

УДК 535.3

## СТРОЕНИЕ, ОПТИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭПИКУТИКУЛЯРНОГО ВОСКА ХВОИ ЕЛИ ГОЛУБОЙ

Е. Р. Буханов<sup>1,2</sup>, А. Д. Шефер<sup>2</sup>, А. В. Шабанов<sup>1</sup>, Ю. Л. Гуревич<sup>2</sup>, М. Н. Крахалев<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН 660036, Красноярск, Академгородок, 50/38<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН» 660036, Красноярск, Академгородок, 50

E-mail: k26tony@ya.ru, shefer.ad@ksc.krasn.ru, alexch\_syb@mail.ru, Btchem@mail.ru, kmn@iph.krasn.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023 г.

Предложен метод по отделению чистых пластин эпикутикулярного воска. Использование воды, способной глубоко проникать в восковые структуры под действием сил Ван-дер-Ваальса и расширяться при замерзании, позволяет быстро получить незагрязненные восковые пластины с нативной структурой без каких-либо сторонних химических примесей. С помощью сканирующей электронной микроскопии были получены снимки воска хвои ели голубой (*Picea pungens* Engelm.). Определены его морфологические и структурные характеристики. Отличительной особенностью является наличие восковых нанотрубочек с характерными диаметром ~150 нм и длиной 3–5 мкм. Нанотрубочки лежат друг на друге стопками, образуя одномерную длиннопериодическую решетку. Проведены микроскопические наблюдения воска, сделанные в отраженном и прошедшем свете. Показано, что покрытие хвои ели голубой состоит из микрочастичек воска, обладающих структурным окрасом. В широком спектральном диапазоне отдельные частички изменяют цвет от синего до красного, как следствие, большие конгломераты частичек имеют белый цвет. Получены спектры флуоресценции хвои с нативным восковым покровом и той же самой хвои после удаления воска. При сравнении ширины линий флуоресценции на полувысоте хвоинки голубой ели с воском и без, выявлено влияние воскового слоя на время жизни возбужденных электронов в фотосистеме II, тем самым установлена связь между восковым покровом и процессом фотосинтеза. Методом трансфер матриц выполнены расчеты спектров пропускания для решетки, схожей с восковой структурой, хлоропластом и сочетанием восковой структуры с хлоропластом. В последнем варианте длинноволновая зона селективного отражения значительно шире, чем у отдельных случаев. При рассмотрении структуры, содержащей хлоропласт и эпикутикулярный воск, наблюдается небольшое расщепление стоп-зоны, как при наличии дефекта, что способствует высокой концентрации энергии в месте расщепления. Вследствии роста концентрации энергии увеличивается плотность фотонных состояний на соответствующих длинах волн. Этот эффект важен для фотосинтеза, поскольку, согласно золотому правилу Ферми, скорость реакции пропорциональна плотности фотонных состояний. Результаты расчетов находятся в хорошем согласии с экспериментальными спектрами.

**Ключевые слова:** фотонный кристалл, электронная микроскопия, оптическая микроскопия, флуоресцентная спектроскопия, численное моделирование одномерных фотонных кристаллов, *Picea pungens* Engelm.

DOI: 10.15372/SJFS20240111

### ВВЕДЕНИЕ

Эпикутикулярный воск играет очень важную роль в жизни растений. Он выступает в качестве защитного барьера от патогенов, в то же время сохраняя влагу в листьях (Reicosky, Hanover, 1978; Dragota, Riederer, 2008; Harrington, Carlson,

2016; Guo et al., 2016; Bi et al., 2017; Weaver et al., 2018). Помимо биологических функций, воск выступает в роли светового фильтра, защищая внутреннюю структуру листьев от разрушительного воздействия ультрафиолетового излучения (Grant et al., 2003). Обширный функционал воскового покрова обусловлен не только

его химическими свойствами, но и структурными характеристиками, которые способны изменяться с помощью термических, механических и световых воздействий. Воски состоят из конгломератов длиннопериодических молекул углеводов, кислот и спиртов, и, как правило, их длина составляет более 20 C–C-связей. Количественное соотношение спиртов и кислот различно для разных видов растений. В эпикутикулярных восках содержится мало обеспечивающих окраску флавоноидов, хотя эта группа химических соединений вырабатывается растениями в достаточном количестве. По этой причине есть основания полагать, что уникальные оптические свойства воска обусловлены главным образом структурными особенностями.

При высокой гибкости полимерных цепей и их химическом разнообразии образуется упорядоченная структура воска (Barthlott, 1990; Walton, 1990; Bianchi, 1995; Barthlott et al., 1998; Kunst, Samuels, 2003; Koch et al., 2006a). Самообразование таких структур подробно изучено в работах К. Koch и соавт. (2006b), S. K. Dora (2007), S. K. Dora и K. Wandelt (2011), G. E. J. Poinern и соавт. (2011), S. K. Dora и соавт. (2018), при этом проведены исследования превращений под влиянием внешних воздействий. Интересные результаты получены при выяснении роли подложки. На полярных подложках выявлено, что ориентация осей выросших кристаллов имеет более высокое упорядочение, чем на неполярных. В работах D. Lee (2010), K. R. Thomas и соавт. (2010), S. Vignolini и соавт. (2013) были обнаружены спирально закрученные структуры, обладающие эффектом хиральности, со знаком и свойствами фотонных кристаллов, поскольку шаг спирали сильно зависит от температуры и в определенном температурном диапазоне становится сравнимым с длиной волны света. Цвет отраженного света зависит не только от наличия пигментов, но в большей степени – от шага спирали. При этом сохраняется соотношение амплитуд и фаз электрического и магнитного полей, что обеспечивает дифракцию света на плавном градиенте, обусловленном вращением оптической оси. В обычных фотонных кристаллах дифракция обусловлена разными показателями преломления слоев сред, из которых изготовлен фотонный кристалл. Требуемые параметры могут быть достигнуты путем подбора материалов с разными показателями преломления и разной толщиной слоя.

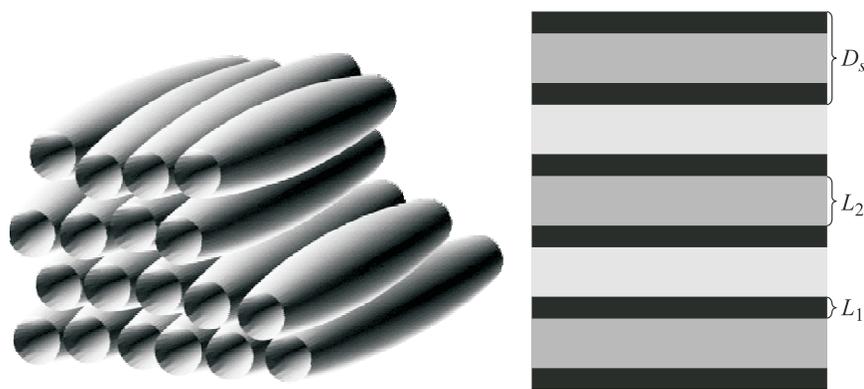
Цвет, обусловленный структурными особенностями, обычно называют структурным, в от-

личие от химического цвета, обусловленного поглощением молекулами пигментов. Структурная окраска меняется при изменении угла обзора. У геликоидальной структуры цветовой контраст не максимальный, поскольку отражает только одну из двух циркулярно-поляризованных волн. Эта проблема в природе решается не менее изящно. Используются чередующиеся лево- и правосторонние геликоидальные структуры (Ensikat et al., 2000, 2006; Буханов и др., 2019; Ветров и др., 2020; Vetrov et al., 2020). В них периодически повторяющиеся лево- и правозакрученные структуры формируют полосы отражения для света любой поляризации. В случае бесконечного кристалла такие диапазоны частот могут образовывать фотонные запрещенные зоны.

Цель исследования – изучение оптических и спектральных характеристик эпикутикулярного воска хвои ели голубой (*Picea pungens* Engelm.) для выяснения его роли в процессе фотосинтеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Выделение воска.** Получение воскового покрова листьев с его нативной структурой – очень сложная задача. Механическое разделение слишком грубое, даже глазомерно видно изменение формы, что, естественно, связано с изменением микроструктуры. Любое химическое воздействие также приводит к неоднородной кристаллизации и, естественно, к изменению микроструктуры. В работе предложен и использован уникальный метод по получению целых пластов эпикутикулярного воска. Мы использовали воду, которая способна глубоко проникать в восковые структуры под действием сил Ван-дер-Ваальса и расширяться при замерзании. Для этого чистые хвоинки, на которых по всей поверхности была видна синяя окраска, свидетельствующая о целостности эпикутикулярного воска, помещали в сосуд с дистиллированной водой. Время выдержки для разных образцов варьировалось от 1 до 12 ч. В дальнейшем сосуд с водой был помещен в емкость с жидким азотом, для мгновенной заморозки. При этой температуре вода замерзала не только в объеме, но и в порах воска. После чего сосуд нагревался с помощью устройства слабого нагрева при минимальной мощности. После оттаивания гладкие восковые пластинки всплывали на поверхность и собирались на подложку. Использовалось три



**Рис. 1.** Трехмерная модель расположения восковых нанотрубок (слева) и одномерная периодическая решетка (справа) с расчетными параметрами:  $D_s = 140$  нм;  $L_1 = 30$  нм;  $L_2 = 80$  нм, и показателями преломления слоев толщиной  $L_1$  и  $L_2$  при  $n_1 = 1.46$ ;  $n_2 = 1.00$  соответственно.

типа подложек: металлические – для исследования образцов методом электронной микроскопии высокого разрешения, кварцевые – для измерения оптических характеристик и стеклянные с электропроводящим слоем (ITO) – для контрольной оценки образцов.

Исследования в качестве подложки на стекле с проводящим слоем ITO позволяют проводить измерения на одном образце различными методами (электронная микроскопия, оптические измерения). Но использование кварцевых и металлических подложек позволяет получить более точные исследуемые параметры отделенных восковых пластинок, соответствующие методу, применяемому к конкретной подложке. Причины всплывания восковых пластинок обусловлены тем, что их объемная плотность меньше плотности воды. Они гидрофобны, энергия взаимодействия с водой меньше энергии взаимодействия с кварцем или металлом, поэтому, не искажая структуру, они легко ложатся на металлические и кварцевые подложки.

**Микроскопия.** Морфологические и структурные характеристики выделенного воска с поверхности хвой изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе Hitachi SU3500 (ускоряющее напряжение 10 кВ, W-катод). Ввиду отсутствия химически активных примесей есть все основания предполагать, что изображения структуры, полученные методом электронной микроскопии, имеют минимальные искажения. Восковые пластины оптически наблюдали в проходящем и отраженном свете с использованием микроскопа Axio Imager.A1m (Zeiss) и объектива  $50 \times 0.55$ .

**Математическое моделирование.** Для расчета спектров использовалась модель из упа-

ковки восковых трубочек в слоисто-мозаичную структуру из стопок (рис. 1).

Между трубочками имеется небольшое воздушное пространство, соответствующее внутреннему пространству трубочек (полый части). Свет проходит поперек стопки.

В настоящей работе проведены расчеты спектров пропускания периодических структур, соответствующих реальным параметрам воска. Для этого использовался метод трансфер-матриц. Математическая часть данного метода и расчет электромагнитных полей на его основе подробно описаны в предыдущих работах (Шабанов и др., 2017; Буханов и др., 2018).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Электронная микроскопия.** При исследовании образцов с помощью электронного микроскопа использовались низкое ускоряющее напряжение и малый ток пучка, не искажающий реальную структуру. На рис. 2 показаны результаты, полученные с поверхности хвой ели голубой.

Наблюдаемая структура состоит из полых нанотрубок характерных размеров: диаметром около 150 нм и длиной 3–5 мкм. На изображениях, представленных на рис. 2, видно, что воск заполняет практически всю поверхность хвоинки. На первый взгляд, трубочки расположены хаотично. Но при более детальном рассмотрении правого изображения видно, что нанотрубочки ложатся друг на друга, образуя стопки, состоящие из чередующихся слоев воска и воздуха. При прохождении света через подобные стопки по направлению к внутренней части листа могут наблюдаться эффекты, свойственные периодическим структурам.

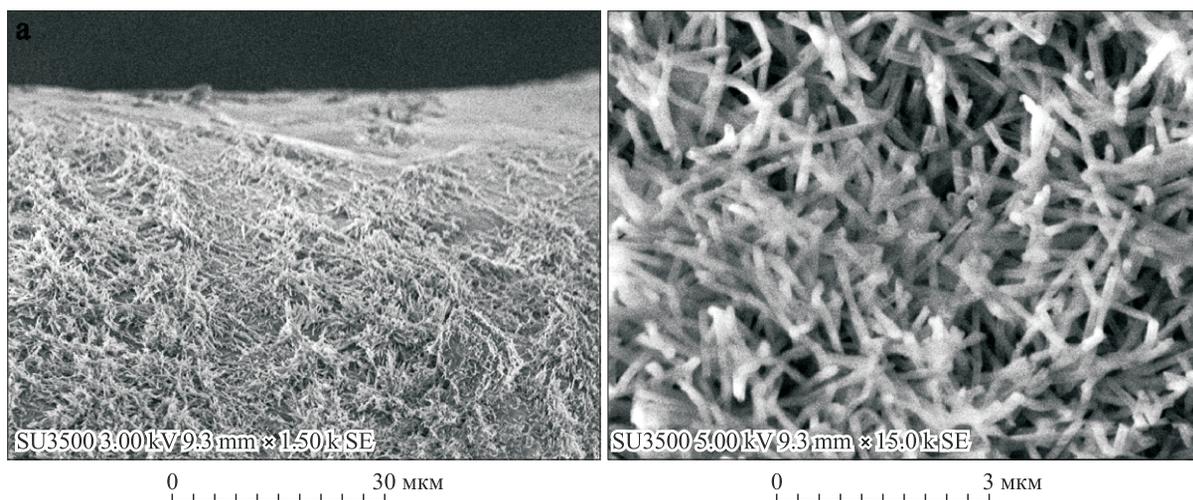


Рис. 2. СЭМ-изображения образцов воскового слоя хвои голубой ели, сделанные при разных увеличениях.

**Восковое покрытие на хвоинках.** Цвет хвои исходно имеет голубой оттенок, который изменяется на зеленый при удалении воскового покрытия (рис. 3).

Для выяснения вопроса влияния воскового покрытия на оптические свойства проведены микроскопические исследования поверхности хвои, покрытой воском (рис. 4).

Фотографии были сделаны в отраженном свете, видно, что восковое покрытие состоит из микрочастичек размером несколько микрон. Плотность расположения частичек может варьироваться от участка к участку, при этом они образуют конгломераты различного размера. Большие конгломераты, при наблюдении в отраженном свете имеют преимущественно белый цвет. Участки поверхности хвои без микрочастичек воска имеют только зеленый окрас (рис. 4, а). Отдельные частички имеют яркий окрас, изменяющийся от частички к частичке от синего до красного. Помимо небольших частичек имеются более крупные элементы (рис. 4, б), которые также окрашены, при этом цвет может

изменяться в пределах одного кусочка от участка к участку.

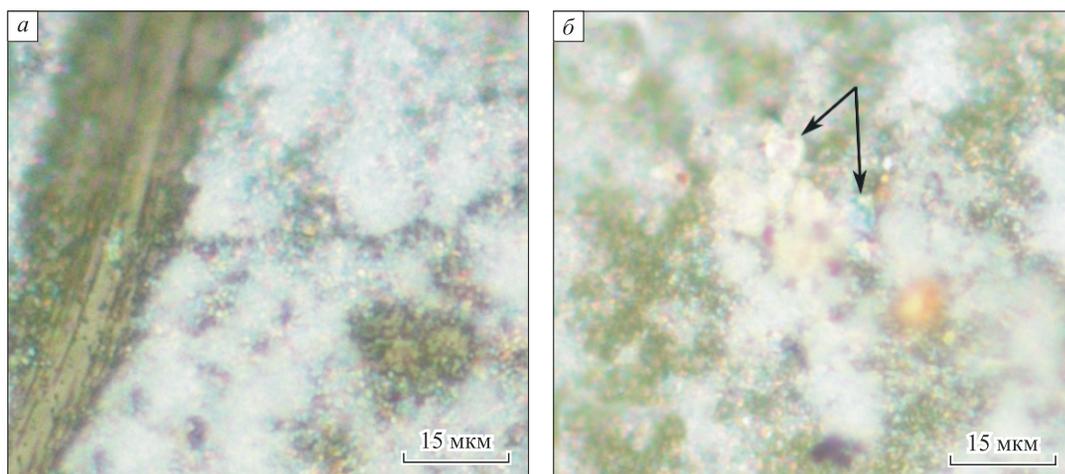
Поскольку у микрочастичек воска наблюдается множество цветов, то можно предположить, что их окрас является структурным и не связан с поглощением света пигментами. Различный цвет частичек может быть обусловлен различием в периоде структуры, отражающей свет, либо несферической формой частичек, плоскости которых ориентированы под различными углами по отношению к направлению наблюдения. Вследствие наличия частичек, отражающих свет разного цвета, интегральная спектральная характеристика отраженного (рассеянного) света имеет цвет, близкий к белому, наблюдаемый у больших кластеров микрочастичек.

**Восковое покрытие на стекле.** На рис. 5, а показаны фотографии микрочастичек воска, отделенные от хвои вышеописанным методом и нанесенные на стекло.

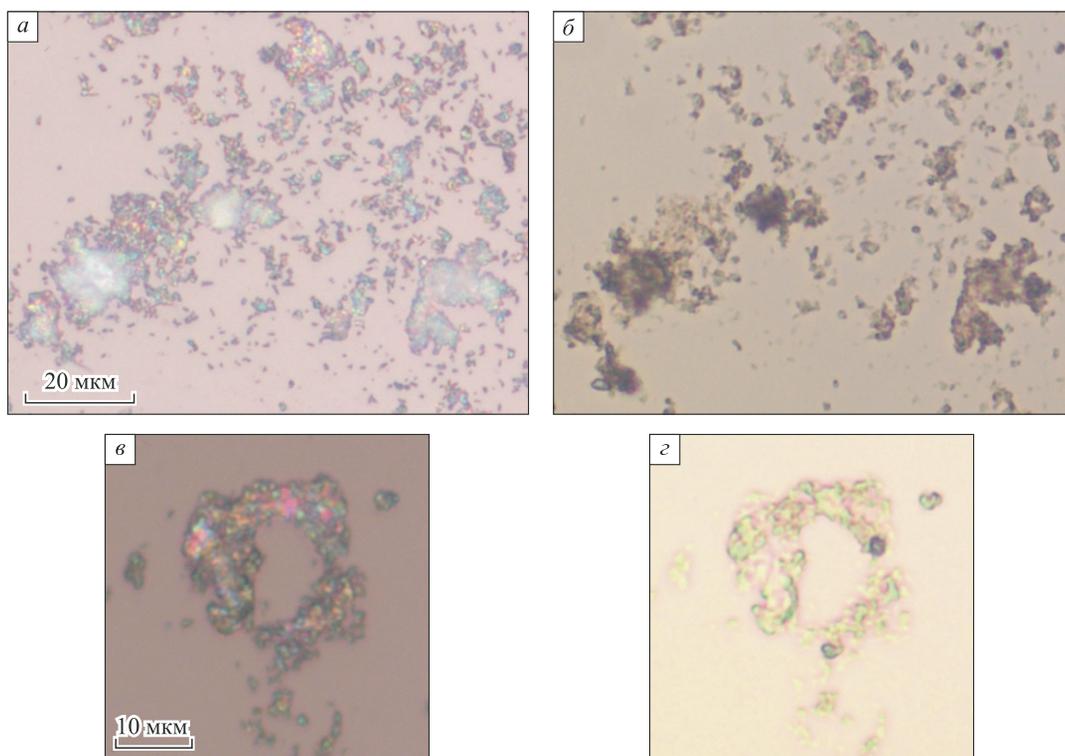
Фотографии сделаны в отраженном свете. Видно, что характерный размер, наличие кластеров и цвет частичек воска, наблюдаемый в отраженном свете, аналогичны их морфологии и гамме цветов, наблюдаемых на хвое (см. рис. 4, а). При наблюдении в проходящем свете цвет микрочастичек менее насыщенный и отличается от цвета, наблюдаемого в отраженном свете (рис. 5, б). Например, частички, окрашенные в розовый цвет при наблюдении в отраженном свете, имеют желто-зеленый окрас при наблюдении в проходящем свете. Частички синего цвета в отраженном свете окрашены в светлорозовый цвет при наблюдении на пропускание (рис. 5, в, г). Аналогичные изменения цвета можно наблюдать у холестерического жидкого кристалла, имеющего структурный окрас



Рис. 3. Веточки ели голубой до (слева) и после (справа) удаления воска.



**Рис. 4.** Участки поверхности хвой с восковым покрытием, снятые в отраженном свете с различной плотностью распределения воска (а) и участок с крупными частичками воска, показанными стрелками (б).



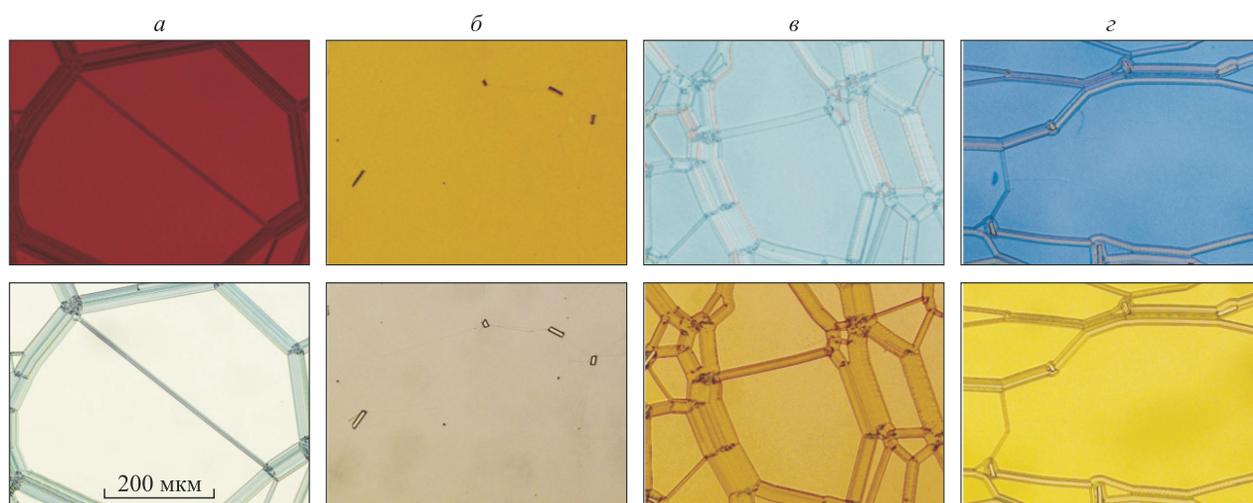
**Рис. 5.** Частички воска на стекле, снятые в отраженном (а, б) и проходящем (в, г) свете и отдельный кластер частичек воска (в, г).

(селективное отражение света). Для примера, на рис. 6 показаны фотографии слоев холестерика с различным шагом спирали, сделанные в отраженном (рис. 6, верхний ряд) и проходящем (рис. 6, нижний ряд) свете.

Шаг спирали холестерика соответствует положению максимума селективного отражения в видимом диапазоне спектра. Как следствие в отраженном свете наблюдается яркий окрас, зависящий от шага спирали, который отличается от

цвета холестерика, наблюдаемый в проходящем свете. Например, синему цвету, наблюдаемому в отраженном свете, будет соответствовать желтый цвет, полученный на пропускании.

Таким образом, из полученных выше результатов микроскопических наблюдений воскового покрытия, сделанные в отраженном и проходящем свете, можно заключить, что наблюдаемый цвет микрочастичек воска обусловлен их структурой.



**Рис. 6.** Холестерик в отраженном (верхний ряд) и проходящем (нижний ряд) свете.

Шаг спирали холестерика соответствует максимуму селективного отражения нормально падающего света в красной (а), желто-оранжевой (б), сине-зеленой (в) и синей (з) области спектра.

**Спектроскопия.** Для измерения спектров возбуждения и испускания флуоресценции использовался спектрофлуориметр SOLAR CM2203 со сдвоенными монохроматорами. Съемка образцов проводилась в геометрии прямого угла между направлениями возбуждающего и испускаемого излучений, под углом наклона  $45^\circ$  поверхности, состоящей из ряда иголок, к направлению регистрации излучения. Длина волны ( $\lambda$ ) возбуждающего излучения 480 нм.

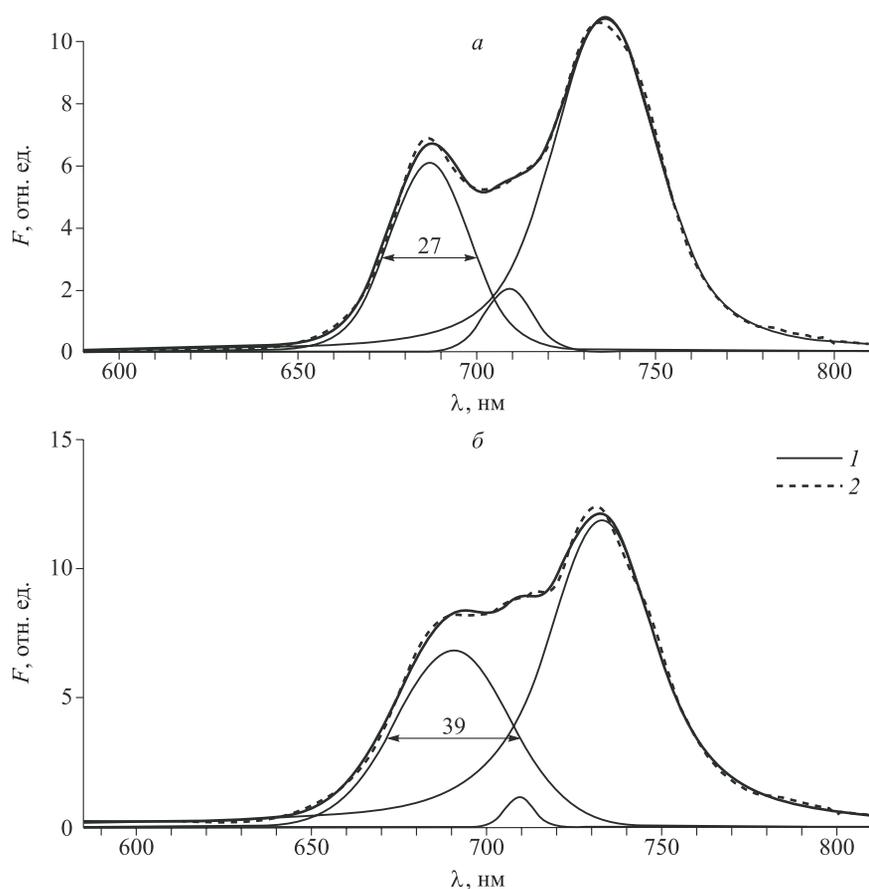
В данной работе получены спектры флуоресценции хвои с полноценным неповрежденным восковым покровом и той же самой хвои после удаления воска. Также для полученных спектральных данных было проведено разделение контуров для оценки полуширин пиков фотосистемы II. Разделение контуров спектра проводилось с помощью программы Fityk. Результаты представлены на рис. 7, на котором отчетливо видно, что пик на полувысоте, соответствующей фотосистеме II (680 нм), заметно шире в случае без воска (39 нм), чем при его наличии (27 нм). Это свидетельствует о том, что скорость переноса электронного возбуждения между системами фотосинтеза PS II и PS I выше при наличии воска.

На основании полученных структурных параметров восков и параметров хлоропластов Е. Р. Бухановым с соавт. (2023; Bukhanov et al., 2023) были проведены расчеты спектров пропускания для решетки, схожей с отдельной восковой структурой, отдельным хлоропластом и с сочетанием восковой структуры с хлоропластом (рис. 8).

Из результата расчетов видно, что, в отличие от отдельных моделей, совокупность двух под-решеток имеет две стоп-зоны, а не одну в видимой области спектра. Длинноволновая зона селективного отражения стала значительно шире, чем у отдельных случаев. К тому же у нее произошло небольшое расщепление, как при наличии дефекта, что способствует высокой концентрации энергии в месте расщепления стоп-зоны. Вследствие роста концентрации энергии увеличивается плотность фотонных состояний на соответствующих длинах волн. Этот эффект важен для фотосинтеза, поскольку, согласно золотому правилу Ферми, скорость реакции пропорциональна плотности фотонных состояний. Этот результат находится в согласии с экспериментальными данными.

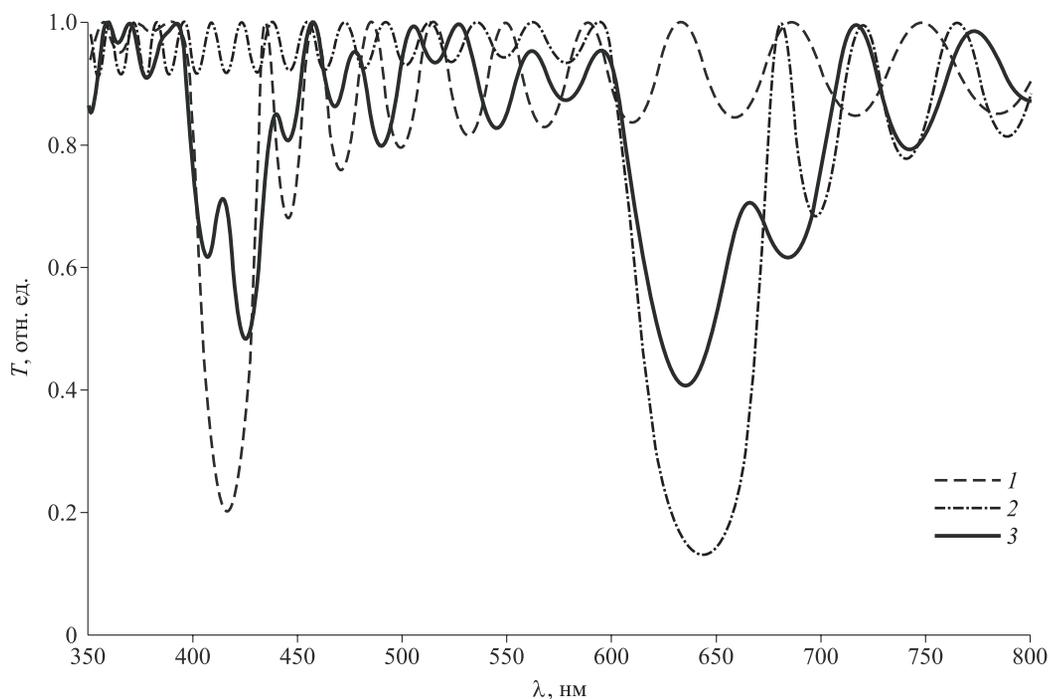
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведение исследования морфологии воска хвои голубой ели на электронном микроскопе (см. рис. 2) позволило установить основные структурные единицы – нанотрубки с характерным размером: диаметром  $\sim 150$  нм и длиной 3–5 мкм. При их параллельном расположении образуется периодическая структура со слоями воздуха и воска. Параллельное расположение нанотрубок обусловлено структурой молекул воска, которые представляют собой длинно-периодические цепи из С–С-связей. Взаимодействие между молекулами осуществляется за счет слабых сил Ван-дер-Ваальса. По этой причине даже слабые внешние воздействия



**Рис. 7.** Спектры флуоресценции ( $F$ ) с разделенными контурами. Спектр хвои с воском ( $a$ ) и без воска ( $b$ ).

1 – экспериментальные данные; 2 – рассчитанные отдельные основные контуры.



**Рис. 8.** Расчетные спектры пропускания ( $T$ ) для модели чистого воска (1), модели хлоропласта (2) и модели воск – хлоропласт (3).

могут изменить структурные и физические характеристики. Структуры, состоящие из повторяющихся слоев с разными показателями преломления, называют фотонно-кристаллическими, если период сравним с длиной волны света. Характерная особенность фотонных кристаллов – наличие фотонной запрещенной зоны – спектрального интервала, на границах которого происходит полное или частичное отражение падающих на образец световых волн. Внутри этого участка локальная плотность световых мод равна нулю, а на его краях резко возрастает.

Между периодической структурой воскового слоя и его флуоресцентными параметрами была установлена связь (Буханов и др., 2019). Благодаря образованию запрещенной зоны и сильному поглощению в области ультрафиолета происходит перекачка энергии с одного края на другой, т. е. из ультрафиолета в видимую область в качестве испускания люминесценции. Таким образом, за счет фотонно-кристаллических свойств воск способен усиливать поглощенную энергию на краях стоп-зоны или на дефекте, а также конвертировать поглощаемый свет в более подходящий по длине волны для растения.

Слоистое строение воска действует как оптический фильтр, регулирующий интенсивность света проходящего в глубь листа. Впервые на этот факт обратили внимание М. G. Holmes и D. R. Keiller (2002), которые показали (обнаружили) увеличение коэффициентов отражения воска более чем в 2 раза при длине волны света свыше 680 нм и более чем в 5 раз при длине волны 330 нм. Это свойство воска позволяет регулировать тепловые нагрузки, в том числе и защищать от перегрева при высоких и от охлаждения при низких температурах.

Представленные результаты хорошо согласуются с приведенными авторами численными расчетами. Восковая структура за счет своего малого периода обладает зоной селективного отражения в ультрафиолетовой-синей области, образуя зеркало для света длины волны этого диапазона. В результате взаимодействия с внутренними периодическими структурами восковая зона селективного отражения может расширяться или усиливаться, а также вероятно образование дополнительной стоп-зоны в длинноволновой области за счет разных периодов взаимодействующих решеток (рис. 8).

Более того, она регулирует распределение энергии между тремя процессами: реакцией фотосинтеза, флуоресценцией и термическим

снятием возбуждения. Термический процесс более медленный, поэтому на первом этапе фотосинтеза конкуренция происходит между флуоресценцией и фотосинтезом. Изучение спектра флуоресценции хвоинки ели голубой с воском и без воска позволяет сделать вывод о влиянии воска на эффективность фотосинтеза. Здесь все зависит от скорости переноса электронного возбуждения между фотосистемами PS II и PS I. Возникновение двух систем в фотонно-кристаллических средах и их проявление в спектрах описано М. А. Коршуновым с соавт. (2018; Korshunov et al., 2018). В нашем случае задача упрощается, поскольку можно сравнить параметры затухания процесса (ширина линий) и максимума смещения непосредственно из прямых экспериментальных результатов, представленных на рис. 7. Откуда видно, что ширина линии флуоресценции на полувысоте хвоинки голубой ели меньше с воском, чем без воска. Следовательно, процесс передачи электронного возбуждения происходит эффективнее.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование восковых структур хвои голубой ели. Установлено, что они образуют кристаллические долгопериодические структуры. Показано, что периодическая структура воска работает как оптический фильтр, регулирующий интенсивность света, проходящего в глубь листа. Изучение спектра флуоресценции хвои голубой ели с воском и без воска позволяет сделать вывод о влиянии воска на эффективность фотосинтеза. При сопоставлении параметров затухания процесса и максимума смещения непосредственно из прямых экспериментальных результатов видно, что ширина линии флуоресценции хвои голубой ели меньше с воском, чем без воска. Это говорит о том, что процесс передачи электронного возбуждения происходит эффективнее.

*Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буханов Е. Р., Коршунов М. А., Шабанов А. В. Оптические процессы в фотосинтезе // Сиб. лесн. журн. 2018. № 5. С. 19–32.
- Буханов Е. Р., Шабанов А. В., Крахалев М. Н., Волочев М. Н., Гуревич Ю. Л. Влияние строения на оптические свойства эпитикулярного воска голубой ели

- (*Picea pungens*) // Уч. зап. физ. ф-та Моск. ун-та. 2019. № 5.
- Буханов Е. Р., Волочаев М. Н., Пятина С. А. Фотоника хлоропластов растений // Изв. РАН. Сер. физ. 2023. Т. 87. № 10. С. 1458–1462.
- Ветров С. Я., Тимофеев И. В., Шабанов В. Ф. Локализованные моды в хиральных фотонных структурах // Успехи. физ. наук. 2020. Т. 190. № 1. С. 37–62.
- Коршунов М. А., Шабанов А. В., Буханов Е. Р., Шабанов В. Ф. Влияние длиннопериодической упорядоченности в структуре растений на первичные стадии фотосинтеза // ДАН. 2018. Т. 478. № 3. С. 280–283.
- Шабанов А. В., Коршунов М. А., Буханов Е. Р. Исследование электромагнитного поля в одномерных фотонных кристаллах с дефектами // Комп. опт. 2017. Т. 41. № 5. С. 680–686.
- Barthlott W. Scanning electron microscopy of the epidermal surface in plants // Scanning electron microscopy in taxonomy and functional morphology / D. Claugher (Ed.). New York: Oxford Univ. Press, 1990. P. 69–94.
- Barthlott W., Neinhuis C., Cutler D., Ditsch F., Meusel I., Theisen I., Wilhelmi H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes // Bot. J. Linnean Soc. 1998. V. 126. Iss. 3. P. 237–260.
- Bi H., Kovalchuk N., Langridge P., Tricker P. J., Lopato S., Borisjuk N. The impact of drought on wheat leaf cuticle properties // BMC Plant Biol. 2017. V. 17. N. 1. Article number: 85. 13 p.
- Bianchi G. Plant waxes In: Waxes: chemistry, molecular biology and functions / R. J. Hamilton (Ed.). Dundee, Scotland: Oily Press, 1995. P. 175–222.
- Bukhanov E. R., Volochaev M. N., Pyatina S. A. Photonics of plant chloroplasts // Bull. Rus. Acad. Sci.: Phys. 2023. V. 87. N. 10. P. 1488–1492 (Original Rus. text © E. R. Bukhanov, M. N. Volochaev, S. A. Pyatina, 2023, publ. in Izv. RAN. Ser. Fiz. 2023. V. 87. N. 10. P. 1458–1462).
- Dora S. K. Real time recrystallization study of 1, 2 dodecanediol on highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) by tapping mode atomic force microscopy // World J. Nano Sci. Engineer. 2017. V. 7. N. 1. P. 1–15.
- Dora S. K., Wandelt K. Recrystallization of tubules from natural lotus (*Nelumbo nucifera*) wax on a Au (111) surface // Beilstein J. Nanotechnol. 2011. V. 2. Iss. 1. P. 261–267.
- Dora S. K., Koch K., Barthlott W., Wandelt K. Kinetics of solvent supported tubule formation of Lotus (*Nelumbo nucifera*) wax on highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) investigated by atomic force microscopy // Beilstein J. Nanotechnol. 2018. V. 9. Iss. 1. P. 468–481.
- Dragota S., Riederer M. Comparative study on epicuticular leaf waxes of *Araucaria araucana*, *Agathis robusta* and *Wollemia nobilis* (Araucariaceae) // Austral. J. Bot. 2008. V. 56. Iss. 8. P. 644–650.
- Ensikat H. J., Neinhuis C., Barthlott W. Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method // Int. J. Plant Sci. 2000. V. 161. N. 1. P. 143–148.
- Ensikat H. J., Boese M., Mader W., Barthlott W., Koch K. Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies // Chem. Phys. Lipids. 2006. V. 144. Iss. 1. P. 45–59.
- Grant R. H., Heisler G. M., Gao W., Jenks M. Ultraviolet leaf reflectance of common urban trees and the prediction of reflectance from leaf surface characteristics // Agr. For. Meteorol. 2003. V. 120. Iss. 1–4. P. 127–139.
- Guo J., Xu W., Yu X., Shen H., Li H., Cheng D., Liu A., Liu J., Liu C., Zhao S., Song J. Cuticular wax accumulation is associated with drought tolerance in wheat near-isogenic lines // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Article 01809. 10 p.
- Harrington C. A., Carlson W. C. Morphology and accumulation of epicuticular wax on needles of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) // Northwest Sci. 2016. V. 89. Iss. 4. P. 401–408.
- Holmes M. G., Keiller D. R. Effects of pubescence and waxes on the reflectance of leaves in the ultraviolet and photosynthetic wavebands: a comparison of a range of species // Plant, Cell Environ. 2002. V. 25. Iss. 1. P. 85–93.
- Koch K., Barthlott W., Koch S., Hommes A., Wandelt K., Mamdouh W., De-Feyter S., Broekmann P. Structural analysis of wheat wax (*Triticum aestivum*, c. v. 'Naturastar' L.): from the molecular level to three dimensional crystals // Planta. 2006a. V. 223. Iss. 2. P. 258–270.
- Koch K. A., Dommissie A., Barthlott W. Chemistry and crystal growth of plant wax tubules of lotus (*Nelumbo nucifera*) and nasturtium (*Tropaeolum majus*) leaves on technical substrates // Crystal Growth & Design. 2006b. V. 6. N. 11. P. 2571–2578.
- Korshunov M. A., Shabanov A. V., Bukhanov E. R., Shabanov V. F. Effect of long-period ordering of the structure of a plant on the initial stages of photosynthesis // Dokl. Phys. 2018. V. 63. P. 1–4 (Original Rus. Text © M. A. Korshunov, A. V. Shabanov, E. R. Bukhanov, V. F. Shabanov, 2018, publ. in Dokl. Akad. Nauk. 2018. V. 478. N. 3. P. 280–283).
- Kunst L., Samuels A. S. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax // Progr. Lipid Res. 2003. V. 42. Iss. 1. P. 51–80.
- Lee D. Nature's palette: The science of plant color. Chicago: Univ. Chicago Press, 2010. 432 p.
- Poinern G. E. J., Le X. T., Fawcett D. Superhydrophobic nature of nanostructures on an indigenous Australian eucalypt plant and its potential application // Nanotechnol., Sci. Appl. 2011. V. 4. Iss. 1. P. 113–121.
- Reicosky D. A., Hanover J. M. Physiological effects of surface waxes: I. Light reflectance for glaucous and nonglaucous *Picea pungens* // Plant Physiol. 1978. V. 62. Iss. 1. P. 101–104.
- Thomas K. R., Kolle M., Whitney H. M., Glover B. J., Steiner U. Function of blue iridescence in tropical understory plants // J. Royal Soc. Interface. 2010. V. 7. Iss. 53. P. 1699–1707.
- Vetrov S. Ya., Timofeev I. V., Shabanov V. F. Localized modes in chiral photonic structures // Physics-Usppekhi. 2020. V. 63. N. 1. P. 33–56 (Original Rus. text © S. Ya. Vetrov, I. V. Timofeev, V. F. Shabanov, 2020, publ. in Usp. Fiz. Nauk, Rus. Acad. Sci. 2020. V. 190. N. 1. P. 37–62).
- Vignolini S., Moyroud E., Glover B. J., Steiner U. Analysing photonic structures in plants // J. Royal Soc. Interface. 2013. V. 10. Iss. 87. P. 1–9.
- Walton T. J. Waxes, cutin and suberin // Methods in plant biochemistry. V. 4: Lipids, membranes and aspects of photobiology / J. L. Harwood and J. Boyer (Eds.). San Diego, CA: Acad. Press, 1990. P. 105–158.
- Weaver J. M., Lohrey G., Tomasi P., Dyer J. M., Jenks M. A., Feldmann K. A. Cuticular wax variants in a population of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // Industr. Crops and Products. 2018. V. 117. P. 310–316.

## **STRUCTURE, OPTICAL AND SPECTRAL CHARACTERISTICS OF EPICUTICULAR WAX OF BLUE SPRUCE NEEDLES**

**E. R. Bukhanov<sup>1,2</sup>, A. D. Shefer<sup>2</sup>, A. V. Shabanov<sup>1</sup>, Yu. L. Gurevich<sup>2</sup>, M. N. Krakhalev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*L. V. Kirensky Institute of Physics, Russian Academy of Science, Siberian Branch*

*Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch Akademgorodok, 50/38, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation*

<sup>2</sup>*Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation*

---

E-mail: k26tony@ya.ru, shefer.ad@ksc.krasn.ru, alexch\_syb@mail.ru, Btchem@mail.ru, kmn@iph.krasn.ru

A method for separating clean plates of epicuticular wax has been proposed. The use of water, which can penetrate deeply into wax structures under the influence of van der Waals forces and expand upon freezing, allows to quickly obtain uncontaminated wax plates with a native structure without any third-party chemical impurities. Using scanning electron microscopy, images of blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) needle wax were obtained. Its morphological and structural characteristics have been determined. A distinctive feature is the presence of wax nanotubules with a characteristic diameter of ~150 nm and a length of 3–5 μm. Nanotubes lie on top of each other in stacks, forming a one-dimensional long-period lattice. Microscopic observations of the wax were made in reflected and transmitted light. It has been shown that the coating of blue spruce needles consists of microparticles of wax with a structural color. In a wide spectral range, individual particles change color from blue to red, as a result, large conglomerates of particles are white. Fluorescence spectra of needles with native wax cover and the same needles after wax removal were obtained. When comparing the width of fluorescence lines at half-height of blue spruce needles with and without wax, the influence of the wax layer on the lifetime of excited electrons in photosystem II was revealed, thereby establishing a connection between the wax cover and the process of photosynthesis. Using the matrix transfer method, transmission spectra were calculated for a lattice similar to a waxy structure, a chloroplast, and a combination of a waxy structure with a chloroplast. In the latter version, the long-wave zone of selective reflection is much wider than in individual cases. When examining a structure containing a chloroplast and epicuticular wax, there is a slight splitting of the stop zone, as if there were a defect, which contributes to a high concentration of energy at the site of splitting. Due to an increase in energy concentration, the density of photonic states at the corresponding wavelengths increases. This effect is important for photosynthesis because, according to Fermi's golden rule, the rate of reaction is proportional to the density of photonic states. The calculation results are in good agreement with the experimental spectra.

**Keywords:** *photonic crystal, electron microscopy, optical microscopy, fluorescence spectroscopy, numerical modeling of one-dimensional photonic crystals, Picea pungens Engelm.*

**How to cite:** *Bukhanov E. R., Shefer A. D., Shabanov A. V., Gurevich Yu. L., Krakhalev M. N. Structure, optical and spectral characteristics of epicuticular wax of blue spruce needles // Sibirskij Lesnoj Zhurnal (Sib. J. For. Sci.). 2024. N. 1. P. 97–106 (in Russian with English abstract and references).*