания (МДА) или силна активация на защитните системи. Установено е известно повишаване на антиоксидантната защита при 2-рото и 3-тото измерване, като профилът е различен. През месец май се покачва активността на каталазата и СОД, както и съдържанието на пролин. Три месеца по-късно (август), когато профилът на увреждaнията по листа вече е основно от имагото, се активират глутатиона, глутатион редуктазата и пероксидазата. Това показва, че антиоксидантната защита на растенията реагира по-специфичен начин в

различните фази на развитие на буковия скокльо, като причините за това поведение са неизвестни.

Като цяло направената биохимична характеристика на измененията в минираните листата е недостатъчна за пълното изясняване на проблема. Следващи по-задълбочени изследвания са необходими за да се разкрият взаимоотношенията вредител - гостоприемник, да се анализират механизмите за повишаване на устойчивостта на дърветата към биотичен стрес, което ще бъде и принос към търсенето на средства за борба с листоминиращите насекоми.

Благодарности

Настоящото проучване е осъществено и финансирано по проекти към НИС при ЛТУ № 105/2005 г. и №8/2006 г.

Литература

13. Aebi, H. (1983). *Catalase In: Methods in enzymatic analysis*. Bergmeyer HU (ed), Vol 3. New York, Academic Press, 1983, pp. 276–86.
14. Ahmad, P., C. A. Jaleel, M. A. Salem, G. Nabi, S. Sharma. (2010). *Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress*. Critical Reviews in Biotechnology. 2010. 30(3), pp. 161–175.
15. Alexieva, V. S. Ivanov, I. Sergiev, E. Karanov, (2003). *Interaction between stresses*. Bulgarian Journal Plant Physiology Special issue (Proceedings of the European Workshop on Environmental Stress and Sustainable Agriculture), 2003, pp. 1–18.
16. Bale, J. S, M. L. Luff. (1978). *The food plants and feeding preferences* of the beech leaf mining weevil, Rhynchaenus fagi L. Ecological Entomology, 1978, 3(4), pp. 245–249.
17. Bates, L. (1973). *Rapid determination of free proiline content for water stress studies*. Plant Soil, 1973, 39, pp. 205–207
18. Beauchamp, C, I Fridovich, Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 1971, 44, p. 276–287.
19. Bradford, M. (1976). *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 1976, 72, pp. 248–254.
20. Dhindsa R., Plumb-Dhindsa P., Thorpe T. (1981*). Leaf senescence: correlated with increased leaves of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase*. Journal of Experimental Botany, 1981, 32(1), pp. 93–101.
21. Dias, Ì., M. Costa. (1983). *Effect of low salt concentration on nitrate reductase and peroxidase of sugar beet leaves*. Journal of Experimental Botany, 1983, 34(142), p. 197–202.
22. *Foyer C., B. Halliwell. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism*. Planta, 1976, 133(1), pp. 21–25.
23. Gronwald, J, P.E. Fuerst, C, Eberlein, M. Egli. (1987). *Effect of herbicide antidote on glutathione content and glutathione-S-transferase activity of sorghum shoots*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1987, 29, pp. 66–76.
24. Halliwell, B. J. Gutteridge. (2002). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. Oxford University Press, Oxford, 2002. pp. 823.
25. Hering, E. M. (1957). *Bestimmungstabellen der Blattminen von Europa einschließlich des Mittelmeerbeckens und der Kanarischen Inseln*. 1957, Band 1–2: Bestimmungsschlüssel, p. 1185; Band 3: Zeichnungen, p. 211.
26. Nielsen, B. O. (1966). *Studies on the fauna of beech foliage 2. Contributions to the Biology of the early stages of the beech weevil [Rhynchaenus (Orchestes) fagi L.] (Coleoptera, Curculionidae)*. Natura Jutlandica, 1966, 12, pp. 162–181.
27. Polle, A. B. Morawe. (1995*). Seasonal Changes of the Antioxidative Systems in Foliar Buds and Leaves of Field-grown Beech Trees (Fagus sylvatica, L.) in a Stressful Climate*. Botanica Acta, 1995, 108 (4), pp. 314–320.
28. Polle, A. B. Morawe, H. Rennenberg. (1992). *Seasonal variations of glutathione reductase and glutathione in leaves and leaf buds of beech trees (Fagus sylvatica, L.)*. Phyton, 32, 1992, pp. 99–102.
29. Polle, A., V. Glavac. (1993). *Seasonal changes in the axial distribution of peroxidase activity in the xylem sap of beech (Fagus sylvatica L.) trees*. Tree Physiology, 1993, 13(4), pp. 409–413.
30. Sergiev I., Alexieva V., Ivanov S., Moskova I., Karanov E. (2006). *The phenylurea cytokinin 4PU-30 protect maize plants against glyphosate action*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2006, 85, pp. 139–146.
31. Smith, I. T. Vierheller, C. Thorne. (1988). *Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)*. Analytical Biochemistry, 1988, 175(2), pp, 408–413.
32. Swain, T, J. L. Goldstein. (1964). *In: Methods in polyphenol chemistry (Pridham JB ed)*. Pergamon Press, Oxford, 1964, pp. 131–146.
33. Сталев, З. (1990*). Проучване върху екологията и биологията на буковия скокльо (Rhynchaenus fagi L.) – вредител по източния бук (Fagus orientalis Lipsky) в България*. Наука за гората, 1990, 2, с. 79–87.
34. Сталев, З. (2011). *Проучвания върху някои особености в жизнения цикъл на буковия скокльо (Rhynchaenus fagi L.) в горите на Странджа*. Юбилеен сборник научни доклади „50 години опитна станция по дъбовите гори – Бургас“, 2011, 88–93.

BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN BEECH LEAVES INFESTED WITH *ORCHESTES FAGI* L.

Petya-Dimitrova Mateva[1], Elena Shopova[2], Sergey Ivanov[3], Pavel Kerchev[4], Luyba Miteva[5], Vera Alexieva[2]
[1]University of Forestry, Sofia, Bulgaria
[2]Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgaria
[3]Center on the biology of foodstuffs, Bulgaria
[4]Ghent University, Belgium
[5]Resbiomed, Bulgaria

Abstract

Orchestes fagi L is the most common and well-studied insect attacking the European beech (*Fagus sylvatica* L.). To gain an insight into the biochemical and physiological defense mechanisms triggered upon infestation with *Orchestes fagi* L. in beech leaves, we investigated the levels of several oxidative stress markers and the activity of major antioxidant enzymes. *Orchestes fagi* infestation did not result in oxidative stress, but led to accumulation of free polyphenols and proline that correlated with altered antioxidant enzyme activities. Taken together, our results point towards activation of specific defense responses upon *Orchestes fagi* attack in beech leaves. Our pioneering for Bulgaria study is a step towards a better understanding of the mechanisms that could be exploited to increase the resistance of the European beech, one of the major forest species in Bulgaria, to biotic stress.