

Влияние лигнификации и минерализации тканей листа на устойчивость к бурой ржавчине растений мягкой пшеницы

А.А. Коновалов¹, И.К. Шундрин^{2, 4}, Е.В. Карпова^{2, 4}, И.В. Ельцов⁴, Е.А. Орлова³, Н.П. Гончаров^{1, 5}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Один из ключевых ферментов ароматического обмена растений, CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа коричного спирта; EC 1.1.1.195), у ряда видов растений оказывает влияние на содержание ароматических веществ и на защитные свойства тканей от грибных инфекций. При изучении коллекции сортообразцов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., полиморфных по спектрам CAD, обнаружены различия по степени поражения листовой ржавчиной (возбудитель *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). Целью работы было изучение особенностей структуры и химического состава тканей листа, способствующих повышенной устойчивости. На фитопатологическом участке СибНИИРС на фоне искусственного заражения спорами бурой листовой ржавчины два образца яровой мягкой пшеницы 3-13-15-4 и 3-4-14-3 поразились соответственно на 1–5 и на 30 %. У этих контрастных по устойчивости образцов был проведен анализ содержания различных веществ в тканях листьев. На поверхности листа более устойчивого образца наблюдаются крупные бляшки, состоящие из минеральных веществ. В золе листьев и золе лигнина также обнаружены отличия по содержанию ряда минеральных элементов. Общее содержание лигнина на сухую массу листа различалось незначительно (14.2 и 12.3 % соответственно), однако есть различия по химическому составу лигнина. Можно предположить, что выявленные различия имеют отношение к разной степени поражения растений листовой ржавчиной. Следовательно, эти показатели можно использовать для диагностики потенциальной устойчивости сортообразцов пшеницы к грибной инфекции.

Ключевые слова: мягкая пшеница; бурая ржавчина; лигнификация; минерализация; спектроскопия; двумерный магнитный резонанс.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Ельцов И.В., Орлова Е.А., Гончаров Н.П. Влияние лигнификации и минерализации тканей листа на устойчивость к бурой ржавчине растений мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):686-693. DOI 10.18699/VJ17.286

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Konovalev A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Eltsov I.V., Orlova E.A., Goncharov N.P. Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance to a brown rust in common wheat plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):686-693. DOI 10.18699/VJ17.286 (in Russian)

Received 14.01.2017
Accepted for publication 05.10.2017
© AUTHORS, 2017

e-mail: konov@bionet.nsc.ru

Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance to a brown rust in common wheat plants

A.A. Konovalev¹, I.K. Shundrina^{2, 4}, E.V. Karpova^{2, 4}, I.V. Eltsov⁴, E.A. Orlova³, N.P. Goncharov^{1, 5}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
² Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Aromatic substances in plant tissues can have protective effect against fungal diseases. One of the key enzymes in aromatic metabolism of plants, CAD (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, dehydrogenase of cinnamyl alcohol; EC 1.1.1.195), at a number of species of plants exerts impact on the content of aromatic substances and on protective properties of tissues from fungal infections. When studying a collection of cultivars of bread wheat *Triticum aestivum* L., polymorphic on CAD, distinctions on extent of defeat are found by brown rust (with *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* as a causative agent). The purpose of the work was studying of features of structure and chemical composition of the tissues of a leaf promoting increased resistance. On a phytopathologic plot, against artificial infection with spores of a brown rust, two samples of spring bread wheat 3-13-15-4 and 3-4-14-3 were affected 1–5 % and 30 %, respectively. An analysis of various substances content in the leaf tissue at the contrast samples was conducted. Large plaques and spot consisting of mineral compounds were observed on the leaf surface of the more resistant plant. In ashes of leaves and ashes of a lignin differences in the maintenance of a number of mineral elements were also found. Lignin content on the dry mass of a leaf differed slightly (14.2 % vs 12.3 %), however there are differences in chemical composition. It is possible that the observed differences lead to afflict the plants with leaf rust to such different degrees. In that case these characteristics can be used for diagnostics of potential resistance of cultivars to fungal infection.

Key words: common wheat; brown rust; lignification; mineralization; spectroscopy; two-dimensional magnetic resonance.

Еще в начале 1960-х гг. было установлено, что лигнификация тканей растений является фактором устойчивости к грибным патогенам (Hijwegen, 1963). Защитный эффект может выражаться в механической преграде распространению гифов гриба, а также в токсическом действии ароматических метаболитов на патоген.

Синтез лигнина и его отложение во вторичных клеточных стенках происходят в результате шикиматного (фенилпропаноидного) пути метаболизма. Данный путь начинается с дезаминирования ароматических аминокислот (фенилаланина и триптофана) и приводит к образованию фенилпропаноидов – ароматических кислот, альдегидов и спиртов, и их многочисленных производных – лигнина, лигнанов и ароматических гликозидов, многие из которых обладают биологической активностью (Запромётов, 1993). Ферменты фенилпропаноидного пути метаболизма у растений участвуют в целом ряде защитных механизмов, таких как заживление механических повреждений, индукция многофункционального регуляторного и защитного вещества MeJA (метилжасмонат) и защита от патогенных атак (Belhadj et al., 2006; Simons et al., 2008; Tronchet et al., 2010; Li et al., 2012; и др.).

Терминальная реакция фенилпропаноидного пути – образование монолигнолов (ароматических спиртов) – контролируется семейством ферментов CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа коричневого спирта; EC 1.1.1.195); иногда выделяют подсемейство SAD (sinapyl alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа синапового спирта). У многих видов растений обнаружен полиморфизм по генам, кодирующим CAD (Коновалов и др., 2015). Полиморфные варианты нередко оказывают влияние на свойства и признаки растений, некоторые из которых имеют отношение к защитным реакциям.

Фенилпропаноидные предшественники лигнина обладают антимикробной и фунгицидной активностью (Barber et al., 2000). Однако результаты были получены с использованием растворов этих веществ (т.е. в мономерном состоянии), и неизвестно, в какой степени их свойства сохраняются в составе полимерных молекул лигнина.

Попадание спор гриба на поврежденные ткани пшеницы вызывает увеличение активности ФАЛ (фенилаланин-аммиак-лиаза; PAL – phenylalanine ammonia lyase, EC 4.3.1.24) и ароматических дегидрогеназ (в особенности SAD-активность), а также пероксидазы, участвующей в процессе полимеризации монолигнолов (Mitchell et al., 1994).

Инфекция тополя паразитическим грибом *Phanerochaete chrysosporium* вызывала изменения в химическом составе лигнина, в частности усиление синтеза синрингильных мономеров лигнина (Gaskell et al., 2014). Пять из шестнадцати генов CAD тополя индуцировались патогенами, в том числе два гена, *Pop-trCAD11* и *Pop-trCAD15*, задействованы в защитных реакциях тканей листа от всех трех использованных грибных инфекций (*Rhizoctoniasolani*, *Fusarium oxysporum* и *Cytospora* sp.), т.е. являются специализированными защитными факторами. Защитная реакция сопровождается изменением автофлюоресценции срезов ткани листа. Однако изменение химического состава тканей не изучалось (Bagniewska-Zadworna et al., 2014). В этой же работе проведен филогенетический

анализ 134 генов CAD у растений (Bagniewska-Zadworna et al., 2014). Авторы полагают, что существует основная филогенетическая линия CAD-генов, общая для цветковых растений. Эти гены называются *bona fide CAD* (т.е. настоящие, истинные CAD) и *CAD-like* (т.е. CAD-подобные). Первые, по мнению авторов, обеспечивают базовую лигнификацию стеблей, вторые – принимают участие в защитных реакциях.

Грибные инфекции в суспензионных культурах клеток льна (возбудители *Botrytis cinerea*, *Phoma exigua* и *Fusarium oxysporum* f. ssp. *lini*) активировали фенилпропаноидный путь, причем активность CAD менялась субстрат-специфично: с кониферильным альдегидом иначе, чем с синаповым. При этом происходило изменение химической структуры лигнина и накопление других производных фенилпропаноидного пути (Hano et al., 2006).

Защитный белок ELI3, выделенный из петрушки и контролирующей устойчивость к возбудителю *Phytophthora sojae*, оказался ферментом CAD (Somssich et al., 1996), субстратами для которого является ряд ароматических альдегидов, в частности салициловый альдегид. Производные салициловой кислоты – как известно, один из наиболее распространенных факторов устойчивости растений к патогенам.

В ряде случаев защитной реакцией растения может быть понижение активности ферментов. Подобный механизм описан для огурца (Varbanova et al., 2011). Грибную инфекцию имитировали обработкой пектиназой. При этом снижалась активность НСТ (hydroxycinnamoyl coenzyme A-quinase transferase; полное название – p-hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinatер-hydroxycinnamoyltransferase, EC 2.3.1.99), а ферменты CAD огурца имеют низкое сродство к *n*-кумаровому альдегиду. В результате *n*-кумаровый альдегид накапливается в тканях и выполняет функцию фитоалексина (вещества защитного действия).

К настоящему времени у мягкой пшеницы известно несколько десятков генов *Lr* (leaf rust), контролирующих устойчивость к листовой ржавчине. Некоторые из них локализованы в хромосомах 5-й гомеологической группы (McIntosh et al., 2005). В хромосоме 5В локализован ген *Lr18* (Hart et al., 1993). Другой ген, *QLr.icg-5B*, неаллельный *Lr18*, также расположен в хромосоме 5В (Леонова и др., 2008). Пятна на листьях пшеницы, обусловленные поражением корневой гнилью, связаны с двумя генами, локализованными в длинном плече хромосомы 5В (Kumar et al., 2016).

При изучении полиморфизма и генетического контроля CAD у мягкой пшеницы были получены гибриды различных образцов, в том числе с использованием нулли-тетрасомных линий сорта Chinese Spring (Коновалов и др., 2016). По литературным данным, полиморфные варианты этого семейства ферментов оказывают влияние на содержание ароматических веществ и в некоторых случаях – на защитные свойства тканей растений.

Цель данной работы – выяснить, различаются ли образцы с различными типами спектров CAD по степени поражения бурой ржавчиной, и изучить ткани их листьев по микроморфологическим и химическим показателям.

Материалы и методы

В работе изучали растения F_3 гибридов озимого сорта Новосибирская 9 с нулли-тетрасомными линиями сорта Chinese Spring и их родительские формы. Гибридные растения и родительские формы выращивали на инфекционном поле СибНИИРС и в гидропонной теплице ИЦиГ СО РАН. Первые использовали для оценки степени поражения, вторые – для анализов. Для выращивания растений использовали семена одного урожая. Несколько десятков растений каждого генотипа объединяли в две выборки, по одному листу среднего яруса для каждого генотипа. В этой смеси анализировали содержание веществ. Для микроскопии были взяты типичные растения каждого генотипа.

Анализировали признаки и свойства тканей, не подвергавшихся влиянию инфекции. Изучение влияния инфекции на изменения в инфицированных тканях – это отдельная задача, в настоящей работе такие исследования не проводились.

Интенсивность поражения листьев пшеницы бурой ржавчиной оценивали по шкале Петерсона (Изучение..., 2008).

Изоферментный спектр CAD1 определяли с помощью электрофореза в крахмальном геле (Генетика изоферментов, 1977).

Изучение поверхности листьев проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) TM-1000 (Hitachi, Токио, Япония), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским спектрометром EDS (SwiftED, Оксфорд, Великобритания). Параметры работы СЭМ – ускоряющее напряжение 15 кэВ, режим низкого вакуума. Образец без предварительной обработки фиксировался на предметном столике с помощью токопроводящего скотча. Детектор позволяет определять химические элементы с массой от 23 до 238 Да.

Для изучения содержания антоциановых пигментов использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В исследуемом материале такие пигменты отсутствовали.

Химические показатели оценивали по стандартным методикам (Химический сервисный центр СО РАН). Образцы лигнинов получали, экстрагируя растительное сырье смесью диоксан–вода 9:1 в присутствии HCl (0.7 %) при температуре кипения в течение 50 мин. Полученный раствор лигнина отфильтровывали от остатка сырья, упаривали в вакууме и высаживали в десятикратный объем горячей воды. Для очистки лигнин растворяли в диоксане и высаживали в диэтиловый эфир. Регистрация спектров ЯМР диоксан-лигнинов проводилась на приборе Bruker Avance III 500 при рабочих частотах 500.03 (^1H) и 125.75 (^{13}C) МГц. Исследуемые образцы готовили путем растворения 25 мг лигнина в 650 мг DMSO- d_6 при нагревании на водяной бане при температуре 80 °C и интенсивном перемешивании. Съемка спектров проводилась в 5 мм ампулах при температуре 50 °C. Для съемки спектров на ядрах ^1H использовали в качестве стандарта сигналы остаточных протонов растворителя ($\delta = 2.5$ м.д.), релаксационная задержка – 10 с, развертка – 20 м.д., количество накоплений – 256. Для съемки спектров на ядрах ^{13}C в качестве стандарта был выбран сигнал растворителя ($\delta = 39.5$ м.д.), релаксационная задержка – 3 с,

развертка – 240 м.д., количество накоплений – 71 680. Двумерные гетероядерные СН-корреляции НМВС (heteronuclear multibond correlation – гетероядерная многосвязная корреляция) и HSQC (heteronuclear single quantum correlation – гетероядерная одноквантовая корреляция) снимались с разверткой от 0 до 16 м.д. по каналу ^1H и от 0 до 200 м.д. по каналу ^{13}C . Количество накоплений соответствует 60 сканам для обоих экспериментов в случае диоксан-лигнина образца 3-4-14-3 и 80 и 360 сканам соответственно для экспериментов НМВС и HSQC в случае диоксан-лигнина образца 3-13-15-4. Отнесение кросс-сигналов $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ в HSQC-спектрах лигнинов проводилось по (Белый и др., 2012).

Относительное содержание основных типов связей в макромолекуле лигнина, концевых групп, молярное соотношение мономерных звеньев (гидроксифенильных, гваяцильных и сирингильных звеньев, Н:G:S), содержание кумаратов и ферулатов определяли согласно (del Río et al., 2012).

Результаты

В более ранней работе нами было изучено F_2 озимого сорта Новосибирская 9 с нулли-тетрасомными линиями сорта Chinese Spring по хромосомам 5-й гомеологической группы (Коновалов и др., 2016). В потомствах этих гибридов наблюдали различные типы спектров CAD. Растения, отличающиеся типами спектров, в данной работе были использованы для оценки поражения бурой ржавчиной. Оценка устойчивости проведена по стандартной методике по шкале Петерсона (Изучение..., 2008). Два контрастных образца 3-13-15-4 и 3-4-14-3, поражавшихся листовой (бурой) ржавчиной в разной степени – на 1–5 и 30 % соответственно, были взяты в дальнейшие исследования.

Более устойчивый образец 3-13-15-4 имеет такой же спектр CAD, как исходная нулли-тетрасомная линия n5B-t5A сорта Chinese Spring; менее устойчивый образец 3-4-14-3 имеет стандартный спектр, как у сорта Новосибирская 9 (рис. 1). Различия заключаются в отсутствии двух «медленных» изоферментов, что характерно для генотипов с отсутствием хромосомы 5B (Коновалов и др., 2016).

У растений более устойчивого образца 3-13-15-4 окраска листьев варьировала от бледно-желтой до красно-коричневой. Однако по результатам ВЭЖХ (данные не представлены) красно-коричневые листья не содержали антоциановых пигментов, следовательно, окраска вызвана другими причинами, возможно изменением оптических свойств лигнина.

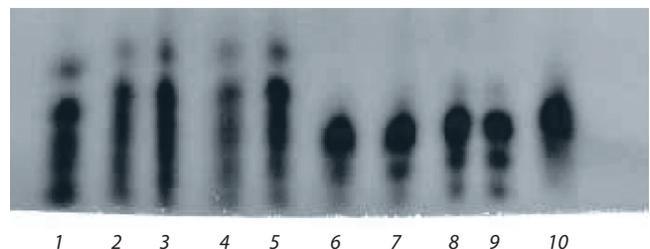
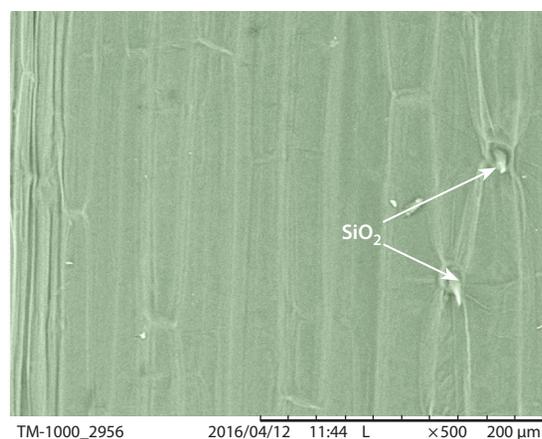
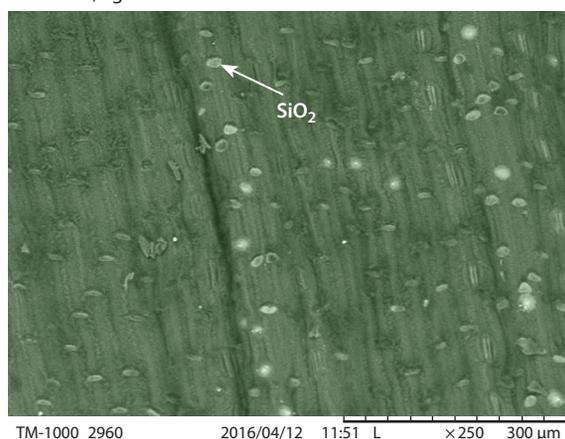
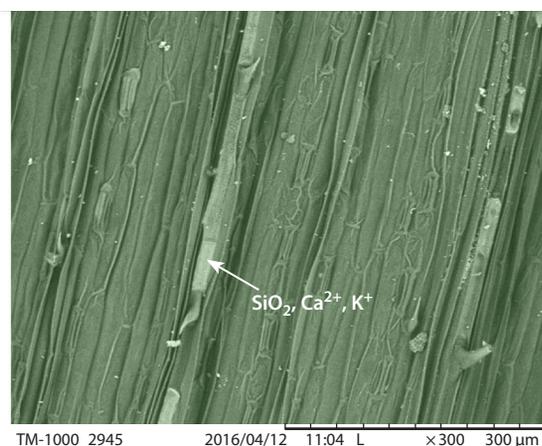
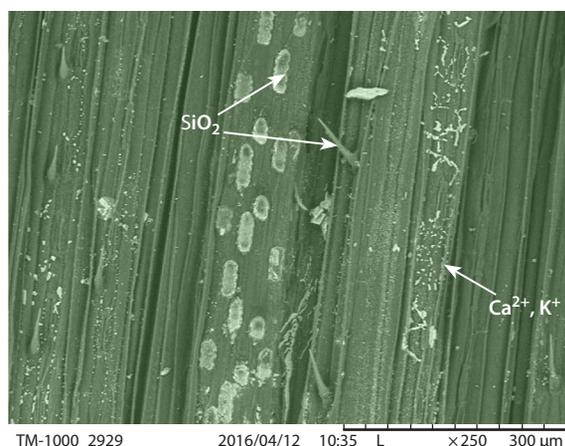


Fig. 1. Isozyme patterns of CAD1 in samples 3-4-14-3 (lanes 1–5) and 3-13-15-4 (lanes 6–10).

3-13-15-4, light leaf



3-13-15-4, dark leaf



3-4-14-3

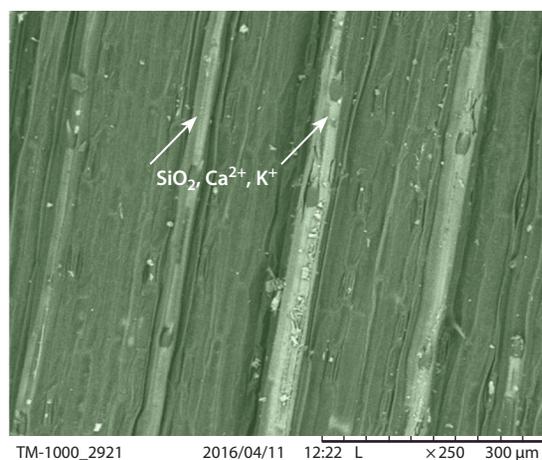
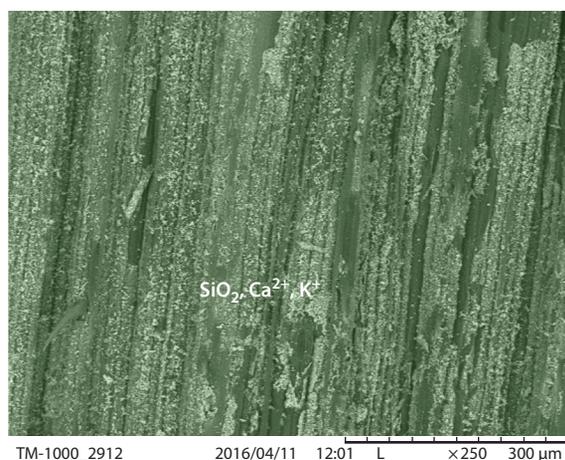


Fig. 2. SEM images and X-ray analysis of the leaf sheet surface in common wheat accessions studied.

Исследование листовой пластинки под электронным микроскопом выявило различия в распределении неорганических веществ на ее поверхности (рис. 2). Поверхность более светлых листьев генотипа 3-13-15-4 равномерно покрыта мелкими папиллами оксида кремния (кремнезема) размером 10–15 мкм. На обратной стороне листа выделяются папиллы в виде шипов, поверхность которых

тоже состоит из оксида кремния. Красно-коричневые листья генотипа 3-13-15-4 покрыты рядами более крупных кремнеземных папилл вытянутой формы, достигающих в длину 50 мкм. Поверхность между рядами кремнеземных образований покрыта солями кальция и калия, на ней выделяются шипы, также из кремнезема. Обратная сторона листа покрыта полосами минеральных веществ,

Table 1. Fraction composition (%) of common wheat accessions studied

Fraction	Sample 3-4-14-3	Sample 3-13-15-4
Humidity	3.7	3.6
Extractives	17.7	17.5
Klason lignin	12.3 (10.5 without ash)	14.2 (10.2 without ash)
Klason lignin (SiO ₂)	14.7	28.2
Acid-soluble lignin	2.5	2.5
Ash (600 °C)	19.8	20.0
Ash (900 °C)	14.17	16.11
Elemental analysis, %:		
C	38.41 ± 0.02	38.1 ± 0.2
H	5.00 ± 0.2	5.04 ± 0.08
N	1.19 ± 0.04	1.29 ± 0.04

Table 2. Relative contents of dioxane lignin substructures according to ¹H и ¹³C 2D NMR

Substructure	Genotype	
	3-4-14-3	3-13-15-4
Percentages of bond types between phenylpropane monomers		
β-O-4' Aryl ether (A)	82.88	85.14
α-Oxidized β-O-4' aryl ether (A _{ox})	–	0.72
Phenylcoumarans (B)	10.78	9.61
Resinols (C)	5.50	4.49
Dibenzodioxocins (D)	0.59	0.26
α,β-Diaryl ethers (E)	0.01	0.26
Spirodienones (F)	0.24	0.25
Total, %	100	100
End groups of lignin macromolecules ¹		
Cinnamyl alcohol end groups (I)	1.17	1.15
Cinnamaldehyde end groups (J)	0.53	0.31
Aromatic links ²		
<i>n</i> -Hydroxyphenyls (H), %	3.25	6.04
Guaiacyls (G), %	45.67	43.25
Syringyls (S), %	51.09	50.72
S : G ratio	1.12	1.17
<i>n</i> -Hydroxycinnamates ³		
<i>n</i> -Coumarates (PCA), %	6.98	23.14
Ferulates (FA), %	19.24	9.67
PCA : FA ratio	0.36	2.39

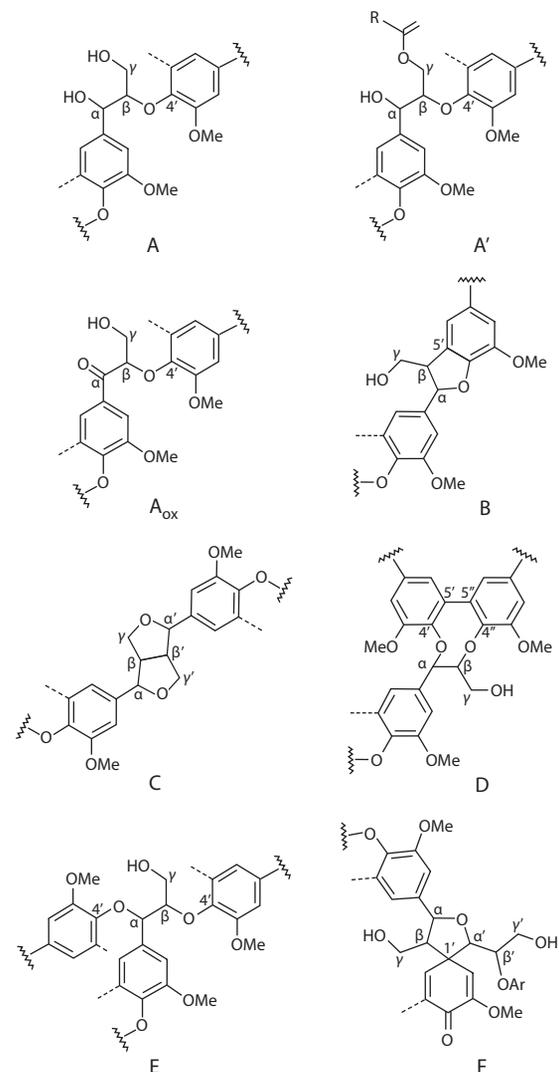
¹ Fraction of the total amount of types A–F lignin bonds; ² molar percentage; ³ integral molar content as percentage of lignin content.

состоящих из соединений кремния, калия, кальция и магния.

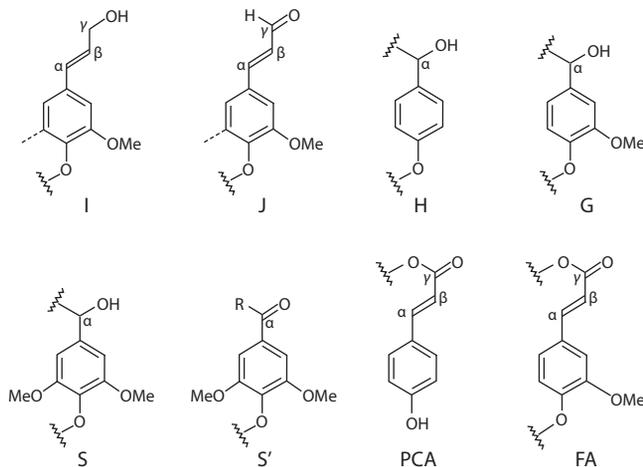
В отличие от этого образца, поверхность листа менее устойчивого генотипа 3-4-14-3 явно выраженных папилл не имеет и покрыта соединениями кремния, калия и кальция. Обратная сторона листа по своей морфологии похожа на поверхность красно-коричневого листа более устойчивого генотипа 3-13-15-4.

Химический анализ состава основных компонентов клеточной стенки показал различия по содержанию лигнина в листьях и по его зольности (табл. 1). Остальные компоненты присутствуют в сопоставимых количествах.

Структура диоксан-лигнинов, выделенных из листьев пшеницы разных генотипов, была охарактеризована методом двумерной ЯМР-спектроскопии (табл. 2).



По полученным данным, содержание β-O-4' арилэфирных (A), фенилкумарановых (B), пинорезинольных (C) и спиродиеноновых (F) фрагментов практически одинаковое в лигнинах пшеницы обоих генотипов. В лигнине генотипа, устойчивого к листовой ржавчине, присутствуют типы связывания через α-окисленный β-O-4' арилэфир (A_{ox}) и α,β-диарилы эфиры (E).



В структуре лигнина генотипа 3-4-14-3 содержится больше концевых альдегидных групп (J), тогда как содержание спиртовых (I) концевых групп одинаково для обоих генотипов. Соотношение гваяцильных (G) и сирингильных (S) звеньев в образцах диоксан-лигнинов одинаково. Значительные различия наблюдаются в содержании *n*-кумаратов (PCA) и ферулатов (FA). Первые преобладают в структуре лигнина генотипа 3-13-15-4, вторые – в генотипе 3-4-14-3. Высокое содержание *n*-кумаратов в лигнине устойчивого генотипа согласуется с повышенным содержанием *n*-гидроксифенильных звеньев (H), образующихся непосредственно из *n*-кумаровой кислоты.

Обсуждение

Механизмы защитных реакций у растений многообразны и могут выражаться как в морфологических и микроморфологических (анатомических) особенностях, так и в биохимическом воздействии на патоген. Нами обнаружены различия по степени минерализации поверхности листовой пластинки у мягкой пшеницы, а также по содержанию в тканях продуктов фенилпропаноидного пути метаболизма. Возможно, эти различия связаны с различиями в изоферментном составе NADP-CAD (НАДФ-зависимая CAD; NADP – кофактор никотинамидадениндинуклеотид фосфат, окисленная форма), который считается одним из ключевых ферментов фенилпропаноидного пути (Коновалов и др., 2015).

Полиморфные варианты NADP-CAD оказывают существенное влияние на свойства тканей злаков (Гончаров и др., 2012; Коновалов и др., 2014, 2016; Kononov et al., 2016). Это может быть обусловлено различиями по субстратной специфичности отдельных изоферментов NADP-CAD, которые обнаружены при очистке этого фермента у пшеницы и ее сородичей (Pillonel et al., 1992).

По общему содержанию лигнина образцы 3-4-14-3 и 3-13-15-4 различаются незначительно (12.3 и 14.2 % соответственно), однако более устойчивый образец содержит в лигнине повышенное содержание *n*-гидроксифенильных звеньев. Выраженные различия наблюдаются по содержанию *n*-гидроксициннаматов, ткани листа у образца 3-13-15-4 содержат большое количество *n*-кумаратов, при этом понижено содержание соединений с альдегидной группой C = O.

Фенольные соединения в тканях растений накапливаются, как правило, в гликозидной форме, однако непосредственно в районе гаусторий гриба фенолы обнаруживаются в виде агликонов (т. е. свободных фенолов), в котором они более токсичны (Benhamou, Bélanger, 1998). Гидролиз фенольных гликозидов с высвобождением молекулярных фенолов может быть спровоцирован какими-то веществами-элиситорами самих грибов.

При отсутствии антоцианов различия по окраске могут быть вызваны изменением химического состава лигнина. Для многих растений описаны мутантные генотипы CAD (как природные, так и искусственно полученные), у которых изменение в химическом составе мономеров привело к появлению характерной красновато-коричневой окраски тканей (Коновалов и др., 2015).

Поражение клеток пшеницы стеблевой ржавчиной (возбудитель *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) обуславливает усиление ультрафиолетовой флюоресценции пораженных участков тканей и изменение биохимической структуры лигнина (Moerschbacher et al., 1990; Menden et al., 2007). Ингибиторы CAD усиливали защитное действие. Вероятно, поражение листовой ржавчиной (возбудитель *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) приводит к сходным защитным процессам.

На поверхности листовой пластинки более устойчивого образца присутствуют минеральные образования, состоящие преимущественно из кремнезема SiO₂, который может представлять собой механическое препятствие для распространения гифов гриба. В золе лигнина устойчивого образца также содержится намного больше SiO₂ (см. табл. 1).

Связь между метаболизмом кремния и фенолов ранее отмечали многие исследователи (Fauteux et al., 2005). Одним из вероятных механизмов может быть влияние соединений кремния на активность ферментов, задействованных в защитных реакциях. Обработка растворами, содержащими кремний (силикат кальция, 300 г/м²), увеличила устойчивость растений пшеницы к мучнистой росе (Bélanger et al., 2003). Кроме того, обработка кремнием вызвала сильное увеличение отложения фенолов в эпидермальных клетках. Кремниевые соединения играют пассивную роль, образуя вместе с полифенолами более прочные покровы листа, однако авторы считают более вероятным, что кремний откладывается именно в местах проникновения гаусторий, т. е. играет активную протекторную роль. Возможным механизмом является сродство соединений кремния в форме гидрооксидов Si(OH)₄ к органическим полигидроксильным соединениям, участвующим в синтезе лигнина (Bélanger et al., 2003).

Обнаруженный нами тип повышенной устойчивости примерно соответствует типу устойчивости, обозначенному в научной литературе как «нехозяйская устойчивость» (nonhost resistance) (Чесноков, 2007), который раньше называли горизонтальной (неспецифической). В отличие от вертикальной устойчивости типа «ген-на-ген» (gene-for-gene resistance), в формировании неспецифической устойчивости вовлечены обычные гены метаболизма. Можно предположить, что к таковым относятся ген *CAD1*, задействованный в метаболизме фенилпропаноидов, или сцепленные с ним гены. Дальнейшие исследования позво-

ляг очертить круг факторов, вовлеченных в формирование устойчивости растений к грибным инфекциям.

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в качественном и количественном составе ароматических соединений в тканях листьев пшеницы, а также в степени минерализации поверхности листовой пластинки. На основании этих результатов можно предположить, что определенные соотношения рассматриваемых веществ оказывают влияние на устойчивость растений пшеницы к грибной инфекции. Выделенные генотипы предполагается использовать для изучения возможных механизмов устойчивости.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0005.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bagniewska-Zadworna A., Barakat A., Lakomy P., Smoliński D.J., Zardworny M. Lignin and lignans in plant defence: insight from expression profiling of cinnamyl alcohol dehydrogenase genes during development and following fungal infection in *Populus*. *Plant Sci.* 2014;229:111-121. DOI 10.1016/j.plantsci.2014.08.015.
- Barber M.S., McConnell V.S., De Caux B.S. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochemistry.* 2000;54(1):53-56. PMID: 10846747.
- Bélanger R.R., Benhamou N., Menzies J.G. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). *Phytopathology.* 2003;93(4):402-412. DOI 10.1094/PHYTO.2003.93.4.402.
- Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M.F., Mérillon J.M. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(24):9119-9125.
- Belyaev D.K. (Ed.) *Genetika izofermentov* [The Genetics of Isoenzymes]. Novosibirsk: Nauka Publ., 1977. (in Russian)
- Bely V.A., Alekseev I.N., Sadykov R.A. Study of the chemical structure of lignins from golden root (*Rhodiola rosea* L.) and crowned saw-wort (*Serratula coronata* L.) by 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Izvestiya Komi nauchnogo tsentra UrO RAN = Proceedings of the Komi Research Center.* 2012;3(11):20-26. (in Russian)
- Benhamou N., Bélanger R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: Ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant J.* 1998;14(1):13-21. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1998.00088.x.
- Chesnokov Yu. V. Pathogen resistance in plants of plants (review of foreign literature). *Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology.* 2007;1:16-35. (in Russian)
- del Río J.C., Rencoret J., Prinsen P., Martínez Á.T., Ralph J., Gutiérrez A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60(23):5922-5935. DOI 10.1021/jf301002n.
- Fauteux F., Rémus-Borel W., Menzies J.G., Bélanger R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005;249(1):1-6. DOI 10.1016/j.femsle.2005.06.034.
- Gaskell J., Marty A., Mozuch M., Kersten P.J., BonDurant S.S., Sabat G., Azarpira A., Ralph J., Skyba O., Mansfield S.D., Blanchette R.A., Cullen D. Influence of *Populus* genotype on gene expression by the wood decay fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80(18):5828-5835. DOI 10.1128/AEM.01604-14.
- Goncharov N.P., Kononov A.A., Moiseeva E.A. Influence of short-term vernalization on the expression of the *Aadh1-Spn* gene and the growth habit of plants in hybrids of rye *Secale cereale* L. to *S. montanum* Guss. *Sibirskiy vestnik selskokhozyaystvennoy nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences.* 2012;5:19-25. (in Russian)
- Hano C., Addi M., Bensaddek L., Cronier D., Baltora-Rosset S., Dousot J., Maury S., Mesnard F., Chabbert B., Hawkins S., Laine E., Lamblin F. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta.* 2006;223:975-989.
- 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. S.J. O'Brien (Ed.). N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1993;6:204-6.219.
- Hijweggen T. Lignification, a possible mechanism of active resistance against pathogens. *Neth. J. Plant Pathol.* 1963;69:314-317.
- Kononov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V. Polymorphism of lignification enzymes in plants: Functional importance and applied aspects. *Biology Bulletin Reviews.* 2016;6(2):149-163.
- Kononov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Goncharov N.P., Kondratenko E.Ya. Chromosomal localization of aromatic alcohol dehydrogenase fast-migrating isoenzyme *Aadh1F* (*CAD1F*) gene in *Triticum aestivum* L. bread wheat. *Russian Journal of Genetics.* 2016;52(10):1110-1116.
- Kononov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Nefedov A.A., Goncharov N.P. Inheritance and phenotype expression of functional and null alleles of aromatic alcohol dehydrogenase (CAD) in diploid wheats. *Russian Journal of Genetics.* 2014;50(11):1161-1168.
- Kononov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Orlova E.A., Goncharov N.P. Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance of bread wheat plants to a brown rust. *Plant Genetics and Genomics for Food Security. The 1st Int. Workshop: Abstract Book.* Novosibirsk, Russia, Aug. 26–28. Novosibirsk, 2016;27.
- Kumar S., Röder M.S., Kumar S., Singh R.P., Joshi A.K., Kumar U. Mapping of spot blotch disease resistance using NDVI as substitute to visual observation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetics and Genomics for Food Security. The 1st Int. Workshop: Abstract Book.* Novosibirsk, Russia, Aug. 26–28. Novosibirsk, 2016;32.
- Leonova I.N., Roder M.S., Kalinina N.P., Budashkina E.B. The genetic analysis and localization of the loci controlling the resistance of *Triticum aestivum* × *T. timopheevii* introgression lines to leaf rust. *Genetika = Genetics (Moscow).* 2008;44(12):1652-1659. (in Russian)
- Li X., Ma D., Chen J., Pu G., Ji Y., Lei C., Du Z., Liu B., Ye H., Wang H. Biochemical characterization and identification of a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. *Plant Sci.* 2012;193-194:85-95. DOI 10.1016/j.plantsci.2012.05.011.
- McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Anderson O.D. Catalogue of gene symbols for wheat: Supplement. *Annual Wheat Newsletter.* 2005;51:251-285.
- Menden B., Kohlhoff M., Moerschbacher B.M. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry.* 2007;68(4):513-520.
- 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;104(2):551-556.
- Moerschbacher B.M., Noll U., Gorrichon L., Reisener H.J. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol.* 1990;93(2):465-470. PMID: 16667489.
- Pillon C., Hunziker P., Binder A. Multiple forms of the constitutive wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase. *J. Exp. Bot.* 1992;43(248): 299-305.
- Radchenko E.E. (Ed.) *Izucheniye geneticheskikh resursov zernovykh kultur po ustoychivosti k vrednym organizmam: metodicheskoe posobie* [Study of Genetic Resources for Pest Resistance in Grain Crops: Methodical Handbook]. Moscow: Rosselkhozakademiya Publ., 2008. (in Russian).
- Simons L., Bultman T.L., Sullivan T.J. Effects of methyl jasmonate and an endophytic fungus on plant resistance to insect herbivores. *J. Chem. Ecology.* 2008;34:1511-1517.

- Somssich I.E., Wernert P., Kiedrowski S., Hahlbrock K. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP⁺ oxidoreductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:14199-14203.
- Tronchet M., Balagué C., Kroj T., Jouanin L., Roby D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant Pathology. 2010;11:83-92. DOI 10.1111/j.1364-3703.2009.00578.x.
- Varbanova M., Porter K., Lu F., Ralph J., Hammerschmidt R., Jones A.D., Day B. Molecular and biochemical basis for stress-induced accumulation of free and bound *p*-coumaraldehyde in cucumber. Plant Physiol. 2011;157(3):1056-1066. DOI 10.1104/pp.111.184358.
- Zaprometov M.N. Fenolnye soedineniya: rasprostraneniye, metabolizm i funktsii v rasteniyakh [Phenolic Compounds: Distribution, Metabolism, and Functions in Plants]. Moscow: Nauka Publ., 1993. (in Russian)