

УДК 543.421/.424+632.03

ИНФРАКРАСНАЯ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЯ БИОТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

С. Р. Лоскутов, Л. К. Казарян, Е. А. Тютюкова

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

E-mail: lsr@ksc.krasn.ru, kazaryan.lk@ksc.krasn.ru, katewood@inbox.ru

Поступила в редакцию 15.07.2024 г.

Глобальное изменение климата, техногенное загрязнение, развитие эпифитотий и массовое размножение насекомых-вредителей являются причиной возникновения фитопатологического состояния насаждений видов древесных. Пониманию механизмов развития патологии элементов строения дерева (в частности, листьев) способствует молекулярно-аналитический подход в исследовании тестируемого органа растения, реализованный нами на примере сравнительного исследования здоровой и поврежденной хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из пригородных насаждений с помощью ИК Фурье-спектроскопии. В основу анализа ИК-спектров здоровой и поврежденной хвои положен метод сравнения отношений интенсивности полос поглощения на характеристических (для связей, функциональных групп, типа их колебаний) частотах. Отнесение полос поглощения осуществлено по литературным данным. С целью сравнения поврежденных образцов хвои с контролем рассчитаны отношение интенсивности полос поглощения для $I_{1375/2900}$, $I_{1695/1647}$, $I_{1506/898}$, $I_{1564/1550}$, $I_{1695/1533}$, $I_{1447/1369}$, $I_{1654/1730}$, $I_{1728/1477}$, $I_{2920/1600}$, $I_{3040/1600}$, $I_{3040/1508}$, $I_{1512/894}$ (подстрочные индексы указывают для каких волновых чисел рассчитывались отношения интенсивности поглощения). Анализ массива ИК-спектров хвои по этому методу показал качественные и количественные отличия молекулярно-структурных показателей здоровой и поврежденной хвои (с усыханием кончиков и с пятнистым хлорозом).

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., пригородные насаждения, хвоя, повреждения, ИК Фурье-спектроскопия.

DOI: 10.15372/SJFS20240604

ВВЕДЕНИЕ

Важная информация об изменении биохимического статуса хвои на молекулярном уровне может быть получена из анализа параметров спектров поглощения исследуемыми образцами в ИК-диапазоне. Инфракрасная спектроскопия является очень полезным инструментом для быстрого получения информации о структуре компонентов хвои и химических изменениях, происходящих в ней в результате различного техногенного/биотического воздействия. Этот метод имеет преимущество перед обычными химическими методами, которые отнимают много времени, а также приводят к сопутствующему разрушению природных полимеров, нежелательному образованию новых продуктов и т. п.

К настоящему времени накопилось очень большое количество публикаций по инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИКФС) биологиче-

ских объектов, в которых приводится отнесение характеристических частот (полос) поглощения в ИК-спектре к тем или иным структурным элементам (например, колебаниям циклических структур, функциональных групп, химических связей и др.) (Popescu et al., 2007; Rana et al., 2008; Tinti et al., 2015).

Вместе с тем не удалось найти российских и зарубежных публикаций по ИКФС поврежденной и усыхающей хвои для сосновых насаждений вблизи крупных промышленных центров.

Целью нашей работы было исследование хвои с признаками усыхания и пятнистого хлороза с помощью ИКФС по предлагаемым нами методам разностных ИК-спектров и сравнительного анализа отношений интенсивности для пар частот (волновых чисел), характеризующих изменение (или постоянство) ряда молекулярно-структурных показателей поврежденной хвои по сравнению со здоровой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образцы хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) были собраны в пригородных сосновых фитоценозах г. Красноярска, длительное время подвергавшихся техногенным и рекреационным нагрузкам, в частности воздействию фитопатогенных грибов и насекомых.

Изучали хвою 2–3-го года жизни с наиболее часто встречающимися признаками повреждения у взрослых деревьев – пятнистым хлорозом и усыханием (брали хвою с усыханием 1/10–2/3 от длины хвоинки). Хвою с признаками пятнистого хлороза (ПХ) и усыхания (УХ) сравнивали со здоровой хвоей (ЗД) (рис. 1).

Образцы для исследования заготавливали в начале августа 2022 г. в сосняках VI класса возраста, располагающихся северо-восточнее г. Красноярска в направлении основного переноса промышленных выбросов города.

Хвою трех видов без видимых повреждений, с желтыми пятнами и с усыхающими кончиками (рис. 1) отбирали преимущественно с мужских побегов с деревьев сосны обыкновенной, растущих по краям опушек. Хвоя держалась на побегах 5–6 лет. Отмечено присутствие на хвое пауков, а также насекомых – тли, хермеса и др.

Средний образец соответствующих видов хвои готовили по методу квартования (Оболенская и др., 1991). Для исследования были подготовлены образцы воздушно-сухой измельченной хвои фракция 0.1–0.3 мм. ИКФС проводили с помощью спектрометра Vertex 80V (Bruker, Германия) в диапазоне 4000–400 см⁻¹: спектральное разрешение показаний не более 2 см⁻¹, пределы допускаемой основной абсолютной погрешности измерений по шкале волновых чисел ± 0.5 см⁻¹, при регистрации спектров поглощения время накопления 5 с, максимальная скорость сканирования 200 мм/с. Для снятия

спектров использовали тонкие таблетки бромида калия с запрессованными в них экспериментальными образцами: 1–2 мг образца растирали в ступке с ~100 мг KBr, измельченный материал помещали в пресс-форму, эвакуировали воздух, прессовали при 75 кН × см⁻². Обработку спектров осуществляли с помощью пакета программ OPUS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показаны ИК Фурье-спектры здоровой и поврежденной хвои сосны, а в таблице представлено отнесение частот поглощения.

Характеристические частоты в ИК-диапазоне (см⁻¹), для которых рассчитаны отношения интенсивности поглощения и определены значения интенсивности поглощения контрольным и экспериментальными образцами хвои, представлены в таблице (Методы..., 2002; Popescu et al., 2006; Тарасевич, 2012; Báder et al., 2020).

В случаях, как на рис. 2, часто проводится анализ разностных спектров (контроль, минус измененный), а также сравнение отношений интенсивности поглощения на характеристических частотах, изменение интенсивности соответствующих полос экспериментальных образцов по сравнению с интенсивностью полос контрольного образца (в %) и т. п. Так, на рис. 3 показаны разностные спектры, полученные после нормировки исходных при 1506 см⁻¹.

Значения 2 и 3 на рис. 3 больше нуля отвечают уменьшению интенсивности поглощения; значения меньше нуля свидетельствуют об увеличении интенсивности соответствующих полос по сравнению с контролем. Детальная количественная оценка спектральных показателей, выраженных в процентах относительно контроля, показана на рис. 4.

По данным таблицы и рис. 4 можно охарактеризовать изменения, произошедшие в повреж-

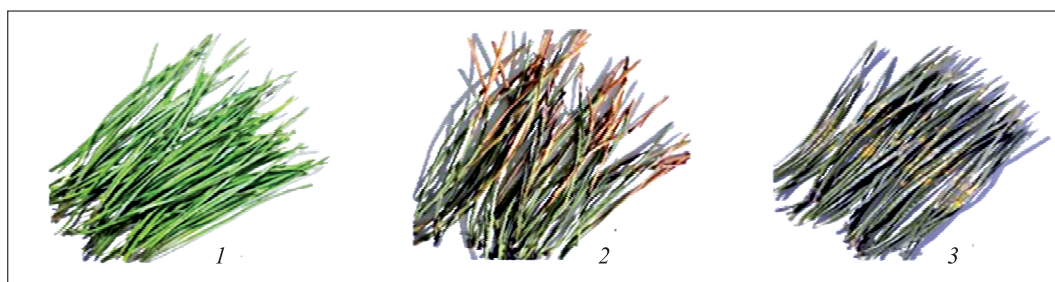


Рис. 1. Образцы хвои сосны обыкновенной.
1 – контроль (ЗД); 2 – УХ; 3 – ПХ.

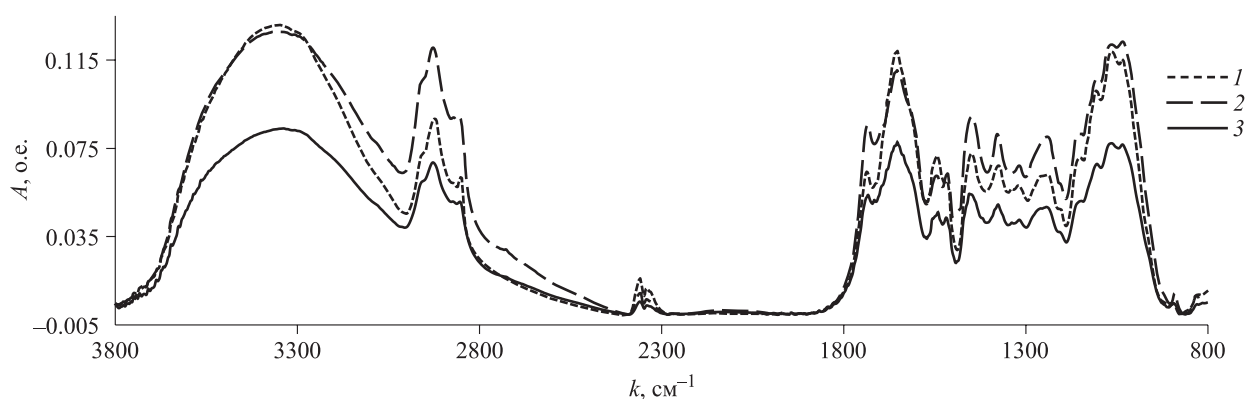


Рис. 2. ИК спектры хвои сосны из пригородных и городских насаждений.

1 – контроль (ЗД); 2 – УХ; 3 – ПХ.

Характеристические частоты в ИК-диапазоне (k) с рассчитанными отношениями интенсивности поглощения и определенными значениями интенсивности поглощения контрольным и экспериментальными образцами хвои

$k, \text{см}^{-1}$	Отнесение полос
3040	C–H-валентные колебания, ароматические углеводороды
2920	Валентные ассиметричные колебания CH_2 в алифатических структурах
2865	Водородные связи между глюкопиранозными кольцами, образованные кислородными атомами
2700	Характеристическая полоса карбоксильной группы, полоса валентных колебаний O–H
1730	C=O-растяжение в неконъюгированных кетонах
1728	То же
1695	Амид I, β -структура протеинов
1654	Адсорбированная вода на целлюлозе и лигнине
1647	Вода, связанная с лигнином или целлюлозой
1630	То же
1600	Скелетные колебания сирингильных единиц C=O, растяжение
1564	Амид II, β -структуры протеинов
1550	Амид II, α -структуры протеинов
1533	Амид II, β -структуры протеинов
1520	Амид II, α -структуры протеинов
1512	Скелетные колебания ароматического кольца лигнина
1508	Скелетные колебания ароматического кольца лигнина
1506	Растяжение C=C-связей ароматического кольца
1477	C–H-ассиметричные деформационные колебания в $-\text{OCH}_3$, CH_2 в пирановом кольце
1475	То же
1447	Колебания CH_2 -групп в жирных кислотах
1369	C–H-деформационные колебания в целлюлозе и гемицеллюлозах
1274	Деформация C–H в целлюлозе I и целлюлозе II
1186	Ассиметричное растяжение C–O–C в целлюлозе I и целлюлозе II
1178	Колебаниям карбоксильных групп
898	Растяжение глюкозного кольца, C–H-деформационные колебания
894	То же

Примечание. Отнесение полос поглощения осуществлено по литературным данным (см. выше). k – волновое число; отношение интенсивности полос поглощения с целью сравнения поврежденных образцов хвои с контролем рассчитаны для $I_{1375/2900}$, $I_{1695/1647}$, $I_{1506/898}$, $I_{1564/1550}$, $I_{1695/1533}$, $I_{1447/1369}$, $I_{1654/1730}$, $I_{1728/1477}$, $I_{2920/1600}$, $I_{3040/1600}$, $I_{3040/1508}$, $I_{1512/894}$ (рис. 4).

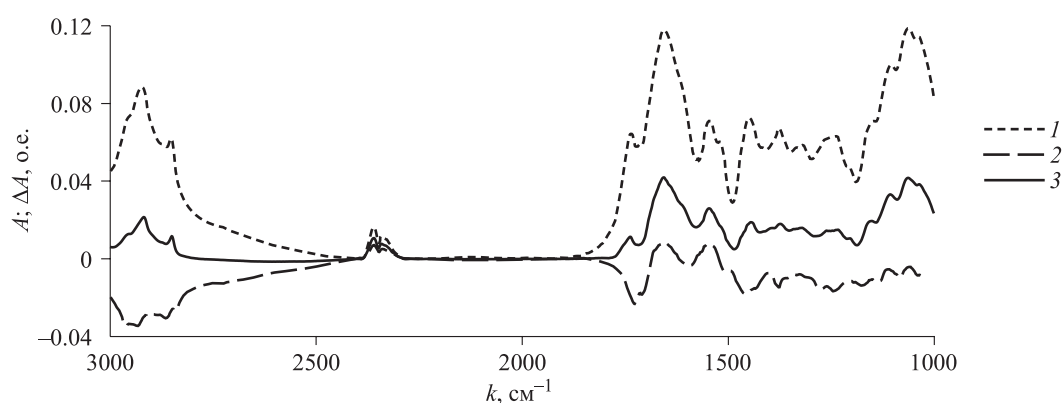


Рис. 3. Разностные ИК-спектры: здоровая хвоя минус поврежденная.

Спектр: 1 – контроль, 2 – разностный (контроль – УХ); 3 – контроль – ПХ.

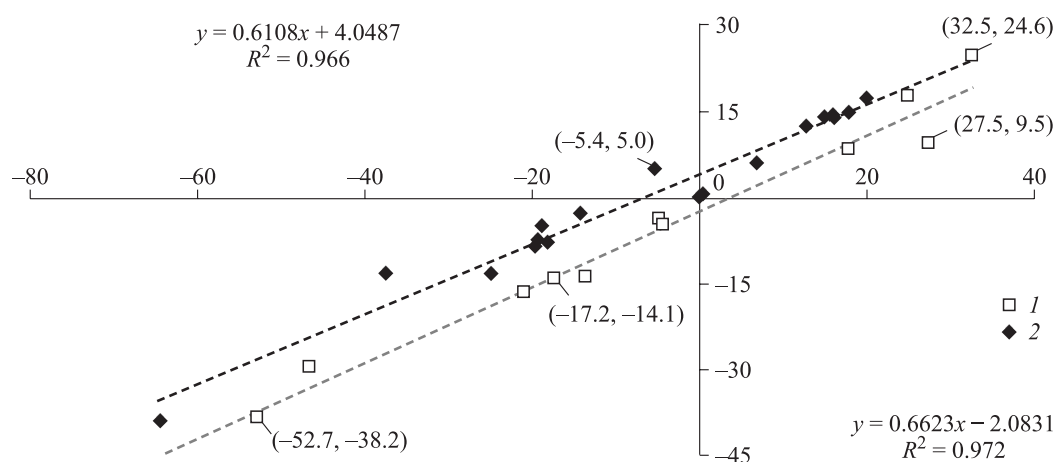


Рис. 4. Связь между изменением отношений интенсивности I_{ij} , (в % от контроля) усыхающей хвои и хвои с желтыми пятнами (1) и между изменением интенсивности соответствующих полос поглощения k_i (в % от контроля) усыхающей хвоей и хвоей с желтыми пятнами (2). Отнесение полос поглощения осуществлено по литературным данным (см. выше).

денной хвое по сравнению со здоровой. В качестве примера для некоторых частот (волновых чисел) приводится ряд заключений об изменениях в поврежденной хвое на молекулярном уровне.

Так, для обоих типов повреждений характерно увеличение массовой доли целлюлозы (I, II) и пиранов (антиоксидантов, выполняющих защитную функцию), о чем свидетельствует увеличение интенсивности полос 1186 см^{-1} (на 19.2 и 7.4 %) и 1475 см^{-1} (на 18.1 и 7.6 %).

Уменьшение интенсивности полос $1563\text{--}1654\text{ см}^{-1}$ ряда частот (на 16.2–14.0 %) и 1695 см^{-1} (на 0.5–0.6 %) указывает на изменения протеинового пула с преобладанием в нем β -структур. Об уменьшении связанной воды целлюлозой и лигнином свидетельствует уменьшение интенсивности полосы 1630 см^{-1} (на 12.9 и 12.4 %).

Интенсивность полосы 1506 см^{-1} , отвечающей растяжению $\text{C}=\text{C}$ -связей ароматического кольца, не изменилась.

Более подробную информацию о молекулярно-структурных изменениях в поврежденной хвое дает сопряженный анализ спектров здоровой и поглощения биологическими объектами (в частности, лигноцеллюлозными материалами) поврежденной хвои с имеющимися в литературе обширными данными по характеристическим частотам

Так, увеличение $I_{1512/894}$ на 52.5 % для УХ и на 38.2 % для ПХ свидетельствует о заметном росте в химическом составе массовой доли ароматических соединений. Повышенное значение $I_{1447/1369}$ (на 13.9 % для обоих видов повреждения) указывает на увеличение синтеза жирных кислот. При этом уменьшается количество адсорбированной лигнином и целлюлозой воды на 32.5 и 24.6 % в УХ и ПХ соответственно.

Описанным способом можно провести совместный анализ координат всех точек графиков рис. 4 и данных таблицы об отнесении полос поглощения образцами хвои и получить весьма

детальную характеристику повреждения хвои на молекулярном уровне.

Координаты точек (1) указывают на изменение отношения интенсивности (в % от контроля, см. таблицу) усыхающей хвои (X-координата) и хвои с желтыми пятнами (Y-координата). Координаты точек (2) указывают на изменение интенсивности (в % от контроля, см. таблицу) усыхающей хвои (X-координата) и хвои с желтыми пятнами (Y-координата). Таким образом, по графикам рис. 4 можно быстро и наглядно определять характер молекулярно-структурных изменений в образцах хвои усыхающей и с желтыми пятнами, в зависимости от того, в каком квадранте располагается точка и каким частотам отвечает. В качестве примера рассмотрим координаты нескольких точек на представленных графиках рис. 4:

– (32.5, 24.6) – отражает уменьшение связанной воды;

– (27.5, 9.5) – отражает уменьшение алифатических соединений и ароматического комплекса веществ (полифенолов и/или лигнина);

– (–17.2, –14,1) – отражает увеличение (преобладание) β -структур протеинов над α -структурами;

– (–5.4, 5.0) – отражает увеличение доли гемицеллюлоз и целлюлозы в усыхающей хвое и уменьшение доли этих компонентов в хвое с желтыми пятнами;

– (–52.7, –38.2) – отражает увеличение лигнина и других ароматических соединений.

Обращает на себя внимание линейность графиков (1) и (2) с высокими коэффициентами детерминации как для усыхающей хвои, так и для хвои с желтыми пятнами.

Объяснением этого феномена может быть, по-видимому, «универсальная» биохимическая реакция живой хвои на внешнее воздействие на ранних стадиях реакции хвои, «независимо» от природы действующего фактора – техногенного или биотического, по крайней мере, в данном случае.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя изложенное выше, отметим, что повреждения обоих типов вызывают преобразование биохимического статуса хвои, связанное

с изменением соотношения массовых долей полимеров лигноуглеводной матрицы, появлением новых тенденций в обмене липидов, полифенолов; изменением состояния связанной воды и конверсией протеинового пула.

Полученные в результате исследования новые данные свидетельствуют о широких возможностях метода ИКФС для определения тенденций в изменении биохимического статуса хвои на ранней стадии развития её повреждений, что является важным показателем практической значимости, экологической актуальности и перспективности проведенного исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЛ СО РАН FWES-2024-0028.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук старшему научному сотруднику ИЛ СО РАН В. В. Астраханцевой за предоставленные образцы хвои

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Методы исследования древесины и ее производных:* Учеб. пособ. / Под ред. Н. Г. Базарновой. Барнаул: Алтай. гос. ун-т, 2002. 160 с.
- Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с.
- Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений: Справ. материалы. М.: МГУ, 2012. 54 с.
- Báder M., Németh R., Sandak J., Sandak A. FTIR analysis of chemical changes in wood induced by steaming and longitudinal compression // *Cellulose*. 2020. V. 27. Iss. 3. P. 6811–6829.
- Popescu C. M., Popescu M. C., Vasile C., Singurel G. Degradation of lime wood painting supports ii. Spectral characterisation // *Cellulose Chem. Technol.* 2006. V. 40. N. 8. P. 649–658.
- Popescu C. M., Popescu M. C., Singurel G., Vasile C., Argypoulou D. S., Willfor S. Spectral characterization of eucalyptus wood // *Appl. Spectroscopy*. 2007. V. 61. N. 11. P. 1168–1177.
- Rana R., Müller G., Naumann A., Polle A. FTIR spectroscopy in combination with principal component analysis or cluster analysis as a tool to distinguish beech (*Fagus sylvatica* L.) trees grown at different sites // *Holzforschung*. 2008. V. 62. Iss. 5. P. 530–538.
- Tinti A., Tugnoli V., Onora S., Francioso O. Recent applications of vibrational mid-Infrared (IR) spectroscopy for studying soil components: a review // *J. Central Europ. Agr.* 2015. V. 16. Iss. 1. P. 1–22.

INFRARED FOURIER SPECTROSCOPY OF BIOTIC DAMAGE TO SCOTS PINE NEEDLES

S. R. Loskutov, L. K. Kazaryan, E. A. Tyutkova

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

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

Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: lsr@ksc.krasn.ru, kazaryan.lk@ksc.krasn.ru, katewood@inbox.ru

Global climate change, anthropogenic pollution, the development of epiphytotics and the mass reproduction of insect pests are the cause of the phytopathological state of tree species stands. To the understanding of the pathology mechanisms development of the tree's structural elements (in particular, needles) will be promote analytical approach to the study of the tested plant organ. The study approach was implemented by us using the example of a comparative study of healthy and damaged Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles from suburban stands using infrared Fourier spectroscopy. The analysis of the IR spectra of healthy and damaged needles is based on a method for comparing the intensity ratios of absorption bands at characteristic frequencies (for bonds, functional groups, and the type of their oscillations). The assignment of absorption bands was carried out according to the literature data. In order to compare damaged samples of needles with the control, the absorption band intensity ratio was calculated for $I_{1375/2900}$, $I_{1695/1647}$, $I_{1506/898}$, $I_{1564/1550}$, $I_{1695/1533}$, $I_{1447/1369}$, $I_{1654/1730}$, $I_{1728/1477}$, $I_{2920/1600}$, $I_{3040/1600}$, $I_{3040/1508}$, $I_{1512/894}$ (subscripts indicate for which wave numbers the absorption intensity ratios were calculated). The analysis of the IR spectra needles array using this method showed what changes (qualitatively and quantitatively) at the level of molecular and structural parameters are characterized by shrinking and diseased needles compared with healthy ones.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., suburban stands, needles, damage, infrared Fourier spectroscopy.

How to cite: Loskutov S. R., Kazaryan L. K., Tyutkova E. A. Infrared Fourier spectroscopy of biotic damage to Scots pine needles // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2024. N. 6. P. 25–30 (in Russian with English abstract and references).