

УДК 630*232:58.087:543.2

DOI: 10.37482/0536-1036-2022-1-36-48

ХАРАКТЕРИСТИКА ФОРМИРОВАНИЯ ДРЕВЕСНОГО ВЕЩЕСТВА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

М.А. Гусакова, канд. техн. наук, вед. науч. сотр.; ResearcherID: [AAB-5528-2019](https://orcid.org/0000-0002-2937-2604),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2937-2604>

К.Г. Боголицын, д-р хим. наук, гл. науч. сотр, проф.; ResearcherID: [AAA-6432-2019](https://orcid.org/0000-0002-4055-0483),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4055-0483>

А.А. Красикова, канд. хим. наук, науч. сотр.; ResearcherID: [AAH-5816-2020](https://orcid.org/0000-0001-6040-2026),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6040-2026>

Н.В. Селиванова, канд. хим. наук, ст. науч. сотр.; ResearcherID: [AAA-5681-2019](https://orcid.org/0000-0002-3393-0664),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3393-0664>

С.С. Хвиюзов, канд. хим. наук, ст. науч. сотр.; ResearcherID: [AAH-9795-2020](https://orcid.org/0000-0002-4810-2378),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4810-2378>

Н.А. Самсонова, мл. науч. сотр.; ResearcherID: [AAB-9486-2020](https://orcid.org/0000-0003-4422-7453),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4422-7453>

Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова УрО РАН, наб. Северной Двины, д. 23, г. Архангельск, Россия, 163000; e-mail: mariya_gusakova@mail.ru, k.bogolitsin@narfu.ru, snatalia-arh@yandex.ru, ann.krasikova@gmail.com, khviyuzov.s@yandex.ru, gavrilova.iepn@yandex.ru

Оригинальная статья / Поступила в редакцию 19.04.20 / Принята к печати 05.08.20

Аннотация. В настоящее время выращивание сеянцев основных лесохозяйственных пород осуществляют в тепличных комплексах, производя посадочный материал с закрытой корневой системой. В связи с особенностями данного процесса возникает вопрос об устойчивости получаемого посадочного материала к условиям окружающей среды. На рост и развитие сеянцев при многоротационных схемах выращивания будут влиять как тепличные условия, так и условия площадки закаливания. В связи с этим оценка готовности посадочного материала к переносу в открытый грунт становится актуальной научной задачей. С химической точки зрения одними из наиболее подходящих индикаторов для такой оценки являются вторичные метаболиты – конечные продукты биосинтеза. Цель исследования – изучение химических маркеров формирования древесного вещества как критериев завершения годового цикла развития сеянцев (при летних сроках посева) и их готовности к вынесению в открытый грунт. Сосна обыкновенная – наиболее подходящий модельный объект для проведения исследований, поскольку она – типичный представитель хвойных лесов и имеет обширный ареал произрастания, а также высокий адаптационный потенциал. На ранних этапах развития сеянцы сосны, как правило, характеризуются повышенной чувствительностью к действию окружающей среды. Для анализа процессов биосинтеза основных компонентов древесной ткани применяли физико-химические методы. Исследована сезонная динамика фенольных соединений в отдельных частях однолетних сеянцев сосны обыкновенной. Выявлено: в момент выноса на площадку закаливания растения адаптируются к новому для них температурному режиму. Это выражается в снижении содержания низкомолекулярных фенольных соединений, препятствующих развитию неконтролируемых окислительных процессов, запускающихся под воздействием неблагоприятных и стрессовых условий среды. Обнаружено, что изменение уровня кониферилового спирта как предшественника макромолекулярных структур лигнина древесины является маркером лигнификации

Данная статья опубликована в режиме открытого доступа и распространяется на условиях лицензии Creative Commons «Attribution» («Атрибуция») 4.0 Всемирная (CC BY 4.0) • Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

при вегетации растений. В качестве критериев завершения годичного цикла формирования сеянца и его готовности к высаживанию в естественную среду могут выступать содержание фенольных соединений (не менее 120–140 мг/г $C_{орг}$) и активность пероксидазы в «хвое» (0,1–0,3 ед. активности).

Для цитирования: Гусакова М.А., Боголицын К.Г., Красикова А.А., Селиванова Н.В., Хвиюзов С.С., Самсонова Н.А. Характеристика формирования древесного вещества при выращивании сеянцев сосны обыкновенной с использованием химических маркеров // Изв. вузов. Лесн. журн. 2022. № 1. С. 36–48. DOI: 10.37482/0536-1036-2022-1-36-48

Финансирование: Исследования проведены в рамках государственного задания ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН ФНИ в 2018–2021 гг. (тема № АААА-А18-118012390231-9) с использованием оборудования ЦКП НО КТ РФ-Арктика (ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН).

Ключевые слова: биосинтез, выращивание сеянцев, фенольные соединения, лигнификация, ферментативная активность.

CHARACTERISTICS OF WOOD SUBSTANCE FORMATION DURING GROWING OF SCOTS PINE SEEDLINGS USING CHEMICAL MARKERS

Maria A. Gusakova, Candidate of Engineering, Leading Research Scientist;

ResearcherID: [AAB-5528-2019](https://orcid.org/0000-0002-2937-2604), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2937-2604>

Konstantin G. Bogolitsyn, Doctor of Chemistry, Chief Research Scientist, Prof.;

ResearcherID: [AAA-6432-2019](https://orcid.org/0000-0002-4055-0483), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4055-0483>

Anna A. Krasikova, Candidate of Chemistry, Research Scientist; ResearcherID: [AAH-5816-2020](https://orcid.org/0000-0001-6040-2026),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6040-2026>

Natalia V. Selivanova, Candidate of Chemistry, Senior Research Scientist;

ResearcherID: [AAA-5681-2019](https://orcid.org/0000-0002-3393-0664), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3393-0664>

Sergey S. Khviyuzov, Candidate of Chemistry, Senior Research Scientist;

ResearcherID: [AAH-9795-2020](https://orcid.org/0000-0002-4810-2378), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4810-2378>

Nina A. Samsonova, Junior Research Scientist; ResearcherID: [AAB-9486-2020](https://orcid.org/0000-0003-4422-7453),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4422-7453>

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Naberezhnaya Severnoy Dviny, 23, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; e-mail: mariya_gusakova@mail.ru, k.bogolitsyn@narfu.ru, snatalia-arh@yandex.ru, ann.krasikova@gmail.com, khviyuzov.s@yandex.ru, gavrilova.iepn@yandex.ru

Original article / Received on April 19, 2020 / Accepted on August 5, 2020

Abstract. Currently, seedlings of the main silvicultural species are grown in greenhouses by the technology of ball-rooted planting material production. The process features raise the issue of the resulting planting material sustainability in relation to environmental conditions. Seedling growth and development in multi-rotation growing schemes will be influenced by both greenhouse and hardening site conditions. This makes assessing the planting material readiness for transfer to the open ground an urgent scientific task. Secondary metabolites (end products of biosynthesis) are one of the most suitable indicators for such an assessment from a chemical point of view. This study aims to explore chemical markers of wood substance formation as a criterion for completion of the annual development cycle of seedlings (at summer sowing dates) and their readiness for planting in the open ground. Scots pine is a good model object for the research, since it is a typical representative of coniferous forests, has an extensive range of growth as well as a high adaptive potential. Pine seedlings are usually highly sensitive to environmental conditions in the early stages of development. Physicochemical

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license • The authors declare that there is no conflict of interest

methods were used for the analysis of the biosynthesis processes of the main wood substance components. The seasonal dynamics of phenolic compounds content in different parts of annual Scots pine seedlings showed that the plants adapt to the temperature changes when they are brought to the hardening site. The adaptation includes a decrease in the content of low-molecular phenolic compounds preventing the development of uncontrolled oxidative processes when plant is exposed to adverse and stressful environmental conditions. It was found that the changes in the content of coniferyl alcohol as a precursor of lignin structures of coniferous wood can serve as a marker of lignification in the studied vegetation process. The content of phenolic compounds (at least 120–140 mg/g of TOC) and the peroxidase activity in needles (0.1–0.3 units of activity) may serve as criteria for the completion of the annual cycle of seedling formation and the degree of its readiness for planting in the natural environment.

For citation: Gusakova M.A., Bogolitsyn K.G., Krasikova A.A., Selivanova N.V., Khviyuzov S.S., Samsonova N.A. Characteristics of Wood Substance Formation during Growing of Scots Pine Seedlings Using Chemical Markers. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2022, no. 1, pp. 36–48. DOI: 10.37482/0536-1036-2022-1-36-48

Funding: The research was carried out within the state assignment of the FECIAR UrB RAS as part of the Fundamental Research Program in 2018–2021 (project No. AAAA-A18-118012390231-9) using equipment of the Core Facility Centre “Critical Technologies of the Russian Federation in the Field of Environmental Safety in the Arctic” (CFC CT RF “Arktika”).

Keywords: biosynthesis, growing, phenolic compounds, lignification, enzymatic activity.

Введение

В настоящее время одними из важнейших проблем лесопромышленного комплекса являются истощенность лесного фонда в транспортно-доступных сырьевых районах и ухудшение его состояния. Поэтому на Европейском Севере России лесовосстановление – актуальная задача, которая может быть решена внедрением в лесокультурное производство лесобразующих пород, полученных из современных видов посадочного материала [2, 3, 6, 19].

Сеянцы сосны обыкновенной выращиваются как посадочный материал с закрытой корневой системой (ПМЗК). Производство ПМЗК широко распространено в последние десятилетия в скандинавских странах и ряде других государств Северной Европы, Южной Америки, а также в Канаде и США [14, 18, 22]. С опорой на опыт скандинавских коллег построены тепличные комплексы с технологией ПМЗК в Республике Карелии, Ленинградской и Архангельской областях [3, 5].

Сейчас во многих регионах России широко применяются двух- и трехротационные схемы выращивания контейнеризированных сеянцев сосны – посадки осуществляются как ранней весной, так и поздним летом. На рост и развитие сеянцев в этом случае будут влиять условия выращивания и – после вынесения сеянцев на площадку закаливания – климатические условия окружающей среды.

Выращиванию посадочного материала хвойных пород, его морфологии и физиологическим показателям посвящены многие публикации [1, 2, 9, 12, 13]. Одним из визуальных маркеров формирования сеянца, часто используемым для оценки готовности растения к выносу на площадку закаливания, обычно служит закладка верхушечной почки [8]. В то же время с химической точки зрения в число наиболее подходящих индикаторов состояния растительного организма

входят вторичные метаболиты – конечные продукты биосинтеза [10], к которым относится, например, лигнин, синтезируемый из фенольных соединений. Он является основной неуглеводной частью древесины, его наличие характерно для клеточных стенок высших растений. Данное вещество формирует в древесине надмолекулярную структуру древесного вещества, обеспечивает устойчивость к повреждениям, защищает от действия патогенных микроорганизмов [4].

Лигнин образуется в результате окислительных взаимодействий, при которых мономерные фенольные соединения окисляются до резонансно стабилизированных радикалов, реагирующих между собой. Полимеризация монолигнолов может быть связана с дегидрирующей способностью двух ферментативных комплексов – на основе пероксидазы или лакказы – причем ведущая роль в процессах лигнификации отводится пероксидазе [8, 17]. На ранних стадиях формирования древесного вещества предшественники лигнина представляют собой фенольные соединения небольшой молекулярной массы, и их содержание по сравнению с углеводной составляющей невелико. Мономерные предшественники лигнина в присутствии пероксидазы претерпевают так называемую дегидрогенизацию, т. е. потерю атома водорода фенольной группы, и превращаются в феноксильные радикалы [4].

Таким образом, целью исследования являлось изучение химических маркеров формирования древесного вещества как критериев завершения годичного цикла развития сеянцев сосны обыкновенной (при летних сроках посева, 2-я ротация) и их готовности к вынесению в открытый грунт.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследования служили образцы сеянцев сосны обыкновенной, выращенные по технологии ПМЗК (посев 2.07.2018 г.) в устьянском лесном селекционно-семеноводческом центре Архангельской области в кассетах «Плантек-81» с размером ячеек 4×4×7 см на торфяном субстрате промышленного производства марки «Агробалт-С» с внесением отечественных удобрений 1 раз в месяц. Субстрат представляет собой кислый ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 5,05$; $\text{pH}_{\text{KCl}} = 4,40$) верховой слаборазложившийся торф с содержанием микроэлементов и органического вещества не менее 80 %. Полив и подкормка сеянцев осуществлялись с помощью поливной установки. Качественные характеристики используемой для полива воды: $\text{pH} = 7,14$; ХПК = 10,8 мгО₂/л; окислительно-восстановительный потенциал = +295 мВ; минерализация в пересчете на NaCl = 175,7 мг/л; удельная электропроводность = 366,0 мкСм/см [5].

Определение содержания общих фенольных соединений в сеянцах сосны проводили колориметрическим методом с использованием реактива Фолина–Дениса [25]. Пробы экстрактов получали растиранием 0,25 г сырья в 25 мл этилового спирта. 1,0 мл экстракта помещали в пробирку вместимостью 10 мл, дистиллированной водой доводили объем до 7 мл, перемешивали содержимое пробирки и вносили 0,5 мл реактива Фолина–Дениса. Через 3 мин добавляли 1,0 мл насыщенного раствора Na₂CO₃ и доводили водой до 10 мл. Через 1 ч измеряли оптическую плотность при $\lambda = 730$ нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Анализ родственных лигнину мономерных фенолов гваяцильного ряда в свежеприготовленных спиртовых экстрактах сеянцев выполняли с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

LC30AD Nexera X2 со спектрофотометрическим детектированием (Shimadzu, Япония). Для разделения фракции фенольных соединений на индивидуальные компоненты применяли обращенно-фазовую колонку NukleodurPolarTec, 150×3.0 мм, 3 мкм (Macherey-Nagel, Германия), элюент – смесь ацетонитрила и высокоочищенной воды I типа с добавкой муравьиной кислоты 0,5 %. Разделение проводили в изократическом режиме, скорость потока элюента составляла 0,4 мл/мин, содержание ацетонитрила – 20 %, температура термостата – 40 °С; объем вводимой пробы – 10 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм [7].

Концентрация общих фенольных соединений (мг/л) пересчитана на единицу массы органического углерода (мг/г $C_{орг}$), что позволило исключить влияние влажности. Определение содержания органического углерода проводили методом высокотемпературного каталитического сжигания на анализаторе общего органического углерода TOC-L CSN (Shimadzu, Япония) в образцах, предварительно высушенных лиофильно с использованием установки-модификатора Lyovaror L-200 (Buchi, Индия).

С целью анализа функциональной природы фенольных соединений в исследуемых экстрактах использованы методы производной и дифференциальной УФ-спектроскопии. Электронные спектры экстрактов записаны на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в диапазоне 220–500 нм с интервалом 0,5 нм. Получены УФ-спектры растворов с нейтральным рН, с рН 12 и в 0,2 М NaOH. По данным дифференциальных спектров, рассчитанных вычитанием спектра нейтрального раствора из спектра 0,2 М NaOH, найдены значения приведенной оптической плотности – отношения оптических плотностей в максимумах поглощения 300 и 360 нм к концентрации экстрактов.

Для оценки активности пероксидазы использовали методику [16]. Навеску растительного материала (100–200 мг) растирали в фарфоровой ступке с небольшим количеством фосфатного буфера и переносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводя буфером до метки. Через 20 мин настаивания экстракт фильтровали через бумажный фильтр. Методика основана на определении скорости окисления 0,8 мМ гваякола (Sigma) 1,5 мМ пероксидом водорода при температуре 25 °С в среде 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН = 7,0) при $\lambda = 416$ нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

У семян сосны обыкновенной можно выделить следующие стадии (этапы) развития: прорастание семени; формирование проростка; хвоевая; стволовая, или корневая (переходная); заключительная. На стадии прорастания семени за счет впитывания влаги увеличивается его масса, разрывается семенная кожура и появляется корешок. Длительность этого этапа колеблется от 1 до 2 недель. На стадии формирования проростка наблюдается удлинение корешка и появление на поверхности почвы семенного колпачка. Затем происходит удлинение стебелька (гипокотил) и разворачивание пучка семядолей, которые освобождаются от семенной оболочки. Боковых корней, микоризы и настоящих хвоинок на данной стадии не появляется.

Хвоевая стадия характеризуется преобладанием в проросте органической массы фотосинтезирующего аппарата (хвои), необходимого для синтеза орга-

нических веществ, обуславливающего дальнейший прирост и накопление древесины в стволике. Продолжительность данной стадии около 1 месяца. Стволовая стадия – начало интенсивного, далеко не равномерного у разных древесных пород прироста стволика (эпикотилия) за счет фотосинтеза и интенсивного поглощения из почвы азота и зольных элементов. Длительность этапа составляет 1–1,5 месяца. На заключительной стадии развития формируются верхушечные почки, она завершается примерно за 1,5–2 месяца, с конца августа до конца октября. Несмотря на то, что в это время заканчивается процесс вегетации и растение переходит в состояние покоя, данный период характеризуется определенной физиологической активностью: происходит прирост стволика по диаметру, поглощаются элементы минерального питания, органы растения одревесневают вследствие продолжающейся лигнификации тканей.

По принятой технологии процесс выращивания ПМЗК в теплицах делится на три основных периода: начальный (проращивания), быстрого роста, закалывания. Последний начинается после выноса семян из теплицы на площадку доращивания, когда идет процесс заложения верхушечной почки. При этом продолжается радиальный рост стволика и корней. Состояние семян на площадке доращивания зависит от времени наступления, силы и продолжительности заморозков, а также от длительности светового дня.

Для более детального рассмотрения процессов биосинтеза нами было принято условное деление каждого сеянца на части: корень, стволик и хвоя (рис. 1). Изучение химических маркеров формирования древесного вещества проводили для стволика и хвои.



Рис. 1. Сеянец сосны обыкновенной на хвоевой / стволовой стадии: 1 – корень; 2 – стволик; 3 – хвоя

Fig. 1. A seedling of Scots pine at the needle / stem stage: 1 – root; 2 – stem; 3 – needles

У хвойных растений биологические процессы наиболее активно протекают в древесной зелени, где происходит синтез и накопление широкого ряда соединений (вторичных метаболитов), расходуемых в течение многолетних циклов на построение древесной массы. Наибольшее содержание фенольных соединений и, соответственно, более интенсивные процессы биосинтеза и накопления низкомолекулярных фенольных соединений также наблюдаются в хвоевой части – ассимиляционном органе растения. Динамика их изменения в сеянцах

сосны на протяжении годового цикла представлена на рис. 2. Согласно полученным данным, количество фенольных соединений в хвое сеянцев сосны в процессе их роста и развития увеличивается и к формированию первого годичного слоя достигает 120–140 мг/г $C_{орг}$.

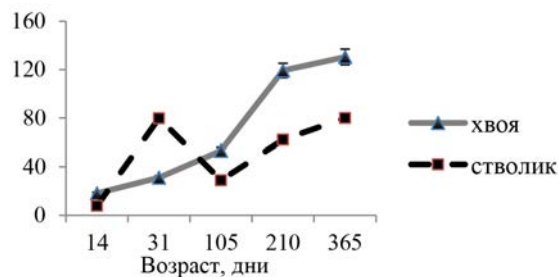


Рис. 2. Изменение общего содержания (мг/г $C_{орг}$) фенольных соединений в экстрактах сеянцев сосны на протяжении годового цикла

Fig. 2. Changes in the total content (mg/g TOC) of phenolic compounds in extracts of Scots pine seedlings throughout the annual cycle

В зимний период (105–210 дн.) содержание фенольных соединений в стволиках несколько снижается, предположительно, в связи с процессами конденсации. Согласно литературным данным [1, 24, 26], биосинтез лигнинного полимера протекает по свободно-радикальному механизму через стадии ферментативной дегидрогенизационной полимеризации *n*-гидроксикоричных спиртов и сопровождается присоединением отдельных феноксильных радикалов к растущему полимеру [4, 21, 23]. Так, на примере родственных лигнину мономерных фенолов установлено, что соединения с сопряженной с бензольным кольцом карбонильной группой (ванилин, ацетованилон, ванилиновая кислота) характеризуются большим окислительным потенциалом, т. е. менее выраженными окислительно-восстановительными свойствами по сравнению с несопряженными мономерными фенолами, к которым относятся *n*-гидроксикоричные спирты – основные мономерные предшественники лигнина [4].

С целью количественной оценки изменения относительного содержания несопряженных и сопряженных фенольных соединений были получены дифференциальные спектры спиртовых экстрактов сеянцев, максимум поглощения которых при 300 нм соответствует несопряженным, а при 360 нм – сопряженным фенольным единицам. Различия в содержании данных фенольных соединений на протяжении формирования сеянца (годовой цикл) представлены на рис. 3.

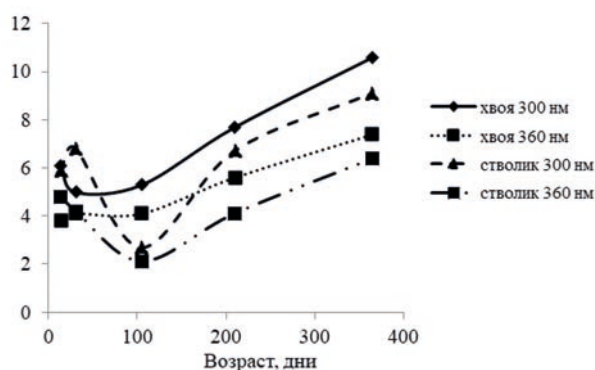


Рис. 3. Изменение интенсивности спектральных полос ($\Delta D/c, \cdot 10^3$) в дифференциальных спектрах экстрактов сеянцев сосны в течение первого года развития

Fig. 3. Changes in the intensity of spectral bands ($\Delta D/c, \cdot 10^3$) in the differential spectra of extracts of Scots pine seedlings during the first year of development

Показано, что в спиртовых экстрактах образцов хвои и стволиков присутствуют сопряженные и, в относительно большем количестве, несопряженные фенольные структуры. Например, с 14-го по 105-й день развития в хвое наиболее выражены изменения несопряженных фенольных структур, количество которых на 31-й день уменьшается на 15 % (отн.), а к 105-му дню падает на 6 %. По мере развития стволиков содержание несопряженных фенольных структур увеличивается на 19 % (14–31-й день), а к 105-му дню – снижается в 2,5 раза. Данные изменения, вероятно, вызваны переходом преимущественно несопряженных фенольных структур в более высокомолекулярные формы.

Уменьшение содержания сопряженных фенольных структур с увеличением возраста стволиков обусловлено, скорее всего, участием первых в формировании экстрактивных веществ. В экстрактах хвои уровень сопряженных фенолов меняется незначительно.

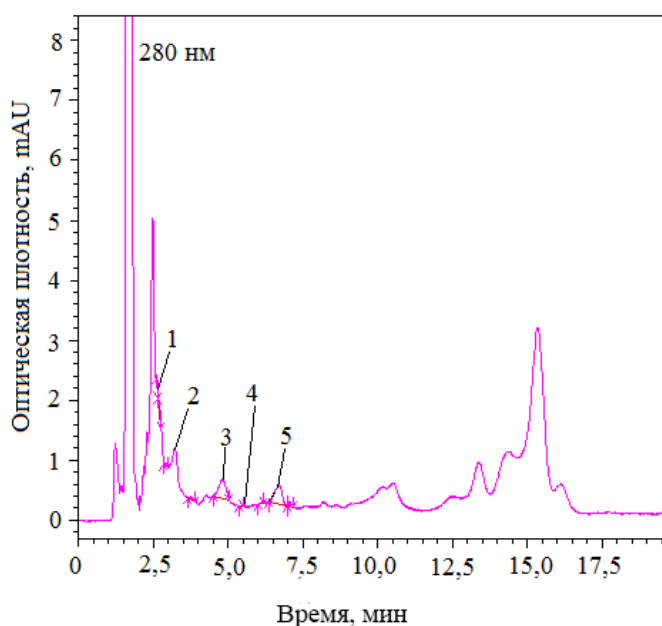
Со 105-го по 210-й день развития растений (осенне-зимний период), значительно растет содержание сопряженных и несопряженных фенолов, что сопоставимо с увеличением общего количества фенольных соединений, определенных по методу Фолина–Дениса в экстрактах сеянцев возрастом 210 дней.

С 210-го по 365-й день повышается $\Delta D/c$ несопряженных и сопряженных форм, это подтверждается изменением общего уровня фенольных соединений. В образцах стволовой части доля несопряженных фенольных соединений значительно выше по сравнению с хвоей, что и обуславливает увеличение содержания ароматической компоненты в стволовой части растений.

Полученные методами УФ-спектроскопии данные свидетельствуют о сложном многокомпонентном составе фенольных соединений. Для исследования их природы у развивающихся сеянцев использован метод ВЭЖХ. Хроматограммы экстрактов хвои и стволиков схожи. В качестве примера на рис. 4 представлена типичная хроматограмма экстракта хвои сеянцев возрастом 105 дней.

Рис. 4. Хроматограмма экстракта сеянцев (хвоя, 105 дней): 1 – ванилиновый спирт; 2 – ванилиновая кислота; 3 – кониферилловый спирт; 4 – ванилин; 5 – ацетованилон

Fig. 4. Chromatogram of the studied extract of seedlings (needles, 105 days): 1 – vanillin alcohol; 2 – vanillic acid; 3 – coniferyl alcohol; 4 – vanillin; 5 – acetovanillone



В процессе лигнификации хвойных растений в качестве мономеров участвуют *n*-гидроксикоричные спирты, *n*-гидроксикоричные кислоты, а также производные этих спиртов и кислот [20]. В литературе *n*-гидроксикоричные спирты рассматриваются как основные участники процесса лигнификации [15]. В связи с этим в ходе исследования определяли соединения, относящиеся к группе родственных лигнину фенолов гваяцильного ряда: кониферилловый спирт, ванилиновый спирт, ванилин, ванилиновую кислоту, ацетованилон, гваякол. На рис. 5 представлено изменение содержания мономерных предшественников лигнина в стволике на ранних этапах развития сеянцев.

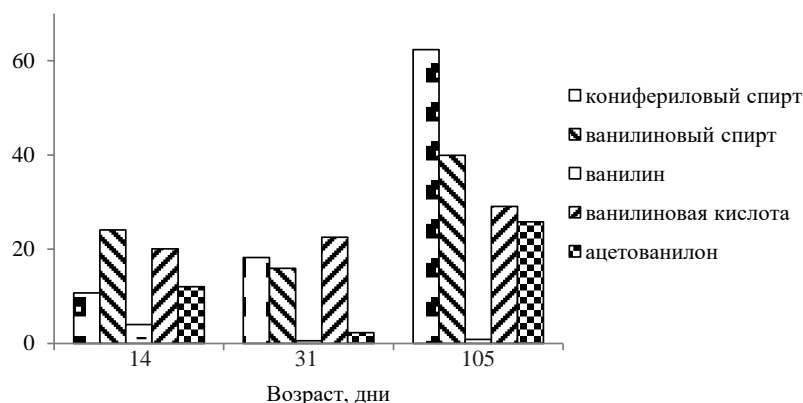


Рис. 5. Изменение содержания (мкг/г $C_{орг}$) мономерных предшественников лигнина в стволике на ранних этапах развития сеянцев сосны

Fig. 5. Changes in the content ($\mu\text{g/g } C_{org}$) of monomeric lignin precursors in stem at the early stages of development of Scots pine seedlings

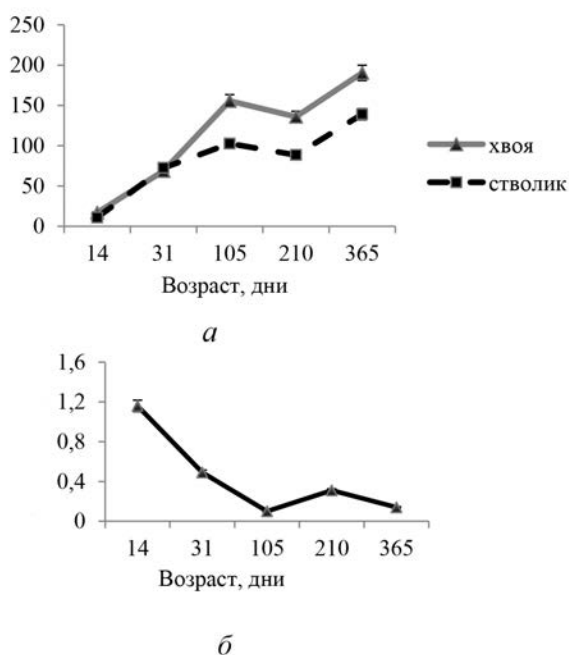
В исследуемых мономерных фенольных соединениях в экстрактах сеянцев преобладают кониферилловый и ванилиновый спирты. Наибольшее содержание кониферилового спирта характерно для хвои, что свидетельствует о более интенсивных процессах биосинтеза вторичных фенольных метаболитов в ней. В связи с этим при анализе компонентного состава фенольных соединений важно учитывать повышение содержания *n*-гидроксикоричных спиртов до концентраций 100 мкг/г $C_{орг}$, главным образом кониферилового спирта как предшественника макромолекулярных структур лигнина (рис. 6, а). Другие определяемые фенолы могут образовываться в ходе биохимических процессов, выступая промежуточными соединениями при окислении ванилинового спирта, не участвуя в лигнификации непосредственно, а формируя экстрактивные вещества.

Изменение содержания кониферилового спирта при формировании сеянца характерно как для хвои, так и для стволика: и в хвое, и в стволике в возрасте 210 дней наблюдается его небольшое снижение на 17 % (отн.), что обуславливается расходом кониферилового спирта на протекающие в растении в зимний период процессы лигнификации.

Как было отмечено, лигнификация в высших растениях происходит при участии ферментного комплекса на основе пероксидазы или лакказы, причем преимущественная роль принадлежит пероксидазе. Ее минимальная активность наблюдается в хвое сосны на 105-й день (рис. 6, б).

Рис. 6. Изменение на протяжении годового цикла: *a* – содержания (мкг/г $C_{орг}$) кониферилового спирта в экстрактах семян сосны; *б* – активности пероксидазы (ед. активности) в хвое семян сосны

Fig. 6. Changes throughout the annual cycle: *a* – coniferyl alcohol content ($\mu\text{g/g TOC}$) in extracts of Scots pine seedlings; *б* – peroxidase activity (units of activity) in needles of Scots pine seedlings



Это может быть вызвано повышенной функциональной лабильностью данного фермента и его способностью реагировать на большинство нарушений гомеостаза, к которым относится и перенос семян из теплицы на площадку закаливания. При закаливании происходят процессы конденсации и полимеризации фенольных структурных единиц.

В зимний период (210 дней) у сосны незначительно повышается пероксидазная активность, что является результатом стрессового воздействия низких температур. Совокупность известных сведений [11] о последовательных сезонных изменениях данного вида активности хвои в осенне-зимний период указывает на возможность протекания в ней при низких температурах активных адаптационных процессов, включая биосинтез отдельных компонентов. Эти процессы приводят к накоплению пероксидных группировок, вследствие чего повышается активность пероксидазы, катализирующей реакцию разложения перекиси водорода. Наблюдаемая адаптивная перестройка окислительного аппарата в сторону активации пероксидазы препятствует нарушению дыхательного процесса, что позволяет растениям поддерживать уровень окислительно-восстановительных процессов на относительно стабильном уровне. На заключительной стадии развития происходит резкое снижение ферментативной активности (0,1–0,3 ед.) в связи с усилением процессов лигнификации.

Заключение

В ходе исследований показано, что в момент выноса семян на площадку закаливания происходит их адаптация к существующему температурному режиму, выраженная в снижении содержания низкомолекулярных фенольных соединений, препятствующих развитию неконтролируемых окислительных процессов под влиянием неблагоприятных и стрессовых условий среды. Из-за низких температур в зимний период растение оказывается под воздействием

окислительного стресса, в условиях которого запускаются процессы ферментативной активности пероксидазы.

Таким образом, изучение особенностей биохимических процессов формирования древесной матрицы при выращивании посадочного материала с закрытой корневой системой выявило, что в качестве маркеров готовности сеянца к высаживанию и его устойчивости к естественным условиям среды могут выступать содержание фенольных соединений (не менее 120–140 мг/г $C_{орг}$) и активность пероксидазы в хвое (0,1–0,3 ед. активности).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бессчетнов В.П., Бессчетнова Н.Н., Яханова Е.А., Горелова З.В., Соколова А.А., Кентбаев Е.Ж., Кентбаева Б.А., Шабалина М.В. Развитие ксилемы и лигнификация е клеток у сеянцев сосны с открытой и закрытой корневой системой // Вестн. НГСХА. 2014. Т. 4. С. 25–35. Besschetnov V.P., Besschetnova N.N., Yakhanova E.A., Gorelova Z.V., Sokolova A.A., Kentbayev E.Zh., Kentbayeva B.A., Shabalina M.V. Xylem Development and Lignification of Its Cells in Bare-Rooted and Ball-Rooted Pine Seedlings. *Vestnik Nizhegorodskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*, 2014, vol. 4, pp. 25–35.
2. Бессчетнова Н.Н., Кулькова А.В. Содержание запасных питательных веществ в клетках тканей годичных побегов представителей рода ель (*Picea* L.) в условиях Нижегородской области // Изв. вузов. Лесн. журн. 2019. № 6. С. 52–61. Besschetnova N.N., Kul'kova A.V. The Content of Reserve Nutrients in the Cells of Annual Shoot Tissues of the Representatives of the Spruce (*Picea* L.) Genus in Nizhny Novgorod Region. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2019, no. 6, pp. 52–61. DOI: <https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2019.6.52>
3. Бобушкина С.В. Интенсивность роста и развития сеянцев сосны с закрытой корневой системой при разных режимах выращивания для лесовосстановления в Архангельской области: дис. ... канд. с.-х. наук. Архангельск, 2014. 196 с. Bobushkina S.V. *Intensity of Growth and Development of Ball-Rooted Pine Seedlings under Different Regimes of Cultivation for Reforestation in the Arkhangelsk Region*: Cand. Agric. Sci. Diss. Arkhangel'sk, 2014. 196 p.
4. Боголицын К.Г., Лунин В.В., Косяков Д.С. и др. Физическая химия лигнина: моногр. М.: Академкнига, 2010. 492 с. Bogolitsyn K.G., Lunin V.V., Kosyakov D.S. et al. *Physical Chemistry of Lignin*: Monograph. Moscow, Akademkniga Publ., 2010. 492 p.
5. Жигунов А.В., Маркова И.А. Производство посадочного материала в лесных питомниках Северо-Запада России: практические рекомендации. СПб.: СПбНИИЛХ, 2005. 114 с. Zhigunov A.V., Markova I.A. *Production of Planting Material in Forest Nurseries of the North-West of Russia: Practical Recommendations*. Saint Petersburg, SPbNIIILH Publ., 2005. 114 p.
6. Маркова И.А. Современные проблемы лесовыращивания (Лесокультурное производство). СПб.: СПбГЛТА, 2008. 156 с. Markova I.A. *Current Issues of Forest Cultivation (Forestry Production)*. Saint Petersburg, SPbGLTA Publ., 2008. 156 p.
7. Красикова А.А., Боголицын К.Г., Гусакова М.А., Ивахнов А.Д., Хвиузов С.С., Самсонова Н.А. Анализ фенольных компонентов в сверхкритических экстрактах древесины *Juniperus communis* L. методом ВЭЖХ // Сверхкритические флюиды: теория и практика. 2018. Т. 13, № 4. С. 41–49. DOI: <https://doi.org/10.34984/SCFTP.2018.13.4.006>. Krasikova A.A., Bogolitsyn K.G., Gusakova M.A., Ivakhnov A.D., Khviuzov S.S., Samsonova N.A. Analysis of Phenolic Components in the Supercritical Extracts of the *Juniperus communis* L. Wood by the Method of HPLC. *Sverkhkriticheskiye flyuidy: Teoriya i praktika* [Supercritical Fluids: Theory and Practice], 2018, vol. 13, no. 4, pp. 41–49. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1990793119070169>

8. Тарханов С.Н., Бирюков С.Ю. Морфоструктура и изменчивость биохимических признаков популяции сосны (*Pinus sylvestris* L.) в стрессовых условиях устья Северной Двины // Сиб. экол. журн. 2014. № 2. С. 319–327. Tarkhanov S.N., Biryukov S.Yu. Morphostructure and Biochemical Parameters of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Stressing Environment of North Dvina Estuary Region. *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal* [Contemporary Problems of Ecology], 2014, no. 2, pp. 319–327.

9. Федотов А.Н., Жигунов А.В. Влияние длины дня на формирование верхушечных почек у однолетних контейнеризированных сеянцев сосны обыкновенной и ели европейской // Изв. СПбЛТА. 2016. Вып. 215. С. 80–91. Fedotov A.N., Zhigunov A.V. The Effect of the Day Length on the Formation of Apical Buds in One-Year-Old Containerized Seedlings of Scots Pine and Norway Spruce. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj Lesotekhnicheskoy Akademii* [News of the Saint Petersburg State Forest Technical Academy], 2016, iss. 215, pp. 80–91. DOI: <https://doi.org/10.21266/2079-4304.2016.215.80-91>

10. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / отв. ред. Н.В. Загоскина, Е.Б. Бурлакова. М.: Науч. мир, 2010. 400 с. *Phenolic Compounds: Fundamental and Applied Aspects*. Ed. by N.V. Zagoskina, E.B. Burlakova. Moscow, Nauchnyy mir Publ., 2010. 400 p.

11. Шавнин С.А., Юсупов И.А., Марина Н.В., Монтиле А.А., Голиков Д.Ю. Сезонные изменения содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в зоне влияния теплового поля газового факела // Физиология растений. 2021. Т. 68, № 3. С. 315–325. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0015330321020184>. Shavnin S.A., Yusupov I.A., Marina N.V., Montile A.A., Golikov D.Yu. Seasonal Changes in Chlorophyll and Carotenoid Content in Needles of Scots Pines (*Pinus sylvestris* L.) Exposed to the Thermal Field of a Gas Flare. *Fiziologiya rastenij* [Russian Journal of Plant Physiology], 2021, vol. 68, no. 3, pp. 315–325. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1021443721020187>

12. Якимов Н.И., Крук Н.К., Юреня А.В. Биометрические показатели и густота однолетних сеянцев сосны и ели в закрытом грунте при разных нормах высевы семян // Проблемы лесоведения и лесоводства. Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2016. Вып. 76. С. 302–306. Yakimov N.I., Kruk N.K., Yurenya A.V. Biometric Indices and Density of Annual Seedlings of Pine and Spruce in Closed Ground at Different Rates of Seed Sowing. *Issues of Forest Science and Forestry*. Gomel, Institut lesa NAN Belarusi Publ., 2016, iss. 76, pp. 302–306.

13. Якимов Н.И., Крук Н.К., Юреня А.В. Агротехника выращивания сеянцев сосны обыкновенной в условиях закрытого грунта // Тр. БГТУ. 2018. Сер. 1: Лесное хоз-во, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. № 1. С. 25–30. Yakimov N.I., Kruk N.K., Yurenya A.V. Agricultural Cultivation of Seedlings of Scots Pine in a Greenhouse. *Trudy BGTU. Ser. 1: Lesnoye khozyaystvo, prirodopol'zovaniye i pererabotka vozobnovlyayemykh resursov* [Proceedings of BSTU. Series 1: Forestry. Environmental management. Reprocessing of renewable resources], 2018, no. 1, pp. 25–30.

14. Barnett J.P. Activities that Increase Germination and Establishment of Longleaf Pine Seedlings in Containers. *Proceedings: Workshops on Growing Longleaf Pine in Containers–1999 and 2001*. General Technical Report. SRS-56. Asheville, NC, USDA, 2002, pp. 18–21.

15. Barros J., Serk H., Granlund I., Pesquet E. The Cell Biology of Lignification in Higher Plants. *Annals of Botany*, 2015, vol. 2015, iss. 7, pp. 1053–1074. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcv046>

16. Bergmeyer H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 1. New York, Academic Press, 1974. 495 p.

17. Harkin J.M., Obst T.R. Lignification in Trees: Indication of Exclusive Peroxidase Participation. *Science*, 1973, vol. 180, iss. 4083, pp. 296–298. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.180.4083.296>

18. Juntunen M.-L., Rikala R. Fertilization Practice in Finnish Forest Nurseries from the Standpoint of Environmental Impact. *New Forests*, 2001, vol. 21, pp. 141–158. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1011837800185>
19. Nilsson U., Louranen J., Kolström T., Örlander G., Puttonen P. Reforestation with Planting in Northern Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2010, vol. 25, iss. 4, pp. 283–294. DOI: <https://doi.org/10.1080/02827581.2010.498384>
20. Ralph J. Hydroxycinnamates in Lignification. *Phytochemistry Reviews*, 2010, vol. 9, iss. 1, pp. 65–83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9141-9>
21. Shigeto J., Honjo H., Fujita K., Tsutsumi Y. Generation of Lignin Polymer Models via Dehydrogenative Polymerization of Coniferyl Alcohol and Syringyl Alcohol via Several Plant Peroxidases Involved in Lignification and Analysis of the Resulting DHPs by MALDI-TOF Analysis. *Holzforschung*, 2018, vol. 72, iss. 4, pp. 267–274. DOI: <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0125>
22. Taylor E.L., Blazier M., Gordon Holley A. New Pine Planting Strategies for the Western Gulf States. *National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations – 2006*. USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-50. Fort Collins, CO, USDA, 2007, pp. 104–109.
23. Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 2010, vol. 153, iss. 3, pp. 895–905. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
24. Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 2010, vol. 3, iss. 1, pp. 2–20. DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
25. Waterman P.G., Mole S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. London, Blackwell Scientific Publications, 1994. 238 p.
26. Weng J.-K., Chapple C. The Origin and Evolution of Lignin Biosynthesis. *New Phytologist*, 2010, vol. 187, iss. 2, pp. 273–285. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x>