

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 575.2: 632.4 + 633.111

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИТОВ CAD-IM ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЗАРАЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕМ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ

© 2023 г. А. А. Коновалов^{1,*}, Е. А. Орлова^{2,**}, Е. В. Карпова^{3,***}, И. К. Шундрин^{3,****},
А. А. Нефедов^{3,*****}, Н. П. Гончаров^{1,*****}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
630090 Новосибирск, Россия

²Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН,
630501 Новосибирская обл., пос. Краснообск, Россия

³Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
630090 Новосибирск, Россия

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

**e-mail: orlova.lena10@yandex.ru

***e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru

****e-mail: ishund@nioch.nsc.ru

*****e-mail: nefyodov@nioch.nsc.ru

*****e-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 06.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Определение роли конкретных генов и их продуктов в устойчивости растений к стрессовым факторам, в том числе и биотической природы, является актуальной задачей фитопатологии и дает дополнительную информацию для практического использования. У яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* изучали генотипы CAD^{im} (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, дегидрогеназа коричневого спирта; КФ 1.1.1.195), влияющие на устойчивость к бурой ржавчине. Устойчивый и восприимчивый генотипы выращивали на инфекционном фоне и при его отсутствии. Ткани растений изучали по ряду показателей, в том числе по содержанию фенилпропаноидных метаболитов, а также стерина и сапонинов. По фенилпропаноидам наблюдается увеличение относительного содержания ряда метаболитов под действием инфекции, особенно кониферилацетата и синапового альдегида. Обнаружено уменьшение относительного содержания некоторых стерина у устойчивого генотипа CAD^{im+} под влиянием инфекции. Предполагается, что у устойчивого генотипа CAD^{im+} под влиянием инфекции происходит переключение ацетатно-мевалонатного пути метаболизма с синтеза стерина на синтез защитных веществ – фитоалексинов.

Ключевые слова: грибная инфекция, дегидрогеназа коричневого спирта, пшеница, сапонины, стерин, химический состав тканей, фенилпропаноиды

DOI: 10.31857/S0026364823030066, **EDN:** VCOYPRQ

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость растений к патогенам бывает двух типов: конститутивная и индуцибельная (Efroimson, 1971; Rubin et al., 1975; Dyakov et al., 2001; Chesnokov, 2007). Первая обусловлена свойствами тканей растений, существующими изначально, вторая обеспечивается метаболическими изменениями в ответ на влияние инфицирующего агента.

Полиморфизм по генам, кодирующим CAD (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, дегидрогеназа коричневого спирта; КФ 1.1.1.195), описанный у ряда видов растений, во многих случаях приводит к

существенным изменениям свойств и признаков растения, в том числе влияет на устойчивость к патогенам (Kononov et al., 2015). Защитный белок ELI3, выделенный из петрушки и контролирующей устойчивость к паразитическому грибу *Phytophthora sojae*, оказался ферментом CAD (Somssich et al., 1996), субстратами для которого служат ароматические альдегиды. Попадание гриба *Botrytis cinerea* на поврежденные ткани пшеницы вызывает увеличение активности ароматических дегидрогеназ, в том числе CAD (Mitchell et al., 1994). Гены CAD-C и CAD-D арабидопсиса вовлечены в устойчивость к патогену *Pseudomonas*

syringae (Tronchet et al., 2010). Ген CAD1A показал достоверные различия в экспрессии в ответ на заражение у устойчивых и восприимчивых генотипов льна к *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (фузариозное увядание льна) (Novakovskiy et al., 2019). Устойчивый к *F. graminearum* генотип пшеницы Fhb1 имел утолщенную клеточную стенку за счет отложения флавоноидов и амидов гидроксикоричной кислоты, что в свою очередь было вызвано повышением активности ферментов фенилпропаноидного пути метаболизма, в том числе CAD (Gunnaiah et al., 2012). Влияние генотипов CAD на устойчивость к грибным инфекциям обнаружено на китайских сортах пшеницы (Rong et al., 2016).

Полиморфизм CAD (ранее называемый ароматическая алкогольдегидрогеназа) был описан у видов рода *Triticum* (Jaaska, 1978; Hart, 1987). В нашей предыдущей работе был выявлен внутривидовой полиморфизм CAD и было установлено (Kononov et al., 2020; 2021a), что генотипы по трем локусам CAD мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) различаются по устойчивости к мучнистой росе (возбудитель *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) и бурой ржавчине (возбудитель *Puccinia triticina*). Наибольший вклад в устойчивость или восприимчивость растений к мучнистой росе и бурой ржавчине вносят аллельные варианты по локусу CAD-im (Kononov et al., 2021a).

Цель работы заключалась в изучении состава метаболитов устойчивого и восприимчивого к бурой ржавчине CAD-im генотипов мягкой пшеницы, выращенных на инфекционном фоне и при его отсутствии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полиморфные варианты CAD были получены от скрещивания устойчивого к мучнистой росе и бурой ржавчине ярового сорта Новосибирская 61 с восприимчивым яровым сортом Скала и использовали для анализа расщепления в потомствах F₂ (Kononov et al., 2021b). В последующем были получены потомства F₅, из которых два контрастных образца, 9-1 (восприимчивый, генотип CAD^{im-}/CAD^{im-}) и 9-65 (устойчивый, генотип CAD^{im+}/CAD^{im+}) выращивали на инфекционном поле СибНИИРС (координаты 54°52'48.4"N 82°59'48.2"E) и в гидропонной теплице ИЦИГ. На инфекционном поле присутствуют популяции возбудителей грибных инфекций, в частности бурой ржавчины и мучнистой росы. Болезни сначала проявлялись на озимых посевах, затем переходили на яровые. Сначала проявлялась мучнистая роса, заражение происходило естественным путем, фенотипы по устойчивости/восприимчивости регистрировали 03.07. Заражение проростков спорами возбудителя бурой ржавчины проводили искусственно, опрыскиванием растений суспензией спор в 0.1%-м р-ре агар для прилипания,

фенотипы регистрировали в середине июля. Лабораторную оценку проводили только по бурой ржавчине, через 7 дней после искусственного заражения спорами. По распространенности других болезней (пыльная головня, септориоз) использованные образцы не различались.

Растения, выращенные в теплице, не подвергались воздействию грибной инфекции в отличие от растений, выращенных в поле. Все растения для проведения анализов были собраны после созревания зерна и высушены на воздухе.

Изоферментные спектры CAD определяли методом гель-электрофореза, с последующей окраской на CAD-активность тетразолиевым методом, с использованием НАДФ в качестве кофактора и коричневого спирта в качестве субстрата (Jaaska, 1978; Hart, 1987).

Определение содержания лигнина Комарова и кислоторастворимого лигнина (КРЛ), целлюлозы Кюршнера–Хоффера и экстрактивных веществ в стеблях растений проводили по стандартным методикам (Obolenskaya et al., 1965). Экстракцию проводили в аппарате Сокслета. Для этого точную навеску воздушно-сухого измельченного сырья (около 2 г) помещали в гильзу из фильтровальной бумаги, гильзу устанавливали в насадку аппарата Сокслета. В колбу аппарата наливали 300 мл спиртотолуольной смеси (1 : 2 по объему). Экстрагирование продолжали в течение 6–7 ч при энергичном кипении растворителя. Полученный экстракт помещали в высушенную до постоянной массы колбу, и отгоняли растворитель на ротационном испарителе. Колбу с экстрактивными веществами сушили в сушильном шкафу при температуре 103 ± 2°C до постоянной массы и взвешивали. Массовую долю экстрактивных веществ рассчитывали в % к абсолютно сухому сырью с учетом влажности, полученный экстракт использовали для определения содержания флавоноидов, и относительного содержания фенилпропаноидов и стероидов. Содержание золы определяли как остаток после нагревания измельченных стеблей при 575°C в течение 6 ч. Для каждого образца использовали две повторности.

Соотношение гидроксифенильных (H), гваяцильных (G) и сирингильных (S) звеньев в структуре лигнина определялось по содержанию продуктов нитробензольного окисления (Tarabanko et al., 2017). Разделение велось на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-анализатором Agilent 5973N (капиллярная колонка HP-5MS, диаметр колонки 0.25 мм, толщина слоя фазы 0.25 мкм, длина колонки 30 м; газ-носитель — гелий, скорость потока — 1 мл/мин; температура инжектора 280°C, температурный режим — 2 мин при 50°C, далее нагрев со скоростью 2°C/мин до 280°C, далее выдерживание при температуре 280°C в течение 20 мин). Пики хроматограмм идентифициро-

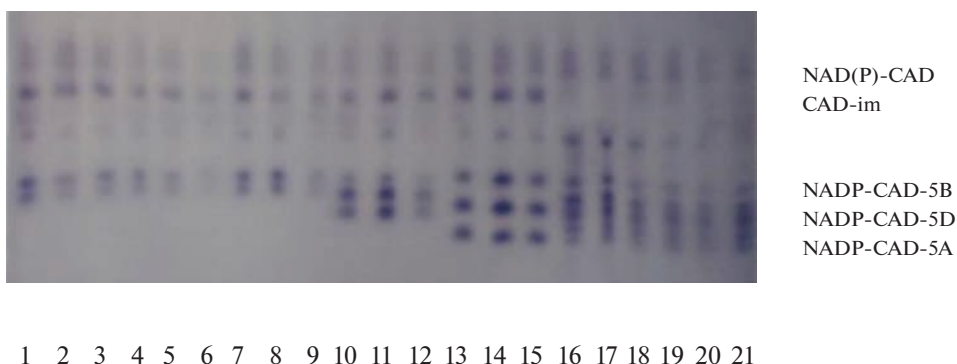


Рис. 1. Полиморфизм CAD у мягкой пшеницы: 1–9 – CAD-5A: –/–, CAD-5D: –/–, CAD^{im}: +/+; 10–12 – CAD-5A: –/–, CAD-5D: +/+, CAD^{im}: +/+; 13–15 – CAD-5A: +/+, CAD-5D: –/–, CAD^{im}: +/+; 16–21 – CAD-5A: +/+, CAD-5D: +/+, CAD^{im}: –/–.

вались по базам данных NIST17. Количество гваяцильных звеньев принимали за единицу.

Поверхности листьев и стеблей, а также срезы третьих междоузлий стеблей растений были исследованы с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) ТМ-1000 (Hitachi, Япония). Параметры работы СЭМ – ускоряющее напряжение 15 кэВ, режим низкого вакуума. Образцы фрагментов стеблей, листьев и поперечных срезов стеблей без предварительной обработки фиксировались на предметной столике с помощью токопроводящего скотча.

Для определения содержания флавоноидов навеску высушенного спирто-толуольного экстракта стеблей и листьев растений растворяли в этаноле в ультразвуковой ванне (УЗВ), р-р центрифугировали, аликвоту р-ра 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 апигенина на грамм сырья (мгАп/г).

Те же высушенные спирто-толуольные экстракты обрабатывали 10 мл хлороформа для извлечения фенольных соединений и стеринов. Полученные р-ры отделяли от осадка фильтрованием через мембранный фильтр. Фильтраты упаривали до 0.5 мл и использовали для хроматографического анализа. Хроматограммы полученных хлороформных растворов регистрировали на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent 7890В с масс-анализатором Agilent 5977В (капиллярная колонка HP-5MS, диаметр колонки 0.25 мм, толщина слоя фазы 0.25 мкм, длина колонки 30 м; газ-носитель – гелий, скорость потока – 1 мл/мин; температура инжектора 280°C, температурный режим – 2 мин при 50°C, далее нагрев со скоростью 10°C/мин до 280°C, далее выдерживание при температуре 280°C в течение 45 мин). Пики хроматограмм идентифицировали по базе данных NIST17. Со-

держание компонентов нормировали к содержанию кониферилового спирта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типы спектров CAD приведены на рис. 1. В нижней “быстрой” части зимограммы присутствуют изоферменты НАДФ-CAD (фермент, использующий в качестве кофактора НАДФ). Этот набор изоферментов контролируется локусами, локализованными в хромосомах 5-й гомеологической группы пшеницы (Jaaska, 1978; Hart, 1987). Самый быстрый изофермент – продукт локуса CAD-5A хромосомы 5A. По нему наблюдается полиморфизм: присутствие/отсутствие окрашенной зоны, аллельные варианты обозначаются соответственно + и –. В середине “быстрого” набора изоферментов локализованы продукты локуса CAD-5D хромосомы 5D. По этому локусу также есть полиморфизм, аллельные варианты + и –. Самый медленный изофермент “быстрого” набора изоферментов – продукт локуса CAD-5B хромосомы 5B, по этому локусу полиморфизм не обнаружен. Локализация генов основана на анализе нулли-тетрасомных и дителосомных линий (Jaaska, 1978).

Вверху, в “медленной” зоне зимограммы, локализованы изоферменты НАД(Ф)-CAD (это неспецифический фермент, проявляющий активность как с НАД, так и с НАДФ). Гены НАД(Ф)-CAD локализованы в хромосомах 6-й гомеологической группы (Jaaska, 1978). В этой зоне полиморфизм не обнаружен.

Изофермент CAD^{im} 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^{im+} (наличие изофермента) и CAD^{im–} (отсутствие изофермента), генотипы соответственно +/+ или –/–. Хромосомная локализация данного гена не-

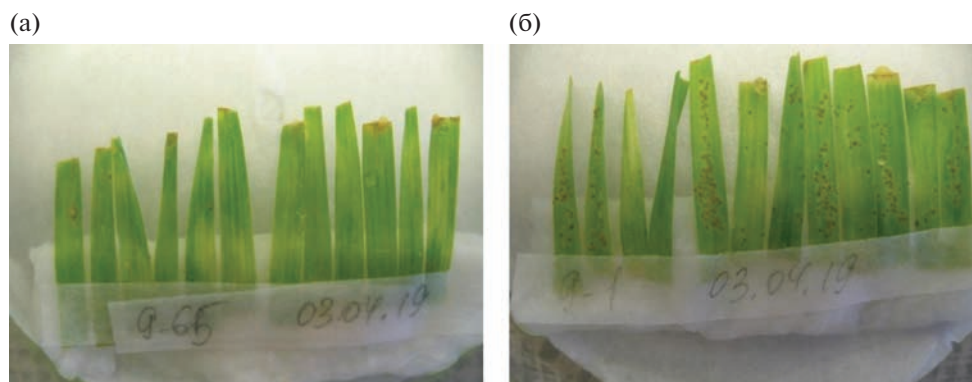


Рис. 2. Лабораторная оценка генотипов CAD на устойчивость к возбудителю бурой ржавчины: (а) потомство 9–65, оценка 0 баллов (устойчив); (б) потомство 9–1, оценка 3 балла (восприимчив).

известна, по анализу родословной сорта Новосибирская 61, возможно, это продукт пырейного замещения. Устойчивость сорта Новосибирская 61 к листовым инфекциям может быть унаследована от замещенной пшенично-пырейной линии АГИС 1 (через тулайковские сорта, см. родословная в статье Kopovarov et al., 2021b), несущей хромосомное замещение в 6D хромосоме 6Agi2 от пырея (пырей промежуточный – *Thinopyrum intermedium*) (Sibikeev et al., 2017; Ivanova et al., 2021). Поэтому можно предположить, что ген CAD^{im} представляет собой результат пырейного замещения по хромосоме 6D. CAD^{im} проявляет активность только с НАДФ, т.е. является НАДФ-CAD. Ранее было установлено, что именно генотипы по этому локусу вносят наибольший вклад в устойчивость или восприимчивость растений к мучнистой росе и бурой ржавчине (Kopovarov et al., 2021a). Гомозигота CAD^{im} +/+ (присутствует изофермент im

с промежуточной подвижностью) является устойчивой, гомозигота CAD^{im} –/– (изофермент отсутствует) восприимчива к обеим болезням.

Согласно принципу единственного различия, были использованы гомозиготные генотипы CAD^{im} +/+ и CAD^{im} –/–.

На рис. 2 показаны результаты лабораторной оценки образцов на устойчивость к возбудителю бурой ржавчины. На рис. 3 приведены фенотипы растений выращенных на инфекционном поле летом 2019 г. По обоим результатам образец 9–1 сильно поражается мучнистой росой и бурой ржавчиной, образец 9–65 – устойчивый.

Надземную часть растений использовали для сравнительного химического анализа генотипов пшеницы, имеющих разную устойчивость к грибным инфекциям (табл. 1). Содержание целлюлозы в клеточной стенке изучаемых генотипов различается незначительно. Оно несколько выше у восприимчивого генотипа, однако, не отличается у растений, выращенных в отсутствие и присутствии возбудителя инфекции. По содержанию лигнина образцы 9–1 и 9–65 существенно не различались. Содержание золы выше в тепличных образцах, что может быть связано со спецификой выращивания растений в гидропонной теплице. Зола лигнина отражает содержание биогенного оксида кремния в растении. В растениях устойчивого генотипа содержание золы лигнина практически одинаково для тепличных и полевых образцов. В полевых растениях восприимчивого генотипа золы лигнина в два раза больше, чем в тепличных растениях.

Наблюдаются некоторые различия по мономерному составу лигнина. У растений обоих образцов, выращенных в теплице, доля гидроксифенильных и сиригильных звеньев увеличивается, доля гваяцильных звеньев уменьшается, видимо, это связано с различиями полевых и тепличных условий. У растений восприимчивого генотипа (и тепличных, и полевых) выше содержание гид-

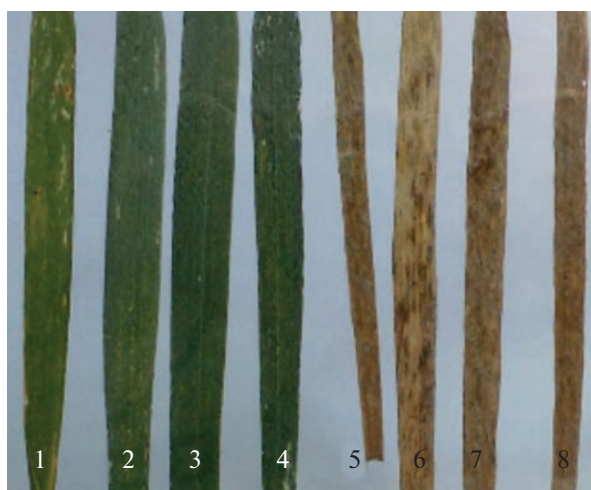


Рис. 3. Фенотипы растений по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины, лето 2019, инфекционное поле СибНИИРС: 1–4 – 9–65 (поражение 0%); 5–8 – 9–1 (поражение 65%).

Таблица 1. Содержание основных компонентов стеблей различных генотипов пшеницы, % сухой массы

Компонент	восприимчивый генотип, 9–1		устойчивый генотип, 9–65	
	теплица	поле	теплица	поле
Целлюлоза	46.6	46.6	44.2	44.1
Лигнин по Комарову	20.7	21.5	18.3	19.1
Зола лигнина	0.034	0.068	0.057	0.053
Лигнин без золы	20.03	20.02	17.21	18.07
КРЛ (кислоторастворимый лигнин)	0.019	0.015	0.016	0.022
Зола	9.3	5.6	10.0	4.4
Экстрактивные вещества	12.1	6.7	15.3	15.9
Содержание флавоноидов в сырье, мгАп/г				
Стебли	7.03	6.58	6.06	6.69
Листья	9.50	7.01	6.24	5.70
Компонентный состав лигнина (гидроксифенильные, гваяцильные и сирингильные звенья), %				
H	13.4 ± 0.3	8.8 ± 0.6	11.0 ± 0.4	6.6 ± 0.2
G	31.7 ± 0.5	44.5 ± 0.4	31.1 ± 0.8	41.4 ± 0.4
S	54.9 ± 0.4	46.7 ± 0.7	57.8 ± 0.4	52.0 ± 0.4
H : G : S	0.42 : 1.00 : 1.73	0.20 : 1.00 : 1.05	0.35 : 1.00 : 1.86	0.16 : 1.00 : 1.26

роксифенильных звеньев, у растений устойчивого генотипа выше содержание сирингильных звеньев. Поскольку генотипы 9–1 и 9–65 различаются по спектру CAD, различия по содержанию мономеров могут быть вызваны различиями по субстратной специфичности отдельных изоферментов NADP-CAD, которые обнаружены при очистке этого фермента у пшеницы и ее сородицей (Pillonel et al., 1992). По влиянию инфекции заметных различий не обнаружено, различия в поле и теплице у обоих образцов носят однонаправленный характер.

Содержание экстрактивных веществ у тепличных растений обоих генотипов близко. Однако, в тканях восприимчивых растений, выращенных на инфекционном поле, содержание экстрактивных веществ более чем в два раза ниже, чем в растениях устойчивого генотипа. Суммарное содержание флавоноидов в стеблях и листьях растений устойчивого генотипа не сильно расходятся в зависимости от места произрастания. У восприимчивого генотипа содержание флавоноидов заметно ниже в листьях растений, подвергшихся заражению.

Для тепличных и полевых растений определяли толщину клеточной стенки склеренхимных клеток, изучали поверхности стеблей и листьев (рис. 4, 5). Листья полевых растений взяты в середине вегетации, во время четкого развития болезни.

Толщина стенок клеток склеренхимы стеблей тепличных образцов составила 1.19 ± 0.07 мкм для устойчивого генотипа и 0.95 ± 0.05 для восприимчивого. Толщина клеток склеренхимы стеблей растений, выращенных на инфекционном поле,

составила 2.56 ± 0.11 мкм для устойчивого генотипа и 1.79 ± 0.04 для восприимчивого.

Поверхность стебля устойчивого генотипа покрыта папиллами в виде бляшек овальной формы и трихом, на стебле неустойчивого генотипа папиллы находятся преимущественно в виде бляшек овальной формы с единичными трихомами. На поверхностях зараженных листьев присутствуют папиллы обоих видов, но на поверхности листа растения устойчивого генотипа трихомы большего размера.

В составе фракции экстрактивных веществ, растворимой в хлороформе, методом ГХ-МС обнаружены насыщенные и ненасыщенные углеводороды, жирные кислоты, фенольные соединения и стерин. На рис. 6 приведены диаграммы относительного содержания этих соединений в хлороформной фракции экстрактивных веществ. Содержание компонентов нормировано к содержанию кониферилового спирта (№ 10, принят за 100%).

Как видно из данных ГХ-МС анализа в экстрактах растений, выращенных в различных по зараженности условиях, существенно различаются соотношения содержания одних и тех же веществ. В экстракте растений устойчивого генотипа, выращенных в теплице, относительное содержание практически всех стеринов (за исключением соединений 21, 32 и 33) и обоих сапонинов (β-амирин, № 25 и лупеол, № 28) выше, чем в экстракте неустойчивых растений. Относительное содержание большинства фенольных соединений также выше в тепличных растениях устойчивого генотипа, исключая 4-гидроксibenзальдегид, 3,4,5-три-

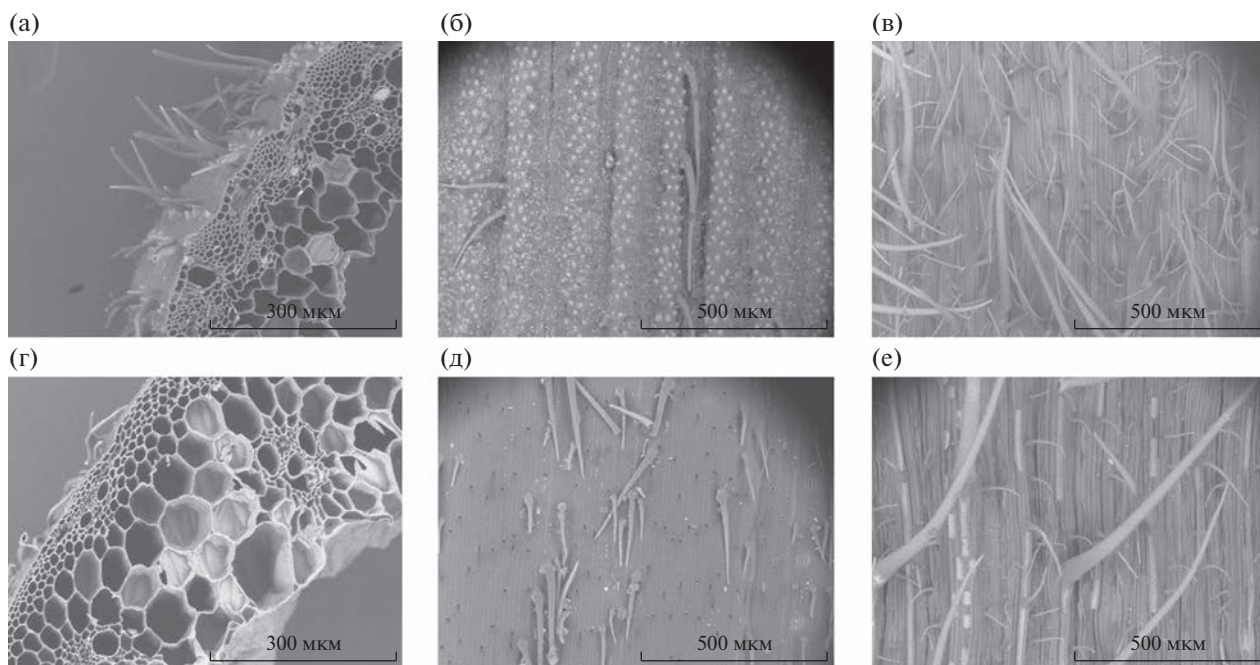


Рис. 4. СЭМ-изображения срезов стеблей (а, г), поверхностей стеблей (б, д), поверхностей листа (в, е) тепличных растений генотипов 9–65 (а, б, в) и 9–1 (г, д, е).

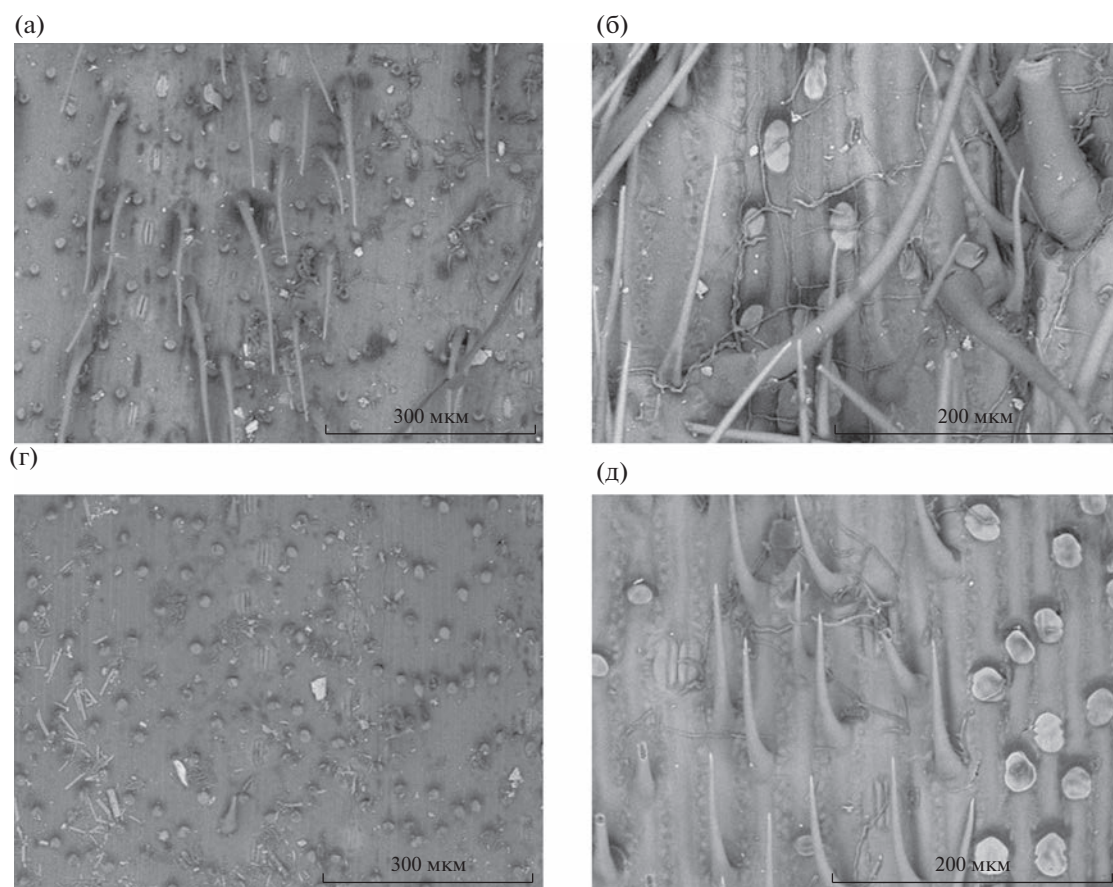


Рис. 5. СЭМ-изображения поверхностей стеблей (а, в), поверхностей листьев (б, г) полевых растений генотипов 9–65 (а, б) и 9–1 (в, г).

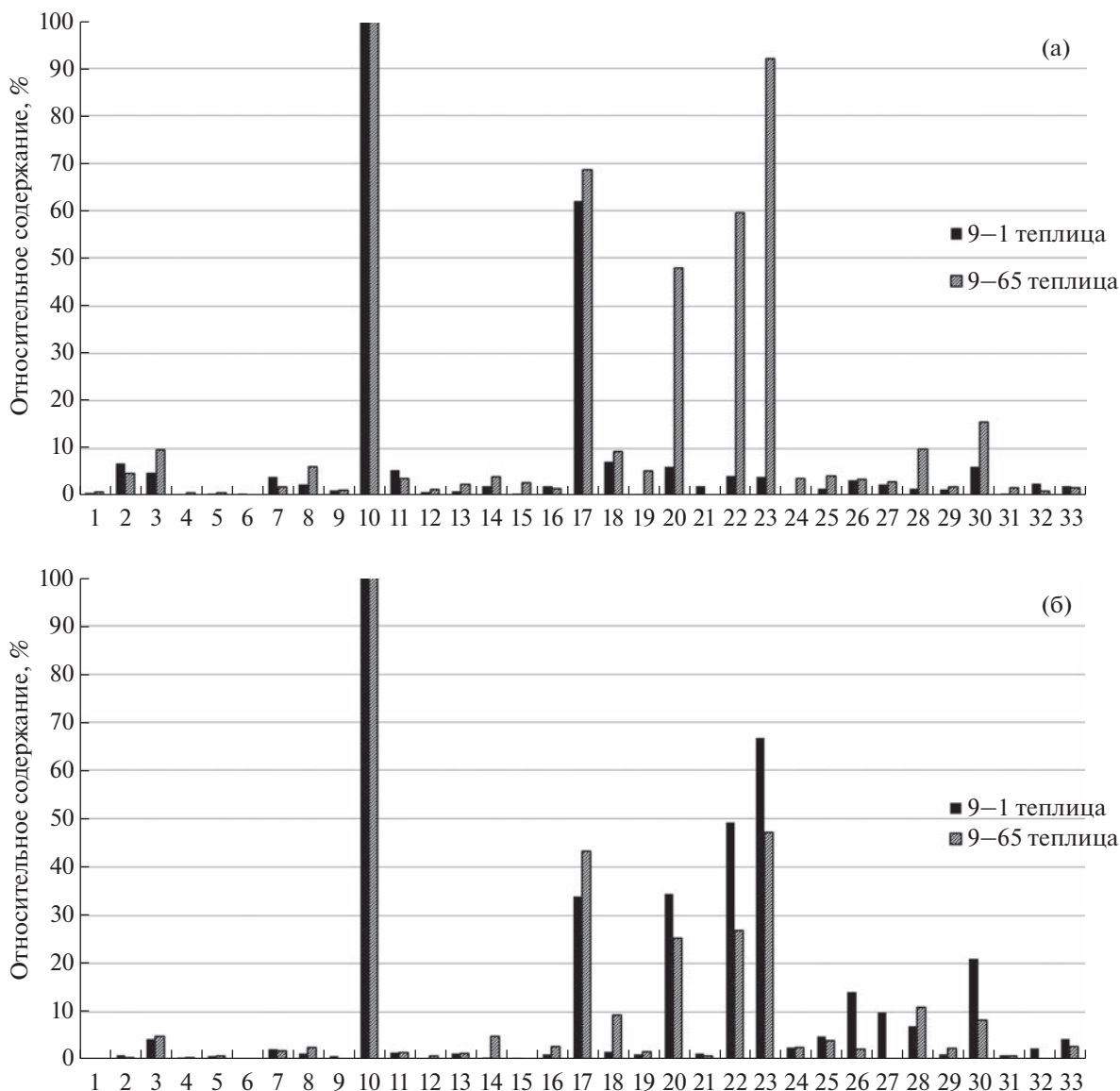


Рис. 6. Относительное содержание веществ фенольного типа и стероидов в стеблях растений генотипов 9–1 и 9–65, выращенных в теплице (а) и в условиях инфекционного поля (б): 1 – 2,6-диметоксифенол; 2 – 4-гидроксibenзальдегид; 3 – ванилин; 4 – ацетованиллон; 5 – бутированиллон; 6 – 3,4,5-триметоксифенол; 7 – *p*-кумаровый спирт; 8 – сиреневый альдегид; 9 – метиловый эфир гомованилиновой кислоты; 10 – кониферилловый спирт; 11 – *p*-гидроксикоричная кислота; 12 – сиреневая кислота; 13 – β -гидроксипропиованиллон; 14 – конифериллацетат; 15 – метил-2-(4-гидроксi-3,5-диметоксифенил)ацетат; 16 – синаповый альдегид; 17 – синаповый спирт; 18 – трицин; 19 – холестерин; 20 – кампестерин; 21 – 4-кампестен-3-он; 22 – стигмастерин; 23 – β -ситостерин; 24 – стигмастанол; 25 – β -амирин; 26 – (24R)-эргост-4-ен-3-он; 27 – спинастерон; 28 – лупеол; 29 – стигмаста-3,5-диен-7-он; 30 – ситостенон; 31 – аборенон; 32 – 4,4-диметил-холестан-3-он; 33 – (3 β)-3-гидроксi-стигмаст-5-ен-7-он.

метоксифенол, *p*-кумаровый спирт, *p*-гидроксикоричную кислоту и синаповый альдегид.

В условиях инфекционного поля относительное содержание большинства фенольных соединений также выше в растениях устойчивого генотипа. Относительное содержание стероидов в этих растениях ниже, чем в тепличных. В растениях восприимчивого генотипа, выращенных на поле, относительное содержание стероидов резко воз-

росло по сравнению с тепличными растениями и для многих веществ превысило их содержание в растениях устойчивого генотипа.

Содержание сапонинов в экстракте растений устойчивого генотипа, выращенных на инфекционном поле, осталось на том же уровне, что и для тепличных растений. Однако в растениях восприимчивого генотипа их относительное содержание значительно увеличилось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генотипы CAD^{im} влияли на толщину клеточных стенок, устойчивый генотип CAD^{im+} имеет более толстую стенку. Устойчивый к *Fusarium graminearum* генотип пшеницы *Fhb1* имел утолщенную клеточную стенку за счет отложения флавоноидов и амидов гидроксикоричной кислоты, что в свою очередь было вызвано повышением активности ферментов фенилпропаноидного пути метаболизма, в том числе CAD (Gunnaiah et al., 2012). Эти авторы предположили, что утолщение клеточной стенки является механизмом потенциальной устойчивости. Вероятно, утолщение клеточных стенок может являться дополнительным механизмом устойчивости, который не всегда присутствует. В нашем предыдущем исследовании на других образцах генотипы CAD^{im} по толщине клеточных стенок стебля не различались, а по некоторым микроморфологическим параметрам восприимчивый генотип даже превосходил устойчивый (Konovalov et al., 2021a). Папиллы и трихомы представляют собой динамические защитные структуры, которые могут сильно влиять на исход многих взаимодействий растения с окружающей средой. Было показано (Gupt et al., 2021), что генотипы мягкой пшеницы с высоким содержанием трихом на листе имели высокую устойчивость к поражению темно-бурой пятнистостью. Устойчивый генотип 9–65 также показал высокую опушенность листьев, которая может служить дополнительным барьером к заражению.

Согласно литературным данным в механизме защиты растений от грибных инфекций могут быть задействованы фенольные соединения и стерины (Rubin et al., 1975; Dyakov et al., 2001). Как показал ГХ-МС анализ экстрактов растений изучаемых генотипов, под действием грибной инфекции содержание некоторых фенилпропаноидов повышается, особенно кониферилацетата и синапового альдегида (№№ 14 и 16, рис. 6). Из всех фенилпропаноидов альдегиды наиболее токсичны для паразитических микроорганизмов (Barber et al., 2000), и вероятно оказывают защитное действие против инфекции. Фенилпропаноидные фитоалексины (защитные вещества) характерны для злаков (Dyakov et al., 2001).

У устойчивого образца 9–65 под действием грибной инфекции концентрация некоторых стеринных не увеличивается, а уменьшается (№№ 20, 22, 23, 25, 26, 30, рис. 6). В литературе описан этот феномен как защитная реакция против грибных инфекций, наиболее изученная на примере фитофторы картофеля (Metlitsky et al., 1980). Известно, что стеринны необходимы паразитическим грибам для размножения, причем как для полового (спороношения), так и бесполого, а также ветвления мицелия (Metlitsky, Ozeretskoyanskaya, 1985). Уменьшение концентрации некоторых стеринных является защитной реакцией растений от грибных

инфекций. Паразитические грибы используют стеринны растения для собственного роста и развития. Стеринны оказывают активирующее действие на гены грибов, контролирующих спороношение, а также участвуют в формировании мембран грибов. При выращивании на искусственной среде в отсутствие фитостеринных возбудитель фитофторы картофеля становится значительно более чувствительным к фитоалексинам и более для них уязвимым (Vasyukova et al., 1977a). Фитостеринны синтезируются в ацетатно-мевалонатном пути биосинтеза, в этом же пути синтезируются фитоалексины — вещества защитного действия (Dadali, Tutelyan, 2007). Под воздействием инфекции происходит переключение биосинтеза стеринных на синтез фитоалексинных, таких как ришитин, любимин, фитубурин и др. (Metlitsky et al., 1980). Можно предположить, что у пшеницы происходит сходный процесс — блокировка синтеза стеринных, необходимых для развития самого гриба, и переключения метаболизма на синтез фитоалексинных.

Одним из наиболее значимых стеринных является β-ситостерин (Vasyukova et al., 1977b; Metlitsky et al., 1980), по нашим данным, именно по этому метаболиту наблюдаются наибольшие различия между восприимчивым и устойчивым образцами в условиях инфекционного поля по сравнению с тепличным посевом (№ 23, рис. 6). Выявление стеринных с подобным действием предлагается использовать в практических целях (Metlitsky et al., 1980). Химические вещества, блокирующие синтез таких стеринных, можно использовать в качестве фунгицидов. Другое направление — создание сортов с генетически детерминированной модификацией метаболизма, ограничивающей развитие гриба.

Обнаруженные сапонины β-амирин и лупеол обладают сильным противогрибковым эффектом. Сапонины ядовиты для грибов, так как связываются со стеринами самих грибов в мембранах и блокируют дальнейший рост (имеют высокий гемолитический индекс) (Rubin et al., 1975; Morrissey, Osbourn, 1999; Dyakov et al., 2001; Pavlovskaya et al., 2012; Pane et al., 2020). У устойчивого образца в тепличных условиях концентрация этих сапонинов выше, чем у восприимчивого; однако в полевых условиях концентрация этих метаболитов у восприимчивого образца заметно повышается. Возможно, это реакция на воздействие патогена, которой, однако, не хватает для защиты растений.

У злаков долгое время не удавалось обнаружить фитоалексины, однако в последние годы такие работы появились. У пшеницы обнаружено индуцированное инфекцией *Bipolaris sorokiniana* накопление двух групп фитоалексинных, представляющих собой амиды коричной кислоты, т.е. производные фенилпропаноидного пути (Ube et al., 2019).

В настоящее время для “полевой” устойчивости (т.е. той, которая непосредственно используется в селекции) вместо поиска основного гена исследователи перешли к мнению, что резистентность более перспективно рассматривать как многофакторный признак (Mosquera et al., 2016; Frolova et al., 2021). Еще Эфроимсон (Efroimson, 1971), проанализировав большое количество данных, пришел к выводу, что устойчивость растений к болезням, нельзя свести к какой-либо одной схеме (ген-на-ген, теория неполной среды, и т.д.). Этим растения отличаются от животных и человека, у которых основной механизм защиты от патогенов обусловлен функцией костного мозга и кровеносной системы. Задача исследований в этой области сводится к определению круга факторов — морфологических и метаболических — способствующих устойчивости.

В данном исследовании обнаружены два механизма устойчивости, один из которых связан с повышением содержания фенолпропаноидных метаболитов, второй связан с понижением содержания стероидов, необходимых самому возбудителю для роста и развития. Можно предположить, что один из этих факторов придает устойчивость к одной из двух листовых инфекций (мучнистая роса или листовая ржавчина), а другой — соответственно к другой инфекции. В ходе дальнейших исследований, возможно, удастся выяснить соответствие механизмов устойчивости и инфекционных агентов.

Работа поддержана бюджетными проектами FWRN-2022-0017 (ИЦИГ СО РАН), FWRN-2022-0018 (СибНИИРС) и FWUE-2022-0005 (НИОХ СО РАН). Спектральные и аналитические измерения проведены в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barber M.S., McConnell V.S. et al. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochemistry*. 2000. V. 54 (1). P. 53–56. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00038-8)
- Chemical Tissue Indices in the Spring Bread Wheat *Triticum aestivum* L. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021a. V. 57 (4). P. 402–414 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0003683821040086>
- Dadali V.A., Tutelyan V.A. Phytosterins — biological activity and prospects for practical application. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2007. V. 127 (5). P. 458–470 (in Russ.).
- Dyakov Yu.T., Ozeretskorskaya O.L., Javakhia V.G. et al. General and molecular phytopathology. Society of Phytopathologists, Moscow, 2001 (in Russ.).
- Efroimson V.P. Immunogenetics. Medicine, Moscow, 1971 (in Russ.).
- Frolova T.S., Cherenko V.A., Sinitsyna O.I. et al. Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2021. V. 25 (2). P. 164–170 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ21.020>
- Gunnaiah R., Kushalappa A.C., Duggavathi R. et al. Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat *QTL (Fhb1)* contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS One* 2012. V. 7. P. e40695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040695>
- Gupt S.K., Chand R., Mishra V.K. et al. Spot blotch disease of wheat as influenced by foliar trichome and stomata density. *J. Agric. Food Res.* 2021. V. 6. P. 100227. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100227>
- Hart G.E. Genetic control of NADH dehydrogenase-1 and aromatic alcohol dehydrogenase-2 in hexaploid wheat. *Biochem Genet.* 1987. V. 25 (11–12). P. 837–846.
- Ivanova Yu.N., Rosenfread K.K., Stasyuk A.I. et al. Raise and characterization of a bread wheat hybrid line (Tulaykovskaya 10 × Saratovskaya 29) with chromosome 6Agi2 introgressed from *Thinopyrum intermedium*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2021. V. 25 (7). P. 701–712 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ21.080>
- Jaaska V. NADP-dependent aromatic alcohol dehydrogenase in polyploid wheats and their relatives. On the origin and phylogeny of polyploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 1978. V. 53 (3). P. 209–217.
- Karpova E.V., Shundrina I.K., Orlova E.A. et al. Aromatic and mineral substances in the tissues of the samples of spring common wheat *Triticum aestivum* L., differing in resistance to brown rust (pathogen *Puccinia triticea* Erikss.) *Khimiya rastitel'nogo syrya*. 2019. V. 4. P. 87–95 (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019045238>
- Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V. Polymorphism of lignification enzymes at plants: functional value and applied aspects. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2015. V. 135 (5). P. 496–513 (in Russ.).
- Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V. et al. Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance to a brown rust in common wheat plants. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2017. V. 21 (6). P. 686–693 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/VJ17.286>
- Konovalov A.A., Orlova E.A., Karpova E.V. et al. Effect of polymorphic variants of *CAD* (EC 1.1.1.195) on wheat resistance to fungal infections. Gene pool and plant selection. V International Conference. 11–13 November 2020 Reports and communications. Novosibirsk, 2020. P. 147–150 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/GPB2020-00>
- Konovalov A.A., Karpova E.V., Shundrina I.K. et al. Effect of allelic variants of aromatic alcohol dehydrogenase CAD im on micromorphological and chemical parameters of tissues in spring common wheat *Triticum aestivum* L. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021a. V. 57 (4). P. 402–414. <https://doi.org/10.31857/S0555109921040085>
- Konovalov A.A., Orlova E.A., Nemtsev B.F. et al. Effect of leaf pubescence and direction of crossbreeding on spring bread wheat resistance to powdery mildew and brown rust. *Pisma v Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2021b. V. 7 (3). 130–137 (in Russ.). <https://doi.org/10.18699/LettersVJ2021-7-15>
- Metlitsky L.V., Ozeretskorskaya O.L., Vasyukova N.I. Phytosterins and their role in the relationship of plants with parasitic fungi (using the example of fungi of the *Pythia*-

- ceae family). Uspekhi sovremennoy biologii. 1980. V. 89 (1). P. 28–41 (in Russ.).
- Metlitsky L.V., Ozeretskoy O.L. How plants protect themselves from diseases. Nauka, Moscow, 1985 (in Russ.).
- Mitchell H.J., Hall J.L., Barber M.S. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Plant Physiol. 1994. V. 104 (2). P. 551–556.
- Morrissey J.P., Osbourn A.E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiology and molecular biology reviews. 1999. V. 63 (3). P. 708–724.
- Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M. et al. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease. PLOS One. 2016. V. 11(6). P. e0156254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156254>
- Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Krasnov G.S. et al. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family is involved in the response to *Fusarium oxysporum* in resistant and susceptible flax genotypes. Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii. 2019. V. 23 (7). P. 896–901. <https://doi.org/10.18699/VJ19.564>
- Obolenskaya A.V., Shchegolev V.P., Akim G.L. et al. Practical work on the chemistry of wood and cellulose. Lesnaya Promyshlennost, Moscow, 1965 (in Russ.).
- Pane C., Caputo M., Francese G. et al. Managing *Rhizoctonia* damping-off of rocket (*Eruca sativa*) seedlings by drench application of bioactive potato leaf phytochemical extracts. Biology (Basel). 2020. V. 9 (9). P. 270. <https://doi.org/10.3390/biology9090270>
- Pavlovskaya N.E., Solokhina I.Yu., Gneusheva I.A. Study of triterpene saponins obtained from the roots of *Avena sativa* sowing oats. Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2012. № 2. P. 48–50 (in Russ.).
- Pillonel C., Hunziker P., Binder A. Multiple forms of the constitutive wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase. J. Exp. Bot. 1992. V. 43 (248). P. 299–305.
- Rong W., Luo M., Shan T. et al. A wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase TaCAD12 contributes to host resistance to the sharp eyespot disease. Front. Plant. Sci. 2016. V. 7. Arti. 1723. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01723>
- Rubin B.A., Artsikhovskaya E.V., Aksenova V.A. Biochemistry and physiology of plant immunity. Ed. 3rd, reworked and additional Vysshaya Shkola, Moscow, 1975 (in Russ.).
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D. et al. Comparative Analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Agi and 6Agi2 chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat–wheatgrass substitutions. Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53 (3). P. 314–324 (in Russ.). <https://doi.org/10.7868/S0016675817030110>
- Somssich I.E., Wernert P., Kiedrowski S. et al. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein *ELI3* is an aromatic alcohol:NADP⁺ oxidoreductase. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 14199–14203. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14199>
- Tarabanko V.E., Tarabanko N.V. Catalytic oxidation of lignins into the aromatic aldehydes: General process trends and development prospects. Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18 (11). P. 2421. <https://doi.org/10.3390/ijms18112421>
- Tronchet M., Balagué C., Kroj T. et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Ara-bidopsis*. Molec. Plant Pathol. 2010. V. 11. P. 83–92. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00578.X>
- Ube N., Harada D., Katsuyama Y. et al. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. Phytochemistry. 2019. V. 167. 112098. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112098>
- Vasyukova N.I., Davydova N.A., Ozeretskoy O.L. et al. The nutrient-inhibiting hypothesis of phytoimmunity on the example of mutual relations between potatoes and the fungus *Phytophthora infestans* (Mont.) De By. Mikologiya i fitopatologiya. 1977a. V. 11 (6). P. 480–487 (in Russ.).
- Vasyukova N.I., Davydova N.A., Shcherbakova L.A. et al. Phytosterins as a factor protecting the pathogen of potato blight from the action of phytoalexins. Doklady Akademii nauk USSR. 1977b. V. 235 (1). P. 216–219 (in Russ.).
- Васюкова Н.И., Давыдова Н.А., Озерецковская О.Л. и др. (Vasyukova et al.) Питательно-тормозящая гипотеза фитоиммунитета на примере взаимоотношений картофеля и гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de By // Микология и фитопатология. 1977. Т. 11. № 6. С. 480–487.
- Васюкова Н.И., Давыдова Н.А., Щербакова Л.А. и др. (Vasyukova et al.) Фитостерины как фактор, предохраняющий возбудитель фитофтороза картофеля от действия фитоалексинов // ДАН СССР. 1977. Т. 235. № 1. С. 216–219.
- Дадали В.А., Тутельян В.А. (Dadali, Tutelyan) Фитостерины – биологическая активность и перспективы практического применения // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. № 5. С. 458–470.
- Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г. и др. (Dyakov et al.) Общая и молекулярная фитопатология. М.: Из-во Общество фитопатологов, 2001. 302 с.
- Иванова Ю.Н., Розенфрид К.К., Стасюк А.И. и др. (Ivanova et al.) Получение и характеристика линии мягкой пшеницы (Тулайковская 10 × Саратовская 29) с интрогрессией хромосомы пырея *Thinopyrum intermedium* 6Agi2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. № 7. С. 701–712.
- Карпова Е.В., Шадрин И.К., Орлова Е.А. и др. (Karпова et al.) Ароматические и минеральные вещества в тканях образцов яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., различающихся по устойчивости к бурой ржавчине (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) // Химия растительного сырья. 2019. № 4. С. 87–95.
- Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В. (Konovvalov et al.) Полиморфизм ферментов лигнификации у растений: функциональное значение и прикладные аспекты // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 5. С. 496–513.
- Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В. (Konovvalov et al.) Влияние лигнификации и минерализации тканей листа на устойчивость к бурой ржавчине

- растений мягкой пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 686–693.
- Коновалов А.А., Карпова Е.В., Шундрин И.К. (Kononov et al.) Влияние аллельных вариантов ароматической алкогольдегидрогеназы CAD im на морфологические и химические показатели тканей у яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 4. С. 402–414.
- Коновалов А.А., Орлова Е.А., Карпова Е.В. и др. (Kononov et al.) Влияние полиморфных вариантов CAD (EC 1.1.1.195) на устойчивость пшеницы к грибным инфекциям // Генофонд и селекция растений. V международная конференция. 11–13 ноября 2020 г. Доклады и сообщения. Новосибирск: ИГиГ СО РАН, 2020. С. 147–150.
- Коновалов А.А., Орлова Е.А., Немцев Б.Ф. и др. (Kononov et al.) Влияние опушения листьев и направления скрещиваний на устойчивость яровой мягкой пшеницы к мучнистой росе и бурой ржавчине // Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 7. № 3. С. 130–137.
- Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. (Metlitskiy, Ozeretskorskaya) Как растения защищаются от болезней. М.: Наука, 1985. 189 с.
- Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. и др. (Metlitskiy et al.) Фитостерины и их роль во взаимоотношениях растений с паразитарными грибами (на примере грибов семейства Pythiaceae) // Успехи современной биологии. 1980. Т. 89. Вып. 1. С. 28–41.
- Методы оценки и отбора исходного материала при создании сортов пшеницы устойчивых к бурой ржавчине: монография (Methods) М.: ООО “РС дизайн”, 2012. 93 с.
- Павловская Н.Е., Солохина И.Ю., Гнеушева И.А. (Pavlovskaya et al.) Исследование тритерпеновых сапонинов, полученных из корней овса посевного *Avena sativa* // Вестник ОрлГАУ. 2012. № 2. С. 48–50.
- Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. (Rubin et al.) Биохимия и физиология иммунитета растений. Изд. 3-е, перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1975. 320 с.
- Сибикеев С.Н., Бадаева Е.Д., Гуляева Е.И. и др. (Sibikeev et al.) Сравнительный анализ 6Agi и 6Agi2 хромосом *Agropyron intermedium* (Host) Beauv у сортов и линий мягкой пшеницы с пшенично-пырейными замещениями // Генетика. 2017. Т. 53. № 3. С. 298–309.
- Фролова Т.С., Черенко В.А., Синицына О.И. и др. (Frolova et al.) Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. № 2. С. 164–170.
- Эфроимсон В.П. (Efroimson) Иммуногенетика. М.: Медицина, 1971. 336 с.

Comparative Analysis of Metabolites of CAD-im Genotypes of Spring Bread Wheat under Brown Rust Infection

A. A. Kononov^{a, #}, E. A. Orlova^{b, ##}, E. V. Karpova^{c, ###}, I. K. Shundrina^{c, ####},
A. A. Nefedov^{c, #####}, and N. P. Goncharov^{a, #####}

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^bSiberian Research Institute of Plant Cultivation and Breeding – Branch of Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia

^cVorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

[#]e-mail: konov@bionet.nsc.ru

^{##}e-mail: orlova.lena10@yandex.ru

^{###}e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru

^{####}e-mail: ishund@nioch.nsc.ru

^{#####}e-mail: nefyodov@nioch.nsc.ru

^{#####}e-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Determination of the role of specific genes and their products in plant resistance to stress factors, including those of a biotic nature, is an urgent task of phytopathology and provides additional information for practical use. For spring bread wheat *Triticum aestivum*, CAD-im genotypes (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, cinnamyl alcohol dehydrogenase; EC 1.1.1.195) affecting leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance were studied. Resistant and susceptible genotypes were grown on an infectious background and in its absence. Plant tissues were studied for a number of indicators, including the content of phenylpropanoid metabolites, as well as sterols and saponins. Phenylpropanoids show an increase in a number of metabolites due to infection, especially coniferyl acetate and synapic aldehyde. A decrease in the content of some sterols under the influence of infection in the resistant CAD^{im+} genotype was found. It is assumed that the acetate-mevalonate pathway of metabolism in the resistant genotype CAD^{im+} changes under the influence of infection from the synthesis of sterols to the synthesis of protective substances, phytoalexins.

Keywords: bread wheat, chemical composition of tissues, cinnamyl alcohol dehydrogenase, leaf rust, phenylpropanoids, saponins, sterols