

УДК 575.2:632.4+633.111

## ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ АРОМАТИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ CAD<sup>im</sup> НА МИКРОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕЙ У ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2021 г. А. А. Коновалов<sup>1</sup> \*, Е. В. Карпова<sup>2</sup>, И. К. Шундрин<sup>2</sup>,  
Е. П. Размахнин<sup>3</sup>, И. В. Ельцов<sup>4</sup>, Н. П. Гончаров<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>3</sup>Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирская область, Новосибирский район, пос. Краснообск, 630501 Россия

<sup>4</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>5</sup>Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, 630039 Россия

\*e-mail: konov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

В работе изучали наследование аллельных вариантов ароматической алкогольдегидрогеназы CAD<sup>im</sup> (CAD intermediate) и их влияние на выраженность признаков растений яровой мягкой пшеницы: флуоресценцию срезов проростков, микроморфологию и химический состав тканей. Растения с контрастными генотипами CAD<sup>im</sup> (гомозиготы +/+ и –/–) использовали для изучения автофлуоресценции тканей, микроморфологии и химического состава. Толщина стенок соломины у генотипа CAD<sup>im–</sup> выше, чем у генотипа CAD<sup>im+</sup>, что может влиять на устойчивость растений пшеницы к полеганию. Наблюдали различия по содержанию хлорофилла и, особенно, по соотношению хлорофиллов А и В, что вероятно влияет на фотосинтез. Обнаружено повышенное содержание карбоксильных групп у генотипа CAD<sup>im+</sup>, а так же различия по коричневым мономерам лигнина. Из полученных результатов следует, что аллельные варианты CAD<sup>im+</sup> и CAD<sup>im–</sup> оказывают существенное влияние на ряд признаков растения, и, следовательно, полиморфизм по локусу CAD<sup>im</sup> является функциональным, что позволяет использовать его в селекции и биотехнологии.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница, дегидрогеназа коричневого спирта, автофлуоресценция, микроморфология, химический состав, лигнин

**DOI:** 10.31857/S0555109921040085

Полиморфизм по ферментным локусам у растений влияет на многие признаки, связанные с ростом и развитием и может приводить к существенным изменениям микроморфологии тканей и их химического состава [1]. Изучение таких различий способствует лучшему пониманию механизмов формирования признаков растения и свойств растительного сырья, и может иметь прикладное значение для селекции и в биотехнологии [2].

Фенилпропаноидный путь метаболизма, присутствующий у всех сосудистых растений, приводит к синтезу лигнина и формированию склеренхимы, ткани, выполняющей механические и защитные функции [3]. Кроме лигнина, продуктами

фенилпропаноидного пути являются лигнаны и ароматические гликозиды [4], также обладающие защитными функциями.

Терминальная реакция фенилпропаноидного пути – восстановление коричневых альдегидов до спиртов, таких как *n*-кумаровый, конифероловый и синаповый, – контролируется семейством ферментов CAD (Cinnamyl alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа коричневого спирта; КФ 1.1.1.195) [3, 5]. Полиморфизм по генам, кодирующим CAD обнаружен у многих видов растений, и во многих случаях это приводит к существенным изменениям свойств и признаков растений [2]. Наличие или отсутствие одного из изоферментов CAD в тканях растения вызывает изменения в спектре

метаболитов, образующихся в данном участке обмена веществ, что в свою очередь может привести к изменениям других признаков, таких как устойчивость к полеганию [6–10].

У мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) описаны два набора гомеологических генов: НАДФ-зависимая САД, гены которой локализованы в длинных плечах хромосом 5-й гомеологической группы, и неспецифическая НАД(Ф)-зависимая САД, гены которой локализованы в хромосомах 6-й гомеологической группы [11–13]. Ранее было установлено, что полиморфизм САД у пшеницы влияет на механическую прочность соломины [14], и на устойчивость к листовым инфекциям – мучнистой росе и листовой (бурой) ржавчине [15].

У сорта яровой мягкой пшеницы Новосибирская 29 в промежутке между спектрами НАДФ-САД и НАД(Ф)-САД присутствует дополнительный изофермент САД (intermediate, САД<sup>im</sup>). Было установлено, что наличие или отсутствие этого изофермента влияет на устойчивости к грибным инфекциям [15].

Цель работы – изучение влияния изофермента САД<sup>im</sup> на микроморфометрические характеристики и химический состав тканей пшеницы.

## МЕТОДИКА

Для исследования были использованы образцы мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., контрастные по спектрам САД: сорт Новосибирская 29 селекции СибНИИРС, у которой присутствует изофермент САД<sup>im+</sup> (intermediate) с подвижностью, промежуточной между НАДФ-САД и НАД(Ф)-САД, и сортообразец Яровая-9 (селекционер Е.П. Размахнин), у которых этот изофермент отсутствовал.

Гибриды первого поколения имели фенотип САД<sup>im+</sup>, т.е. признак САД<sup>im+</sup> являлся доминантным. Во втором поколении наблюдалось расщепление в соотношении 3 : 1 САД<sup>im+</sup> к САД<sup>im-</sup> (образцы, не содержащие изофермент). Скрещивание и последующее выделение потомства F<sub>3</sub> (третьего поколения) позволило выровнять генетический фон, поскольку исходные образцы могли различаться по другим генам. Среди растений F<sub>3</sub> были отобраны гомозиготные потомства с контрастными фенотипами САД<sup>im+</sup> и САД<sup>im-</sup>, ставшие объектами данного исследования.

Изоферментные спектры САД определяли методом гель-электрофореза, с последующей окраской на САД-активность тетразолиевым методом, с использованием НАДФ в качестве кофактора и коричневого спирта в качестве субстрата [11].

Автофлуоресценцию изучали на поперечных срезах недельных проростков. Срезы толщиной 30 мкм получали на замораживающем микротоме

Криостат НМ 550 (“Termo Scientific”, Финляндия), препараты просматривали на флуоресцентном микроскопе AxioImager Z1 с приставкой ApoTome и программой AxioVision (“Carl Zeiss”, Германия), при возбуждении флуоресценции излучением с длинами волн 365, 470 и 546 нм. Микроморфологические показатели стеблей зрелых растений определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) ТМ-1000 (“Hitachi”, Япония). Параметры работы СЭМ – ускоряющее напряжение 15 кэВ, режим низкого вакуума. Образцы поперечных срезов стеблей без предварительной обработки фиксировались на предметном столике с помощью токопроводящего скотча.

Термогравиметрический анализ (ТГА) проводили на приборе NETZSCH STA 409 (Германия). Содержание золы определяли как остаток после нагревания при 600°C.

Высушенные на воздухе стебли пшеницы измельчали и экстрагировали смесью толуол/этанол (2 : 1 по объему) в аппарате Сокслета в течение 8 ч. Содержание целлюлозы и лигнина Комарова определяли по стандартной методике [16]. Раствор после отделения лигнина Комарова использовался для спектрофотометрического определения содержания кислоторастворимого лигнина [17]. Соотношение гидроксибензильных, гваяцильных и сиригильных звеньев в структуре лигнина определяли методом нитробензольного окисления (НБО), как в предыдущей работе [14].

Для определения содержания флавоноидов навеску спирто-толуольного экстракта стеблей растений растворяли в этаноле в ультразвуковой ванне (УЗВ), раствор центрифугировали, аликвоту раствора смешивали с раствором хлорида алюминия в этаноле, фотометрировали на спектрофотометре Cary-5000 (“Varian”, США), в 1 см кювете. Содержание флавоноидов определяли по калибровочному графику в эквиваленте кверцетина на г сырья (мгQE/г).

Содержание остаточных хлорофиллов в зрелых растениях (в мг/г сухого сырья) определяли двумя способами. В первом случае навеску спирто-толуольного экстракта растворяли в ацетоне в УЗВ, раствор центрифугировали и фотометрировали в 1 см кювете. Во втором варианте навеску исходного сухого сырья экстрагировали ацетоном в УЗВ в течение часа, раствор фильтровали и фотометрировали в 1 см кювете. Содержание хлорофиллов рассчитывали по поглощению при 662 и 644 нм [18]. Для растворов пигментов в неразбавленном ацетоне использовали следующие уравнения:

$$C_A = 9.784E_{662} - 0.990E_{644};$$

$$C_B = 21.426E_{644} - 4.650E_{662},$$

где C<sub>A</sub> и C<sub>B</sub> – содержание соответственно хлорофилла A и B (в мг/л); E<sub>662</sub> и E<sub>644</sub> – величина опти-

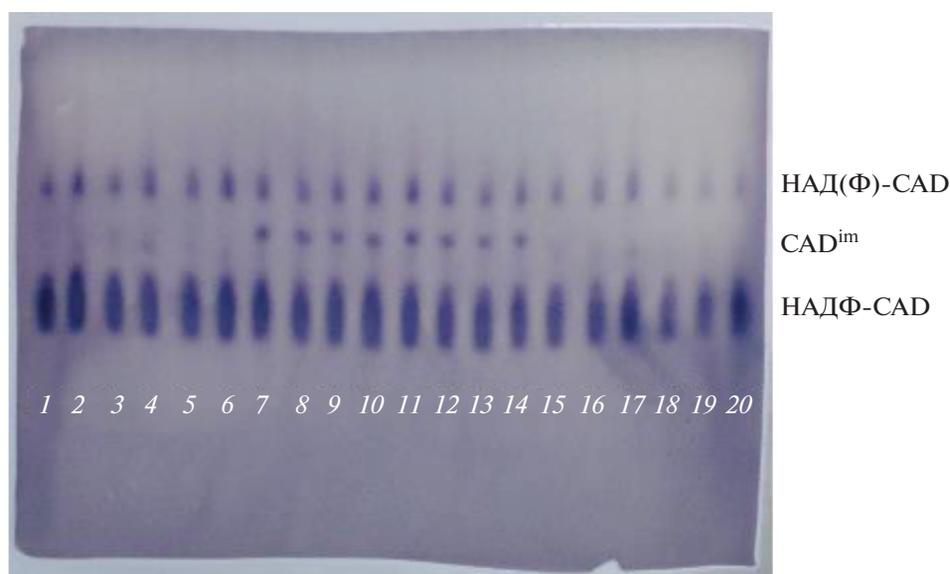


Рис. 1. Зимограмма CAD проростков пшеницы: 1–6 и 15–20: CAD<sup>im-</sup>; 7–14: CAD<sup>im+</sup>.

ческой плотности суммарной вытяжки пигментов при двух длинах волн, соответствующих максимумам пигментов в данном растворителе.

Выделение образцов диоксанлигнинов и их анализ ЯМР-спектроскопией проводили как описано ранее [9]. Отнесение сигналов протонного магнитного резонанса (ПМР) и магнитного резонанса по <sup>13</sup>C проводили согласно [19]. Отнесение кросс-сигналов <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C в HSQC-спектрах (heteronuclear single quantum coherence) диоксанлигнинов проводилось по [20, 21]. Относительное содержание основных типов связей в макромолекуле лигнина, концевых групп, молярное соотношение мономерных звеньев (H : G : S), содержание кумаратов и ферулатов определяли согласно [21]. ИК-спектры экстрактов и образцов диоксанлигнина регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Tensor 27 (“Bruker”, Германия) в диапазоне 4000–400 см<sup>-1</sup>, с разрешением 4 см<sup>-1</sup> по 32 сканирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изофермент CAD<sup>im</sup> на зимограмме располагался между спектрами НАДФ-CAD (в “быстрой” зоне) и НАД(Ф)-CAD (в “медленной” зоне) (рис. 1). Аллельные варианты выглядят как присутствие или отсутствие окрашенной зоны, соответственно, аллельные варианты были обозначены как CAD<sup>im+</sup> (наличие изофермента) и CAD<sup>im-</sup> (отсутствие изофермента), генотипы соответственно +/+ или -/-.

Во втором поколении расщепление в потомствах соответствовало моногенному соотношению 3 : 1, как у прямых, так и обратных гибридов, то есть реципрокные различия отсутствовали

(табл. 1). Из этого следовало, что фермент CAD<sup>im</sup> контролируется одним ядерным геном с аллелями CAD<sup>im+</sup> и CAD<sup>im-</sup>. Аллель CAD<sup>im+</sup> является функциональным, аллель CAD<sup>im-</sup> относится к так называемым нулевым аллелям, лишённым специфической активности. Растения, гомозиготные по функциональному и нулевому аллелю фермента, могли различаться по набору метаболитов и другим показателям. В следующем поколении F<sub>3</sub> (третье поколение гибридов) были выделены гомозиготные потомства (потомства, где все растения имели генотип +/+ или -/-, и соответствующий фенотип: наличие или отсутствие изофермента CAD<sup>im</sup>), которые были использованы для изучения свойств тканей.

На срезах недельных проростков изучаемых генотипов обнаружены различия по автофлуоресценции тканей (рис. 2). Генотип CAD<sup>im-</sup> сильнее флуоресцирует в красной и зелёной областях, генотип CAD<sup>im+</sup> в синей, коротковолновой области.

Генотипы CAD<sup>im+</sup> и CAD<sup>im-</sup> различались по морфологии клеток в тканях стебля (табл. 2, рис. 3). Толщина стенок у клеток генотипа CAD<sup>im-</sup> выше, чем у генотипа CAD<sup>im+</sup>, при этом толщина скле-

Таблица 1. Расщепление в реципрокных потомствах F<sub>2</sub> (второе поколение гибридов) яровой мягкой пшеницы

Потомство	CAD <sup>im+</sup>	CAD <sup>im-</sup>	χ <sup>2</sup>
(Я-9 × Н29)	132	49	0.41
(Н29 × Я-9)	168	69	2.13
Всего	300	118	2.32

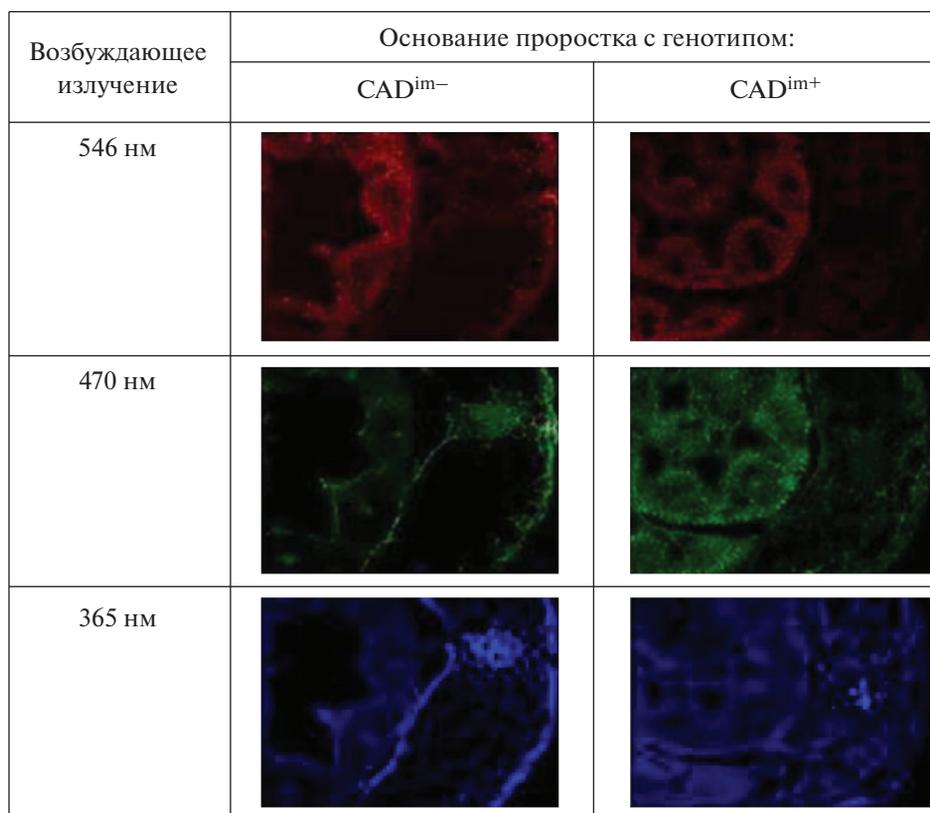


Рис. 2. Автофлуоресценция тканей на срезах проростков.

ренхимного слоя и толщина стенки соломины не различались.

Анализ химического состава тканей стеблей растений показал, что содержание полимерных компонентов в образцах довольно близко (табл. 3). Различия наблюдались в зольности, соотношении гваяцильных и сиригильных мономеров в структуре лигнинов, а также в соотношении пигментов. Соотношение хлорофиллов *A* и *B* менялось в зависимости от способа экстракции, однако в обоих случаях обнаружено аномально высокое содержание хлорофилла *B* у генотипа CAD<sup>im-</sup>, содержание флавоноидов также выше у растений этого генотипа.

На рис. 4 приведены ИК-спектры спирто-толуольных экстрактов стеблей растений сравнива-

емых генотипов (спектры нормированы по полосе 1597 см<sup>-1</sup> – поглощение ароматических колец). Большая интенсивность полосы 1737 см<sup>-1</sup> в спектре генотипа CAD<sup>im-</sup> подтверждает данные о повышенном содержании остаточных хлорофиллов в этих растениях. Небольшое различие в интенсивности полосы 1656 см<sup>-1</sup> указывало на меньшее содержание флавоноидов в стеблях генотипа CAD<sup>im+</sup>. В то же время интенсивность полосы 1100–1000 см<sup>-1</sup> выше в спектре экстракта стеблей генотипа CAD<sup>im+</sup>, что могло быть связано с большим содержанием в них углеводов. Интенсивность полосы 1713 см<sup>-1</sup> (поглощение карбонильных и карбоксильных групп) выше в спектре экстракта CAD<sup>im-</sup>, что связано с большим содержанием в нем альдегидов и кислот.

Таблица 2. Морфология тканей на срезах стеблей пшеницы

Показатель	Генотип	
	CAD <sup>im+</sup>	CAD <sup>im-</sup>
Толщина стенки клетки эпидермиса, мкм	1.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2
Толщина стенки склеренхимных клеток, мкм	2.5 ± 0.3	3.6 ± 0.1
Толщина склеренхимного слоя, мкм	60 ± 10	60 ± 10
Толщина стенки стебля, мкм	400 ± 20	415 ± 20

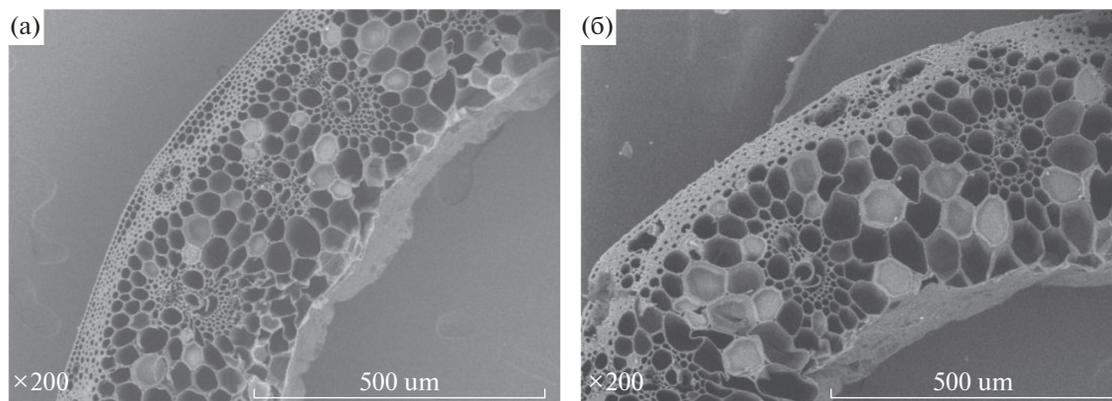


Рис. 3. СЭМ изображения срезов соломины пшениц генотипов CAD<sup>im+</sup> (а) и CAD<sup>im-</sup> (б) (увеличение ×200).

Метод термогравиметрии использовался для оценки содержания лигнина и целлюлозы без их выделения из тканей растений с помощью химических методов. Анализ основан на том, что лигнин и целлюлоза разлагаются в разных температурных диапазонах. Целлюлоза разлагается при более низкой температуре по сравнению с лигнином. На рис. 5 приведены термограммы разложения образцов с CAD<sup>im+</sup> и CAD<sup>im-</sup>. Потери массы для них на первой и второй ступенях разложения одинаковы, что указывает на отсутствие различий в содержании целлюлозы и лигнина. Этот результат согласуется с данными табл. 3.

Различия в структуре лигнинов сравниваемых генотипов изучались методами ИК- и ЯМР-спектроскопии на препаратах диоксанлигнинов, выделенных из стеблей растений. По данным ИК-спектроскопии (рис. 6), в препарате диоксанлигнина из пшеницы генотипа CAD<sup>im+</sup> выше содержание карбонильных групп (полоса 1707 см<sup>-1</sup>), в препарате диоксанлигнина из пшеницы генотипа CAD<sup>im-</sup> выше содержание алифатических гидроксильных групп (полоса 1031 см<sup>-1</sup>).

Спектры ПМР препаратов диоксанлигнинов показывают несколько большее содержание аль-

Таблица 3. Химический анализ состава стеблей генотипов CAD<sup>im+</sup> и CAD<sup>im-</sup>

Генотип	CAD <sup>im+</sup>	CAD <sup>im-</sup>
Зольность 600°C, %	5.20	6.12
Экстрактивные вещества, %	4.59	4.13
Лигнин, %	21.60	21.53
Кислоторастворимый лигнин, %	1.50	1.51
H : G : S	0 : 1 : 0.97	0 : 1 : 1.10
Целлюлоза, %	47.48	49.17
Хлорофиллы (1 способ):		
ChlA, мг/г	0.101 ± 0.005	0.106 ± 0.006
ChlB, мг/г	0.029 ± 0.001	0.123 ± 0.005
ChlA/ChlB	3.48	0.86
Хлорофиллы (2 способ):		
ChlA, мг/г	0.013	0.013
ChlB, мг/г	0.007	0.011
ChlA/ChlB	1.86	1.18
Содержание флавоноидов	0.65 ± 0.01	0.72 ± 0.02

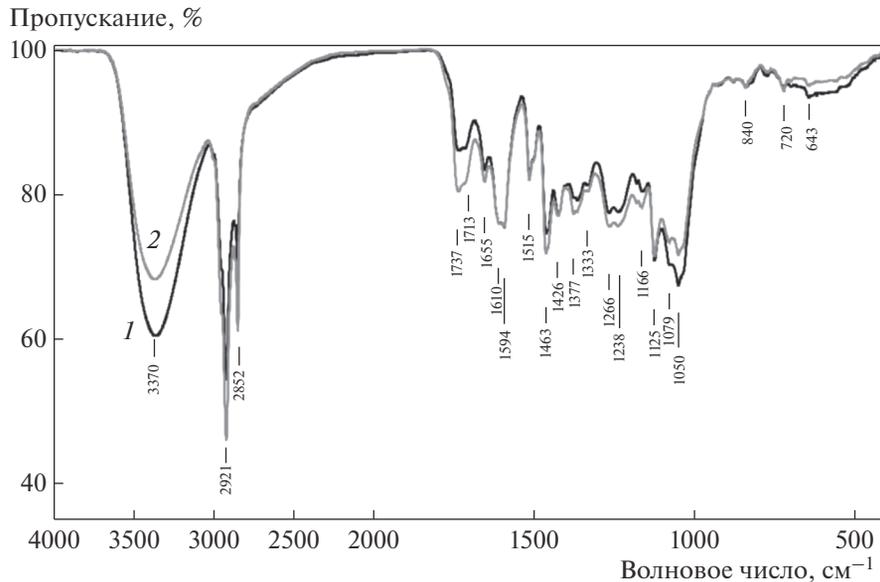


Рис. 4. ИК-спектры спирто-толуольных экстрактов стеблей растений генотипов CAD<sup>im+</sup> (1) и CAD<sup>im-</sup> (2).

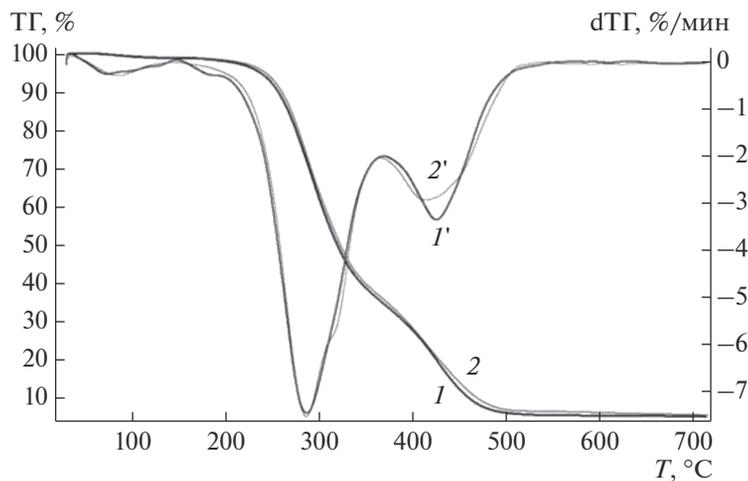


Рис. 5. ТГ и dTG диаграммы для соломы генотипов CAD<sup>im+</sup> (1, 1') и CAD<sup>im-</sup> (2, 2').

дегидных групп в препарате диоксанлигнина из стеблей пшеницы генотипа CAD<sup>im+</sup> (табл. 4).

Содержание структурных фрагментов (рис. 7, 8) в препаратах диоксанлигнинов, оценивалось по спектрам <sup>13</sup>C-ЯМР (табл. 5) и 2Д-ЯМР (табл. 6).

До недавнего времени солома злаков (стебли и листья), а также отходы обмолота (мякина) считались малоценным продуктом растениеводства и использовались нерационально. В настоящее время активно разрабатываются химические и микробиологические методы рационального использования возобновляемого растительного сырья [22, 23]. Основное влияние на свойства растительных тканей оказывают генотипы растений по генам, кон-

тролирующим соответствующие участки метаболизма.

Влияние генотипов CAD на микроморфологию тканей стебля было обнаружено ранее в работе на диплоидной пшенице [14]. В данном исследовании отсутствие изофермента CAD<sup>im</sup> сказывалось на толщине клеточных стенок растения, при этом общая толщина стенок соломины оставалась неизменной. Можно предположить, что такой полиморфизм может влиять на механическую прочность соломины, как это было на диплоидной пшенице, что, в свою очередь, влияет на такой важный производственный показатель как полегаемость посевов. Влияние гена пшеницы TaCAD1 на полегание пшеницы (lodging) об-

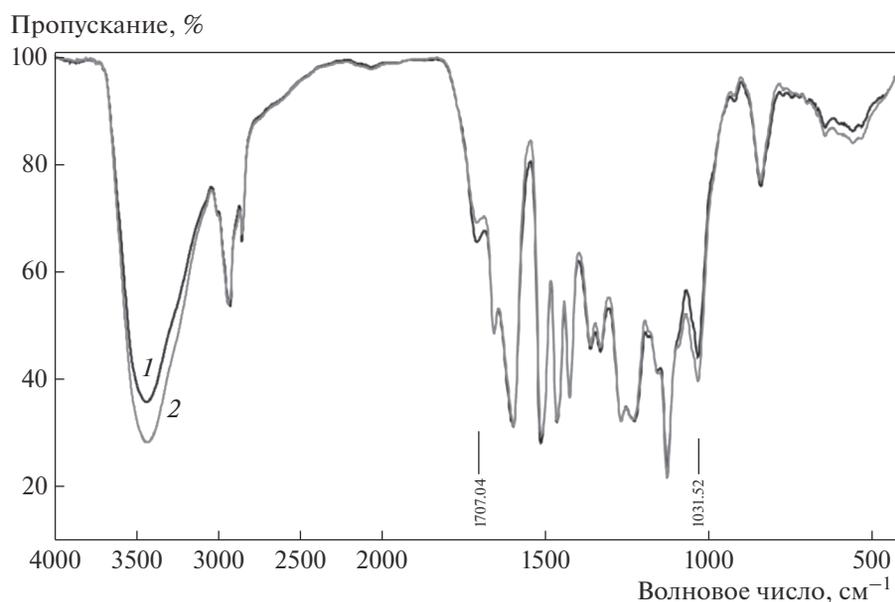


Рис. 6. ИК-спектры препаратов диоксанлигнинов стеблей растений генотипов  $CAD^{im+}$  (1) и  $CAD^{im-}$  (2).

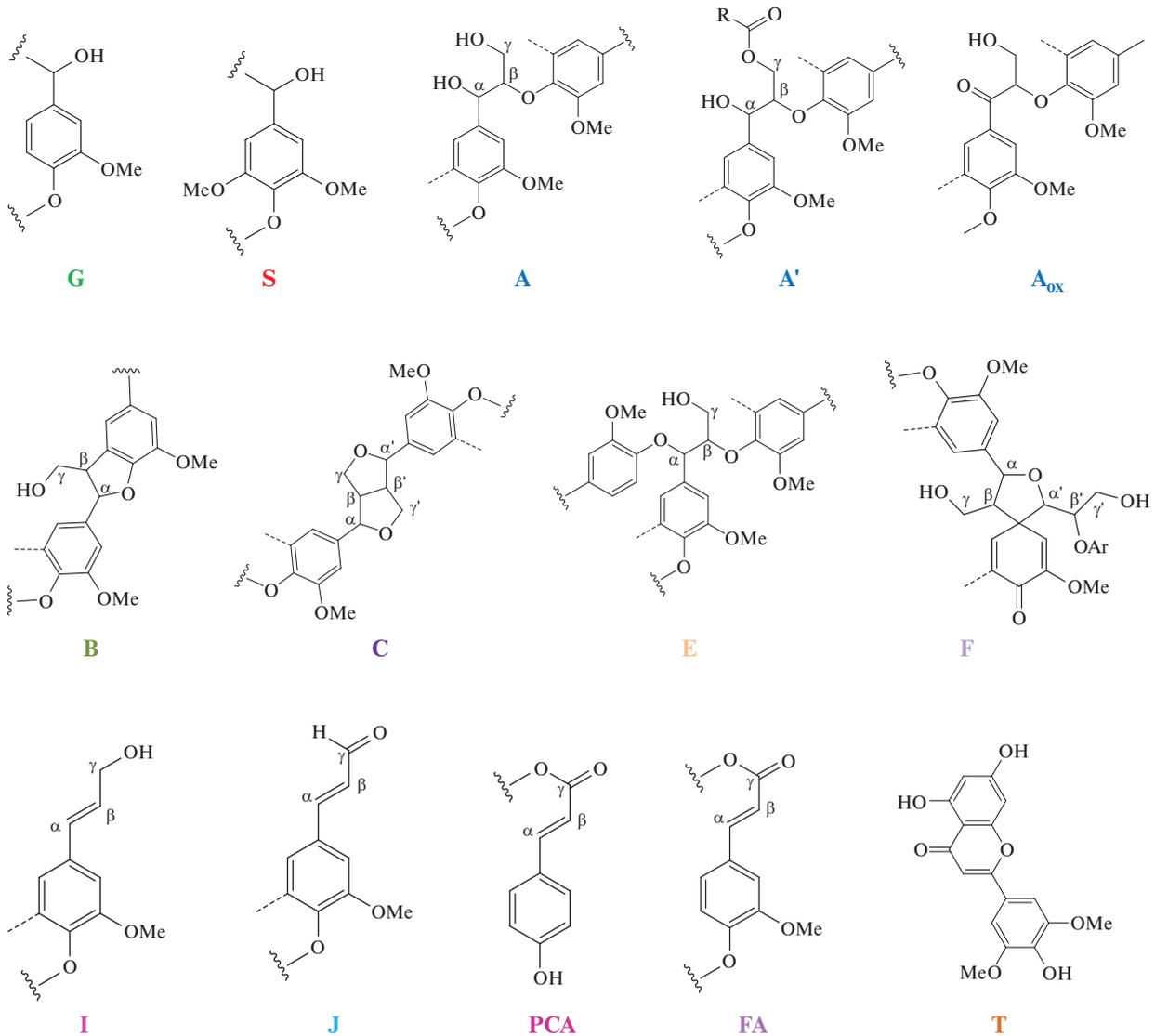
наружено в работе [24], однако соответствует ли ген TaCAD1 гену  $CAD^{im}$ , пока не установлено. В настоящее время селекция на устойчивость к полеганию основана в основном на генах короткостебельности [25], использование полиморфизма CAD может быть дополнительным фактором устойчивости.

Флуоресцентные методы исследования хотя и не позволяют идентифицировать конкретный метаболит, но дают общую картину содержания и локализации флуоресцирующих веществ в тканях и широко используются при изучении микромор-

фологии растений [26]. Обнаруженная несколько более сильная флуоресценция в красной области у генотипа  $CAD^{im-}$  могла быть вызвана избытком хлорофилла *B* (табл. 3). Хлорофилл *B* флуоресцирует в более дальней (более “красной”) области, чем хлорофилл *A*. Более сильная флуоресценция генотипа  $CAD^{im-}$  в зеленой области, по-видимому, вызвана повышенным содержанием флавоноидов (табл. 3), дающих максимум флуоресценции в диапазоне 530–560 нм. Более сильная флуоресценция генотипа  $CAD^{im+}$  в “синей” коротковолновой области (рис. 1) могла быть связана с несколько по-

Таблица 4. Относительное содержание структурных фрагментов препаратов диоксанлигнинов по данным ПМР ( $q_x = I_x/I_{общ}$ )

Диапазон хим. сдвигов $^1H$ (м.д.)	Фрагменты и группы	Отнесение	$CAD^{im+}$	$CAD^{im-}$
14.0–12.0	$H_{(C=O)OH}$	ОН карбоксильных групп	0.008	0.007
9.7–9.0	$H_{(C=O)H}$	Н альдегидных групп	0.014	0.010
12.4–9.3	$H_{ОНфен(1)}$	ОН при С-4 в гваяцильных фрагментах ( <b>G</b> )	0.009	0.007
9.3–8.4	$H_{ОНфен(1)}$	ОН при С-4 в сирингильных звеньях ( <b>S</b> ), гваяцильных звеньях с 5-5 ( <b>C</b> ) и $\beta$ -5 ( <b>B</b> ) связями	0.016	0.013
8.4–6.3	$H_{ар}$	Атомы водорода ароматических колец	0.201	0.189
6.3–2.9	$H_{O-ал}$	СН=СН-, СНО-, СН <sub>2</sub> O-, СН <sub>3</sub> O-группы в $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу, СНО углеводов	0.721	0.737
2.3–0.3	$H_{\alpha,\beta,\gamma}$	СН-, СН <sub>2</sub> -, СН <sub>3</sub> -группы в $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -положениях к ароматическому кольцу, СНО углеводов	0.040	0.039



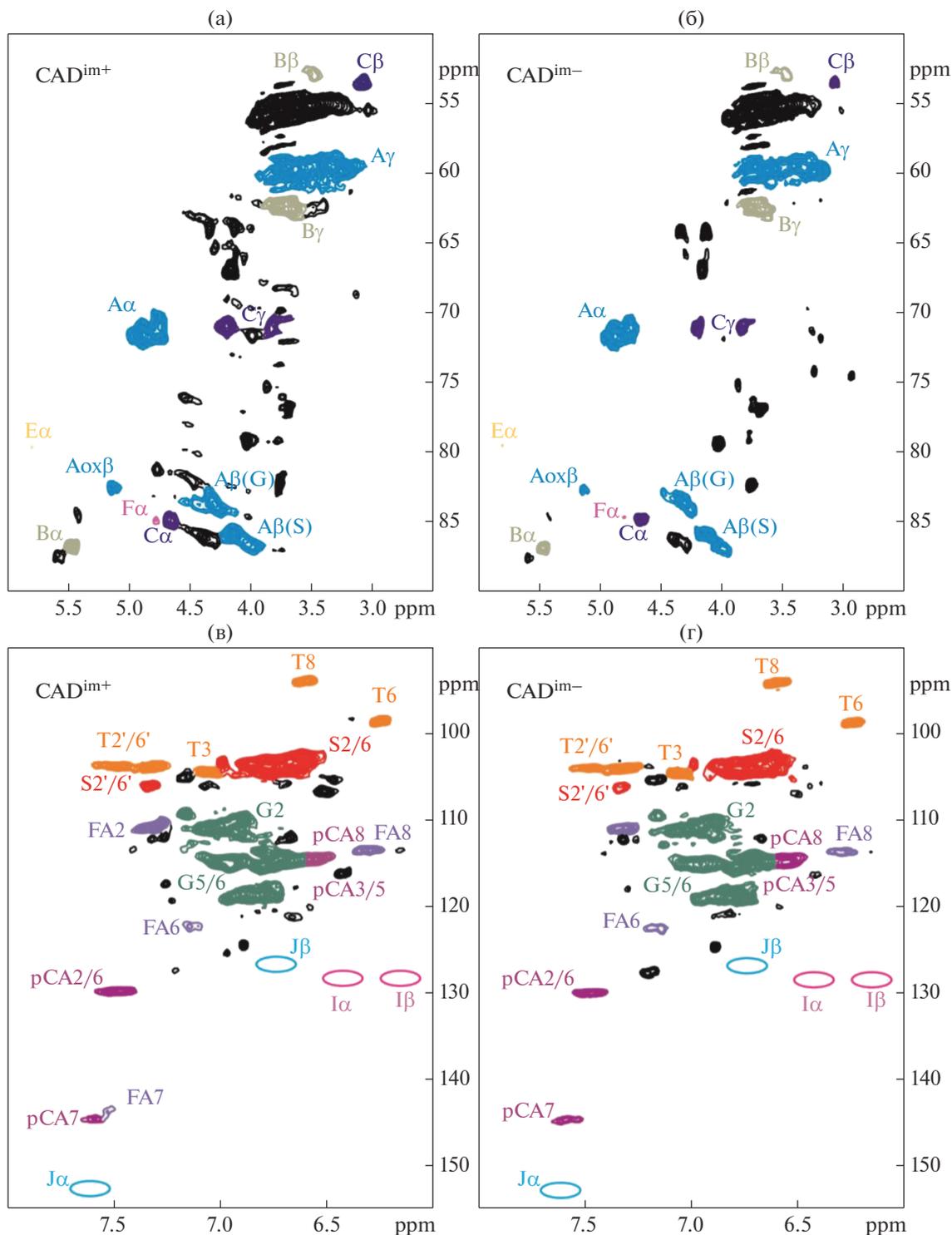
**Рис. 7.** Структурные фрагменты макромолекулы лигнина: G – гваяцил, S – сирингил, A/A' – β-O-4' арилэфир, B – фенилкумаран, C – резинол, E – α-O-4' арилэфир, F – спиродиенон, I – концевые группы коричневого спирта, J – концевые группы коричневого альдегида, PCA – *n*-кумараты, FA – ферулаты, T – трицин.

вышненным содержанием экстрактивных веществ, среди которых присутствовали ароматические кислоты, которые флуоресцируют в этой области. Покровные ткани флуоресцируют преимущественно синим, тогда как зеленым и красным – ткани паренхимы. Вероятно, фенольные соединения, которые флуоресцируют в более коротковолновой области, локализируются во внешних слоях, в паренхиме локализованы хлорофиллы, и, возможно, флавоноидные пигменты, флуоресценция которых сдвинута в длинноволновую область [26, 27].

Химический анализ стеблей растений (табл. 3) и ТГА (рис. 4) не выявил различий по содержанию полимерных компонентов клеточной стенки в сравниваемых генотипах. Различия наблюда-

лись в содержании экстрактивных веществ, особенно хлорофиллов.

У растений с полным набором хлорофиллов соотношение ChlA/ChlB варьирует у разных видов растений от 1.7 до 5–6, т.е. концентрация хлорофилла B не превышает 60% от хлорофилла A, обычно 15–25% от общего содержания хлорофиллов [28]. У трансгенного арабидопсиса со сверхэкспрессией хлорофиллид-а-оксигеназы, при которой синтезируется повышенное количество хлорофилла B, соотношение составляло 0.92–1.13 в зависимости от световых условий [29], но у обычных нетрансгенных растений такое соотношение не описано. Следует подчеркнуть, что в данной работе изучено содержание остаточных хлорофиллов в сухом



**Рис. 8.** Области HSQC-спектров препаратов диоксанлигнинов стеблей растений генотипов  $CAD^{im+}$  (а, б) и  $CAD^{im-}$  (б, г): области 50–90 ppm (а, б), области 90–155 ppm (в, г).

материале, которое различается в зависимости от метода выделения. Полученные генотипы в дальнейшем могут быть использованы для изучения прижизненных показателей содержания фотосинтетических пигментов, и их влияния на продуктивность.

Несмотря на то, что содержание лигнина в стеблях обоих генотипов практически одинаково, соотношение мономерных единиц, определенное методом нитробензольного окисления, показало различия в содержании сирингильных звеньев. Полное отсутствие *n*-гидроксифенилпропановых

**Таблица 5.** Содержание структурных элементов на одно ароматическое кольцо  $n_x$  в препаратах диоксанлигнинов по данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР

Диапазон	Отнесение	CAD <sup>im+</sup>	CAD <sup>im-</sup>
220–190	C=O кетонов	0.515	0.268
210–185	(C=O)H альдегидов	0.556	0.279
185–163.5	C=O(O) карбоксильные и сложноэфирные	0.391	0.285
156–120	CH=CH в связях Ar-CH=CH-R	3.331	3.212
156–150	C-3, C-5 в сиригильных звеньях (S), C-4 в гваяцильных (G) (в том числе при кето-группе в $\alpha$ -положении к АК)	0.455	0.744
150–141	C-3/C-4 в гваяцильных звеньях (G), C-3/C-5 в незамещенных сиригильных звеньях (S)	1.145	0.852
141–123	C-1 в гваяцильных (G) и сиригильных (S) звеньях	1.552	1.433
138.8–133.3	C-4 в сиригильных звеньях (S)	0.482	0.580
124.5–117	C-6 в гваяцильных звеньях (G)	0.522	0.556
117–112.8	C-5 в гваяцильных звеньях (G)	0.700	0.750
112.8–95	C-1/C-3 в окисленных $\beta$ -O-4 структурах (A')	1.731	1.596
112.8–108	C-2 в гваяцильных звеньях (G)	0.530	0.472
108–104	C-2/C-6 в сиригильных звеньях (S) (в том числе при кето-группе в $\alpha$ -положении к АК)	0.651	0.789
104–102.5	C-2/C-6 в сиригильных звеньях (S)	0.372	0.259
104–95	C-5 $\beta$ -O-4 структур (A и A')	0.551	0.334
90–78	C $_{\alpha,\beta}$ в (A) и фенилкумарановых (B) структурах	0.504	0.920
80–67	C $_{\alpha,\beta}$ -ОН	0.626	1.116
74–64	C $_{\gamma}$ в CH <sub>2</sub> -O-R, CH <sub>2</sub> -ОН	0.562	0.935
64–58	Ar-OCH <sub>3</sub> $\beta$ -O-4 структурах A'	0.552	0.869
58–54	метоксильные группы	2.038	2.342
54–52	C $_{\beta}$ в структуре резинола (C)	0.115	0.116
54–50	C $_{\beta}$ в фенилкумарановых структурах (B)	0.135	0.126
35–5	CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> алифатические	0.131	0.405
102.6–95	Углеводы	0.184	0.077

звеньев в лигнинах указывало на то, что в обоих генотипах не накапливался *n*-кумаральдегид, т.е. активность НСТ (Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase) и/или СЗН (4-coumarate 3-hydroxylase) выше активности ССР (Cinnamoyl-CoA reductase) [30]. Пониженное соотношение сиригил/гваяцил в лигнине стеблей генотипа CAD<sup>im+</sup> может быть связано с повышенной активностью САД над САld5Н (Coniferaldehyde 5-hydroxylase или F5H) в этих растениях [31].

По данным спектроскопии ЯМР содержание кето-, альдегидных и карбоксильных групп на одно ароматическое кольцо выше в лигнине пшени-

цы генотипа CAD<sup>im+</sup> (почти в два раза для карбонильных групп, табл. 4). Эти данные подтверждают ИК-спектры препаратов диоксанлигнинов. Относительное содержание атомов водорода ароматических колец по данным ПМР выше в диоксанлигнине генотипа CAD<sup>im+</sup>, что согласовывалось с данными НБО по содержанию гваяцильных/сиригильных фрагментов в структурах.

Двойные связи в лигнине однодольных растений в основном содержат концевые группы конифероловых и синаповых спиртов и альдегидов. Часто в структуру лигнина внедряются концевые группы коричневого спирта (I), коричневого альдеги-

**Таблица 6.** Структурные характеристики препаратов диоксанлигнинов по данным 2D-ЯМР

Структурный фрагмент	CAD <sup>im+</sup>	CAD <sup>im-</sup>
$\beta$ -O-4' арилэфир (A/ A')	74.2	77.3
В том числе окисленный в $\alpha$ -положении $\beta$ -O-4' арилэфир	1.3	1.0
Фенилкумараны (B)	14.3	11.6
Резинолы (C)	10.9	10.7
$\alpha$ -O-4' арилэфир (E)	0.2	0.1
Спиродиеноны (F)	0.4	0.3
Концевые группы		
Концевые группы коричневого спирта (I)	—	—
Концевые группы коричневого альдегида (J)	—	—
<i>n</i> -кумараты (pCA)	3.7	3.3
Ферулаты (FA)	5.8	5.2
Трицин (T)	0.08	0.08

да (J), а также *n*-кумараты (pCA) и ферулаты (FA), образующие сложноэфирные связи с гидроксильным при C<sub>7</sub> [32]. Содержание концевых групп оценивали по 2D-ЯМР-спектрам выделенных препаратов диоксанлигнинов. На рис. 8 в соответствии с цветом структурных фрагментов из рис. 7 показаны кросс-сигналы <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C в HSQC-спектрах. Эти спектры показывают, какие фрагменты и в каком количестве присутствуют в выделенных препаратах лигнина каждого генотипа. В препаратах диоксанлигнинов обоих изучаемых генотипов отсутствуют концевые группы коричневого альдегида и спирта (пустые области спектров J $\alpha$ , J $\beta$ , I $\alpha$ , I $\beta$ ) (рис. 8).

Как показывают 2D-ЯМР спектры основным типом связывания структурных единиц лигнина в растениях обоих генотипов является  $\beta$ -O-4' ариловый эфир (структурные фрагменты A). Содержание окисленных структур  $\beta$ -O-4' арилэфира выше в лигнине растений генотипа CAD<sup>im+</sup>. Количество резинольных структур (C) и  $\alpha$ -O-4' связей арилэфира (E) примерно одинаково в лигнинах обоих генотипов. Содержание фенилкумарановых структур (B) и спиродиенонов (F) выше в лигнине растений генотипа CAD<sup>im+</sup>, так же как и содержание *n*-кумаратов (pCA) и ферулатов (FA). Трицин (T) присутствует в лигнинах растений обоих генотипов в одинаковом количестве.

Полученные данные по строению лигнина показали, что наличие дополнительного варианта CAD способствует накоплению карбонильных групп в структуре лигнина.

Ранее было установлено влияние полиморфизма CAD на многие признаки, не связанные напрямую с фенилпропаноидным путем метабо-

лизма, в частности, на хлорофилл-связывающий белок хлоропластов (chlorophyll a/b binding protein) [33–35]. К тому же фенилпропаноидный путь метаболизма является продолжением шикиматного пути, который локализован в хлоропластах [3]. В дальнейших исследованиях предстоит выяснить, есть ли функциональная связь между синтезом хлорофилла и фенилпропаноидным метаболизмом или это случайное совпадение.

Из полученных результатов следует, что аллельные варианты CAD<sup>im+</sup> и CAD<sup>im-</sup> оказывают существенное влияние на ряд признаков растения, и, следовательно, полиморфизм по локусу CAD<sup>im</sup> является функциональным. Изученные в данном исследовании генотипы дают возможность оценить вклад данного полиморфизма в селекционно значимые признаки у сортов образцов яровой мягкой пшеницы. Кроме того, результаты могут быть использованы при разработке технологических методов рационального использования соломы.

Автофлуоресценцию изучали на поперечных срезах недельных проростков в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Спектральные и аналитические измерения проведены в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН.

Работа поддержана бюджетными проектами № 0259-2021-0012 (ИЦИГ СО РАН) и 0302-2020-0005 (НИОХ СО РАН), а также региональным проектом РФФИ 19-44-540003 p\_a.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yoon J., Choi H., An G.* // J. Integr. Plant Biol. 2015. V. 57. P. 902–912.
2. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В.* // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 5. С. 496–513.
3. *Гудвин Т., Мерсер Э.* Введение в биохимию растений. 2 Изд. М.: Мир, 1986. Т. 1. 393 с. Т. 2. 312 с.
4. *Himi E., Maekawa M., Noda K.* // International J. Plant Genomics. 2011. V. 374: 369460. <https://doi.org/10.1155/2011/369460>
5. *Dixon R. A., Chen F., Guo D., Parvathi K.* // Phytochemistry. 2001. V. 57. P. 1069–1084. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00092-9)
6. *Hepworth D.G., Vincent J.F.V.* // Annals of Botany. 1998. V. 81. № 6. P. 751–759.
7. *Li X., Yang Y., Yao J., Chen G., Li X., Zhang Q., Wu C.* // Plant Mol. Biol. 2009. V. 69. № 6. P. 685–697.
8. *Ookawa T., Inoue K., Matsuoka M., Ebitani T., Takarada T., Yamamoto T., Ueda T., Yokoyama T., Sugiyama S., Nakaba S., Funada R., Kato H., Kanekatsu M., Toyota K., Motobayashi T., Vazirzanjani M., Tojo S., Hirasawa T.* // Sci. Rep. 2014. V. 4: 6567 <https://doi.org/10.1038/srep06567>
9. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Ельцов И.В., Орлова Е.А., Гончаров Н.П.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 686–693. <https://doi.org/10.18699/VJ17.286>
10. *Карпова Е.В., Шундрин И.К., Орлова Е.А., Коновалов А.А.* // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 87–95. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019045238>
11. *Jaaska V.* // Theoretical and Applied Genetics. 1978. V. 53. № 5. P. 209–217.
12. *Hart G.E., Gale M.D., McIntosh R.A.* Linkage Maps of *Triticum aestivum* (Hexaploid wheat,  $2n = 42$ , Genomes A, B & D) and *T. tauschii* ( $2n = 14$ , Genome D) // Genetic maps. 6 ed. Cold Spring Harbor Lab. Pres, 1993. P. 6.204–6.219.
13. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я.* // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1222–1228. <https://doi.org/10.7868/S0016675816080051>
14. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Нефедов А.А., Гончаров Н.П.* // Генетика. 2014. Т. 50. № 11. С. 1310–1318.
15. *Коновалов А.А., Орлова Е.А., Карпова Е.В., Шундрин И.К.* Генофонд и селекция растений. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2020. С. 147–150. <https://doi.org/10.18699/GPB2020-38>
16. *Оболенская А.В., Щёголев В.П., Аким Г.Л., Аким Э.Л.* Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Лесн. промышленность, 1965. 412 с.
17. *Swan B.* // Svensk Papperstidn. 1965. V. 68. № 22. P. 791–795.
18. *Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандовина Л.М.* Большой практикум по физиологии растений. М.: “Высшая школа”. 1975. 392 с
19. *Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф.* Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
20. *Белый В.А., Алексеев И.Н., Садыков Р.А.* // Изв. Коми науч. центра УрО РАН. 2012. Т. 3. № 11. С. 20–26.
21. *del Río J.C., Lino A.G., Colodette J.L., Lima C.F., Gutiérrez A., Martínez Á.T., Lu F., Ralph J., Rencoret J.* // Biomass and Bioenergy. 2015. V. 81. P. 322–338.
22. *Мусеев И.И.* // Вестник Российской Академии наук. 201. Т. 81. № 5. С. 405–413.
23. *Онищенко Д.В., Рева В.П., Воронов Б.А.* // Доклады Российской Академии Сельскохозяйственных наук. 2013. № 4. С. 58–60.
24. *Ma Q.-H.* // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. № 10. P. 2735–2744. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq107>
25. *Сухих И.С., Вавилова В.Ю., Блинов А.Г., Гончаров Н.П.* // Генетика. 2021. Т. 57. № 2. С. 127–139. <https://doi.org/10.31857/S0016675821020107>
26. *Talamond P., Verdeil J.L., Conéjéro G.* // Molecules. 2015. V. 20. № 3. P. 5024–5037. <https://doi.org/10.3390/molecules20035024>
27. *Donaldson L.* // Molecules. 2020. V. 25. № 10. 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
28. *Тютерева Е.В., Дмитриева В.А., Войцеховская О.В.* // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 843–855. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.843rus>
29. *Sakuraba Y., Balazadeh S., Tanaka R., Mueller-Roeber B., Tanaka A.* // Plant Cell Physiol. 2012. V. 53. № 3. P. 505–517. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs006>
30. *Ralph J., Akiyama T., Kim H., Lu F., Schatz P.F., Marita J.M., Ralph S.A., Reddy M.S.S., Chen F., Dixon R.A.* // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 8843–8853.
31. *Takeda Y., Koshiha T., Tobimatsu Y., Suzuki S., Murakami S., Yamamura M., Rahman M.M., Takano T., Hattori T., Sakamoto M., Umezawa T.* // Planta. 2017. V. 246. № 2. P. 337–349. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2692-x>
32. *Ralph J., Lapierre C., Boerjan W.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 56. P. 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>
33. *Dauwe R., Morreel K., Goeminne G., Gielen B., Rohde A., Van Beeumen J., Ralph J., Boudet A.M., Kopka J., Rochange S.F., Halpin C., Messens E., Boerjan W.* // Plant J. 2007. V. 52. № 2. P. 263–285.
34. *Yan L., Liu S., Zhao S., Kang Y., Wang D., Gu T., Xin Z., Xia G., Huang Y.* // Physiol. Plant. 2012. V. 146. № 4. P. 375–387.
35. *Yan L., Xia G.-M., Huang Y.-H., Zhao Sh.-Y.* // Plant Physiol. J. 2013. V. 49. № 12. P. 1433–1441.

## Inheritance and Properties of Allelic Variants of CAD<sup>im</sup> (Aromatic Alcohol Dehydrogenase) in Spring Bread Wheat *Triticum aestivum* L.

A. A. Konovalov<sup>a,\*</sup>, E. V. Karpova<sup>b</sup>, I. K. Shundrina<sup>b</sup>, E. P. Razmakhnin<sup>c</sup>,  
I. V. Eltsov<sup>d</sup>, and N. P. Goncharov<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>b</sup>*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Science,  
Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>c</sup>*Siberian Research Institute of Crop Production and Selection – branch of ICG SB RAS,  
Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501 Russia*

<sup>d</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>e</sup>*Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, 630039 Russia*

\*e-mail: konov@bionet.nsc.ru

In this study, we determined the inheritance of allelic variants of CAD<sup>im</sup> (CAD intermediate) and their influence on expressiveness of spring bread wheat plants traits: fluorescence of seedlings slices, micromorphology and the chemical composition of tissues. Plants with contrast CAD<sup>im</sup> genotypes (homozygotes +/+ and –/–) were used to study tissue autofluorescence, micromorphology and chemical composition. The thickness of the straw walls in CAD<sup>im–</sup> genotype cells is higher than in CAD<sup>im+</sup> genotype, which can affect the resistance of wheat plants to lodging. There are differences in the content of chlorophyll and, especially, in the ratio of chlorophylls A and B, which probably affects photosynthesis. An increased content of carbonyl groups was found in the CAD<sup>im+</sup> genotype, as well as differences in the cinnamyl monomers of lignin. From the obtained data, it follows that the allelic variants CAD<sup>im+</sup> and CAD<sup>im–</sup> have a significant effect on a number of plant traits, and, therefore, the polymorphism on the CAD<sup>im</sup> locus is functional. This allows the use of this polymorphism in plant breeding and biotechnology.

*Keywords:* bread wheat, cinnamyl alcohol dehydrogenase, autofluorescence, micromorphology, chemical composition, lignin