

УДК 574.24:582.475:630\*43

## Оценка стрессовой реакции сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на пирогенное воздействие в условиях Красноярской лесостепи

### Estimation of the stress reaction of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) on the pyrogenic effect in the conditions of the Krasnoyarsk forest-steppe

Гетте И. Г.<sup>1</sup>, Косов И. В.<sup>2</sup>, Коротаева Н. Е.<sup>3</sup>, Боровский Г. Б.<sup>3</sup>

Gette I. G.<sup>1</sup>, Kosov I. V.<sup>2</sup>, Korotaeva N. E.<sup>3</sup>, Borovskii G. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия. E-mail: GetteIrina@yandex.ru

<sup>2</sup> Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН г. Красноярск, Россия. E-mail: letter-box@list.ru

<sup>3</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия. E-mail: knev73@sifibr.irk.ru

<sup>1</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Sukachev Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

<sup>3</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

**Реферат.** Для определения способности к восстановлению и к сохранению акклимационных эффектов было проведено полуколичественное определение содержания белков теплового шока (heat shock proteins, Hsp) и фотосинтетической активности хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), как критериев в оценке общего физиологического статуса. Исследования проводились в сосновых молодняках зеленомошно–разнотравной группы типов леса, располагающихся в лесостепной зоне Южной Сибири. На опытном участке в 2017 г. проводилось экспериментальное контролируемое выжигание. Проведенные экспериментальные исследования выявили различия в относительном параметре замедленной флуоресценции и в содержании Hsp, свидетельствующие о модификации некоторых физиологических процессов в растениях после экспериментального выжигания.

**Summary.** For the evaluation of pine needles (*Pinus sylvestris* L.) stability and reconstructive period after the fire the determination of the heat shock proteins (Hsp) and photosynthetic activity were indicated. The object of research was pine saplings (I age class) from the rich in herbs forest with abundant pleurocarpous moss that was located in forest steppe zone of South Siberia. In the pilot site in 2017 a controlled burning that simulating a low-intensity fire was carried out. Our results are indicative of differences in the relative parameter of delayed fluorescence and in the content of Hsp. This can lead to a conclusion that some physiological processes in plants are modified by stress events.

Лесные пожары являются одним из важнейших циклически повторяющихся экологических факторов, которые сопровождают бореальные леса на протяжении длительного периода их развития, и в настоящее время рассматриваются с позиции мощного и активно действующего фактора формирования лесных биогеоценозов (Иванова, 2014). Они определяют рост и развитие древесных растений не только через изменение температурного режима, но и через воздействие на среду обитания. Распределение лесных пожаров по территории Сибири неравномерно: в основном они сосредоточены в районах с насаждениями лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), которые характеризуются повышенной пожароопасностью (Евдокименко, 2008; Валендик и др., 2014).

В настоящее время все больший интерес проявляется к изучению влияния различных стрессовых факторов на рост и развитие растений. Под влиянием различных стрессов в растениях происходят многочисленные изменения на анатомо-морфологическом, физиолого-биохимическом, регенерационном и т. д. уровнях. Лесные пожары можно отнести к стрессовым абиотическим факторам, с коротким интервалом действия высоких температур. Ассимилирующие органы древесных растений являются наиболее чувствительными к изменениям окружающей среды (Тужилкина, 2009). Конвективный поток

низового пожара оказывает непосредственное влияние на вегетативные органы растений, что впоследствии сказывается на состоянии организма в целом. Именно изменение активности фотосинтеза и синтеза стрессовых белков часто является первой реакцией при тепловом стрессе (Гирс, 1982; Wahid et. al., 2007; Timperio et. al., 2008).

Проведение исследований по оценке первичной реакции растительных организмов на тепловой шок в условиях естественного пожара методологически невозможно. Тогда как, контролируемое выжигание позволяет получить характеристики температурного воздействия и проследить стрессовую реакцию дерева как сразу, так и через необходимый промежуток времени.

Таким образом, цель нашей работы заключалась в определении фотосинтетической активности и содержания Hsp а так же способности к восстановлению ассимиляционного аппарата хвои сосны обыкновенной, подвергавшейся тепловому стрессу при низовом пожаре.

Район исследования расположен в 5 км к северо-востоку от п. Устюг Емельяновского района Красноярского края и представляет собой участок островной лесостепи на дерново-подзолистой почве с насаждением сосняка 1 класса возраста зеленомошно-разнотравной группы типов леса. В 2017 г. был заложен экспериментальный участок (ЭУ), на котором было проведено контролируемое горение методом отжига от одной стороны участка, имитирующий кромку низового пожара слабой силы. Для оценки интенсивности воздействия конвективного теплового потока в ходе экспериментального выжигания использованы термопарные датчики, установленные в кроне модельных деревьев на высоте 3 м. Для измерения температуры конвективного потока использовались хромель-алюмелевые термопары в мягкой изоляции, автономные регистраторы (логгеры) EClerk–USB.

Удобным и перспективным методом несущим информацию о функционировании первичных реакций фотосинтеза является метод регистрации флуоресценции хлорофилла, исходя из того, что состояние фотосинтетического аппарата в значительной степени соответствует общему состоянию растения. Определение параметров замедленной флуоресценции проводилось на флуориметре Фотон-10 (Россия). Учитывались методические рекомендации для отбора хвои сосны обыкновенной и их анализа (Григорьев и др., 1996; Григорьев, Андреев, 2012). Немаловажным показателем физиологического состояния древостоев в послепожарный период является изменение содержания фотосинтетических пигментов в хвое. Содержание фотосинтетических пигментов определяли в хвое второго года жизни с помощью спектрофотометра SPEKOL1300 Analytik Jenna AG после экстракции в 85 % ацетоне (Гавриленко, 2003). Для оценки содержания стрессовых белков в хвое использован современный высокочувствительный аналитический метод выделения и полуколичественной оценки содержания белков теплового шока растений (Вестерн–блоттинг). Отбор образцов для регистрации замедленной флуоресценции и определения содержания Hsp производился через 30 минут после экспериментального выжигания, а так же на 3е и 5е сутки. Количественный состав фотосинтетических пигментов определен на следующие сутки после эксперимента.

Анализируя температурные профили, представленные на рис. 1, можно отметить, что горение протекало в различных фазах, принимая ускоренную или устойчивую форму. Колебания температур во время горения связаны с периодическими возмущениями ветра в зоне эксперимента, в том числе при полном штиле. Интенсивное и быстрое сгорание легкогорючего материала (рис. 1а) вызвано подтоком воздуха и на графике имеет один пик в одной точке кроны, с меньшей продолжительностью, но более высокой температурой. Устойчивое горение (рис. 1б) без ускорения движения воздуха может сопровождаться двумя и более пиками температур, и более продолжительным воздействием температуры в одной точке кроны. Средние температуры в кроне модельных деревьев составили  $46 \pm 7^\circ\text{C}$ , что превышает физиологический оптимум вида. Температуры выше  $30^\circ\text{C}$  оказывали влияние в диапазоне от 5,5 до 11,8 минут, максимальные значения варьировали от  $48^\circ\text{C}$  до  $76^\circ\text{C}$ . Такое непродолжительное влияние высоких температур может запускать в растениях многочисленные структурные и функциональные изменения, важное место среди которых занимают изменения фотосинтетического аппарата. На рис. 2 представлен относительный показатель замедленной флуоресценции (ОПЗФ) для двухлетней хвои сосны обыкновенной в краткосрочной динамике восстановления.

Для побегов, отобранных с пробной площади после проведения экспериментального выжигания, уровень фотосинтетической активности снижается, относительно контроля. Однако уже на 2 и 5

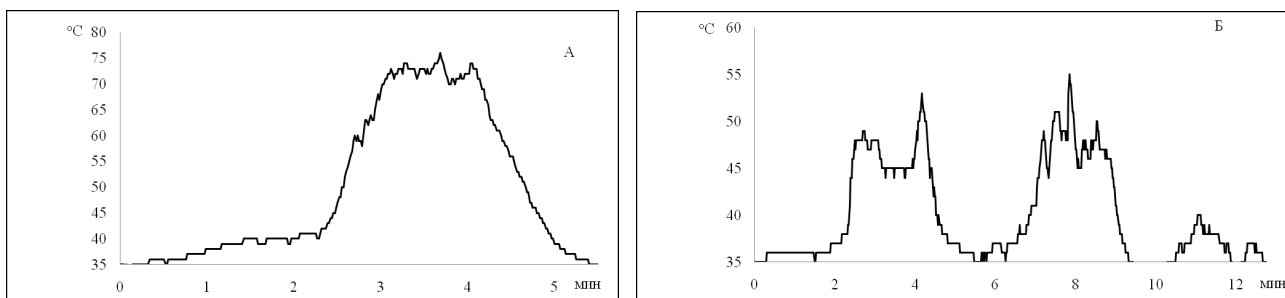


Рис. 1. Графики температуры конвективного потока от кромки пожара (температурные профили получены с модельных деревьев).

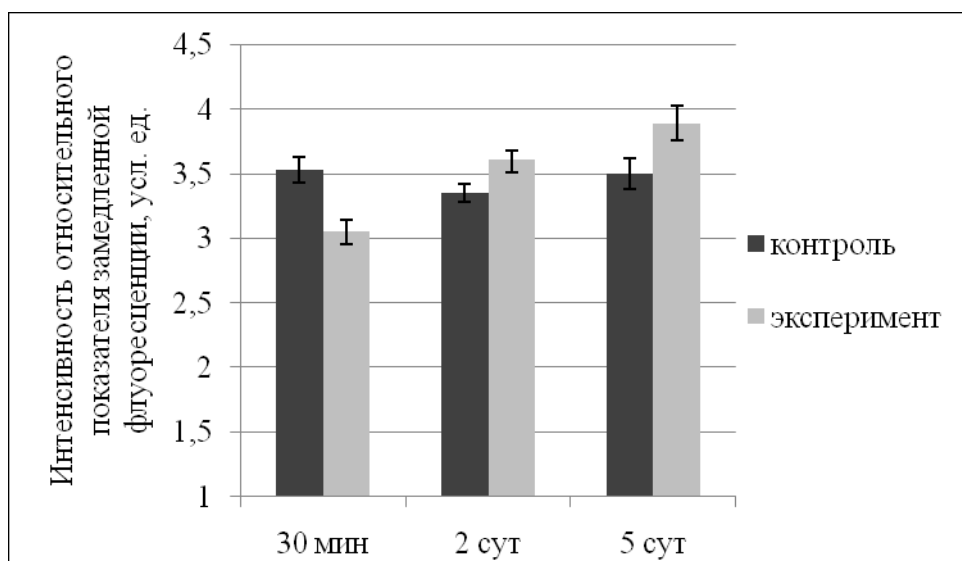


Рис. 2. Относительный показатель замедленной флуоресценции хвои сосны обыкновенной сразу после проведения искусственного выжигания и в краткосрочной динамике.

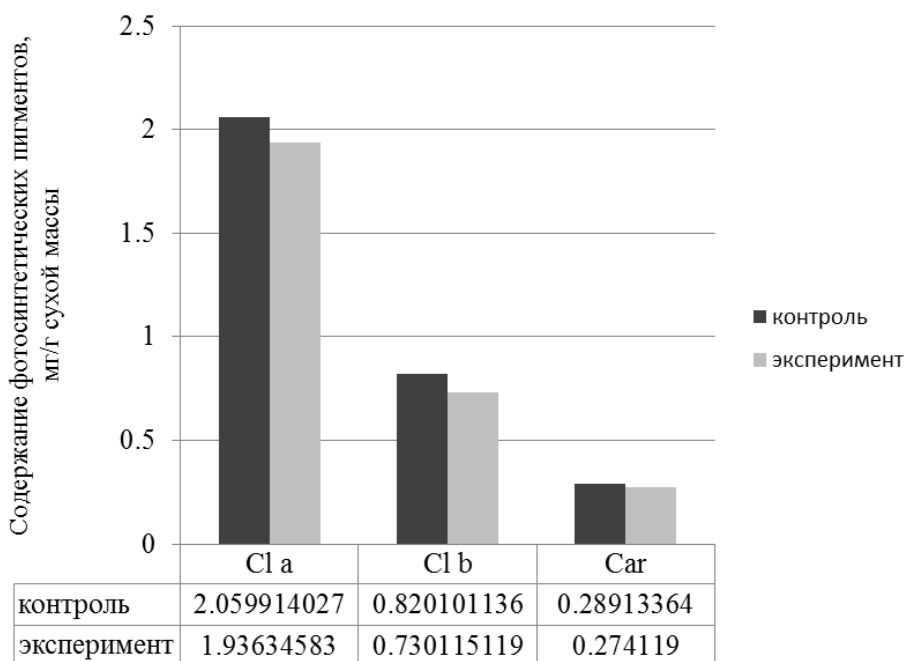


Рис.3. Содержание хлорофиллов *a*; *b*, каротиноидов

сутки наблюдается восстановление фотосинтетической активности хвои, испытавшей влияние высоких температур конвективного потока. При этом в периоде восстановления наблюдается некоторое увеличение ОПЗФ относительно контрольных деревьев, не испытывающих действия огня.

Известно, что отклонение температуры среды от оптимальной зоны, свойственной виду, влияет на количественные и качественные характеристики пигментного фонда пластид, структурную организацию хлоропластов и их функциональную активность (Гирс 1982, Судачкова и др., 2016). Так как в результате горения на ассимиляционные органы воздействуют высокие температуры, был отобран материал для оценки состояния и соотношения фотосинтетических пигментов с модельных деревьев. Данные сравнительного анализа содержания хлорофиллов а и b, каротиноидов (рис. 3) в хвое отражают небольшое снижение количества пигментов после контролируемого выжигания.

Одним из проявлений защитных механизмов фотосинтезирующих органов растений является ускоренный синтез белков теплового шока, действующих как молекулярные шапероны (heat shock proteins, Hsp) (Кулаева, 1997; Xu et. al., 2011). При этом функционирование высокомолекулярных белков (110–50 кДа) осуществляется только при участии низкомолекулярных белков (40–15 кДа). На рис. 4 представлены данные по полуколичественному содержанию высокомолекулярного Hsp 101 и низкомолекулярного Hsp 17.6, по отношению к контролю. Сведений о содержании Hsp в хвое голосеменных крайне мало. Однако, имеются данные о том, что с небольшими количественными изменениями Hsp 101 присутствует в клетке постоянно, Hsp 17.6 накапливается преимущественно в теплое время года (Korotaeva et. al., 2012), что подтверждается полученными результатами, для контрольных образцов. Прекращение кратковременного действия теплового шока, вызванного огневым воздействием, и возврат температуры к фоновым значениям привело к небольшому увеличению содержания стрессовых белков в хвое, отражающих первичную стрессовую реакцию деревьев на пирогенное воздействие. Тогда как на 2 экспериментальные сутки, после выжигания, отмечено значительное увеличение в содержании Hsp 101 и 17.6. Подобное накопление могло быть следствием продолжительного тления подсти-

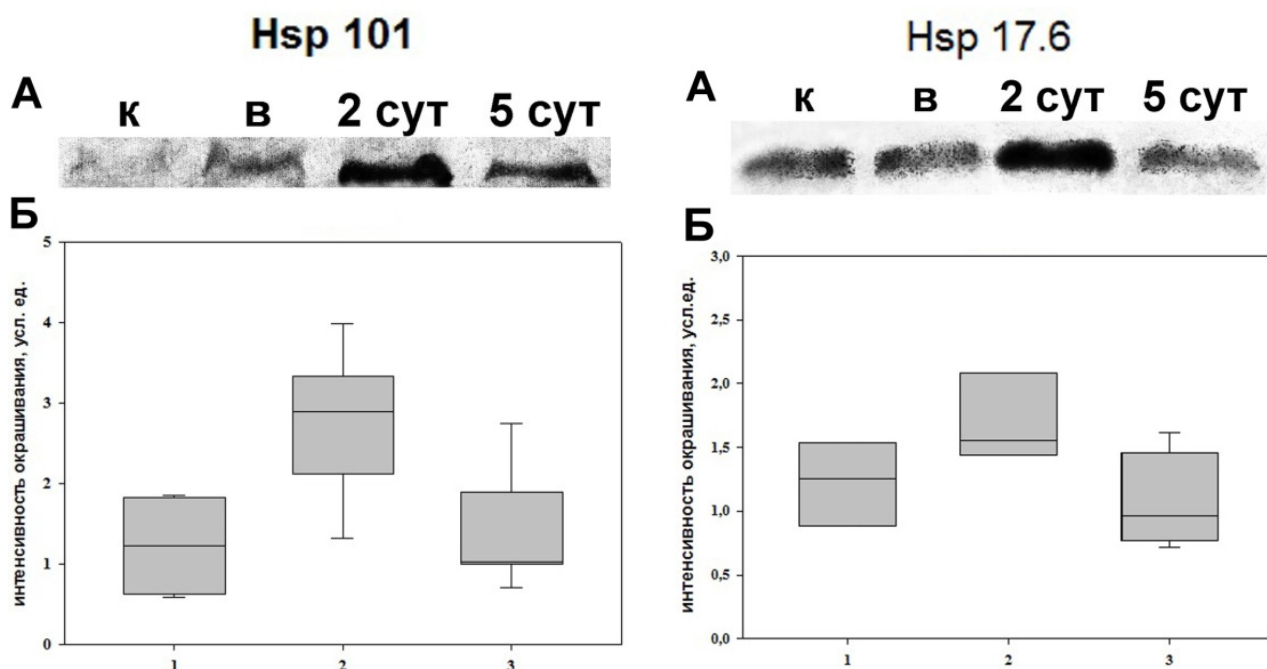


Рис. 4. Изменение содержания Hsp101 и Hsp17,6 в хвое сосны обыкновенной сразу после проведения искусственного выжигания и в краткосрочной динамике (Представлено изображение типичной мембраны после визуализации антител (А) и результат денситометрической оценки интенсивности окрашивания белковых пятен Б (к – контроль; в – через 30 мин после выжигания; 2сут – через 2 сутки после выжигания; 5сут – через 5сутки после выжигания. Интенсивность окрашивания каждого белка представлена в условных единицах относительно контроля, принятого за 1).

лающей поверхности, и как результат прогрев поверхностного слоя почвы и корней, а так же живых клеток камбия, что отразилось на состоянии организма в целом. В краткосрочной динамике, по результатам на 5 экспериментальные сутки, отмечено снижение низкомолекулярного Hsp почти до контрольного уровня. Тогда как полуколичественное содержание Hsp 101 снижается относительно 2 суток, однако превышает контрольные значения.

Проведенные экспериментальные исследования выявили признаки стрессового состояния древесной лозы через изменение фотосинтетической активности, пигментного комплекса, а так же полуколичественное определение содержания специфических белков теплового шока, как сразу после действия высоких температур, так и в краткосрочном периоде восстановления. Непродолжительное воздействие высоких температур на древесную лозу привело к незначительному увеличению фотосинтетической активности в периоде восстановления. Отмечено накопление стрессовых белков в хвое, что может представлять один из компонентов защитной реакции, определяющих возможность восстановления нормальной жизнедеятельности.

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-го проекта № 17-34-50051 «мол\_нр» (Оценка содержания стрессовых белков в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) после низовых пожаров в условиях Красноярской лесостепи).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Валендик Э. Н., Кисляхов Е. К., Рыжкова В. А., Пономарев Е. И., Голдаммер Й. Г.** Лесные пожары в средней Сибири при аномальных погодных условиях // Сибирский лесной журнал, 2014. – № 3. – С. 43–52.
- Гирс Г. И.** Физиология ослабленного дерева. – Новосибирск: Наука, 1982. – 246 с.
- Гавриленко В. Ф.** Большой практикум по фотосинтезу: учеб. пособие. – М.: Академия, 2003. – 256 с.
- Григорьев Ю. С., Андреев Д. Н.** К вопросу о методике регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла при биоиндикации загрязнения воздушной среды на хвойных // Естественные науки, 2012. – № 2. – С. 36–39.
- Григорьев Ю. С., Фуряев Е. А., Андреев А. А.** Способ определения содержания фитотоксических веществ. Патент № 2069851 // Бюллетень изобретений от 27.11.1996 № 33.
- Евдокименко М. Д.** Пирогенная дигрессия светлохвойных лесов Забайкалья // География и природные ресурсы, 2008. – № 2. – С. 109–116.
- Иванова Г. А.** Воздействие пожаров на компоненты экосистемы среднетаежных сосняков Сибири. – Новосибирск: Наука, 2014. – 232 с.
- Кулаева О. Н.** Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский образовательный журнал, 1997. – № 2. – С. 5–13.
- Судачкова Н. Е., Романова Л. И., Астраханцева Н. В., Новоселова М. В., Косов И. В.** Стрессовые реакции деревьев сосны обыкновенной на повреждение низовым пожаром // Сибирский экологический журнал, 2016. – № 5. – С. 739–749.
- Тужилкина В. В.** Реакция пигментной системы хвойных на длительное аэротехногенное загрязнение // Экология, 2009. – № 4. – С. 243–248.
- Korotaeva N. E., Oskorbina M. V., Kopytova L. D., Suvorova G. G., Borovskii G. B., Voinikov V. K.** Variations in the content of stress proteins in the needles of common pine (*Pinus sylvestris* L.) within an annual cycle // Journal of Forest Research, 2012. – Т. 17. № 1. – С. 89–97.
- Timperio. M, Egidi G., Zolla L.** Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP) // Journal Proteomics, 2008. – V. 71(4). – P. 391–411.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R.** Heat tolerance in plants: An overview // Environmental and Experimental Botany, 2007. – V. 61 (3). – P. 199–223.
- Xu Y., Zhan C., Huang B.** Heat Shock Proteins in Association with Heat Tolerance in Grasses // International Journal of Proteomics, 2011. – V1. – 11 p.