

УДК 633.14: 631.572-026.565: 543.429.23: 547.992.3

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТЕБЛЯ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.) СО СТЕКЛОВИДНОЙ СОЛОМИНОЙ

© 2013 г. А.А. Коновалов¹, И.К. Шундрин², Е.В. Карпова², В.И. Маматюк²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: konov@bionet.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 апреля 2013 г. Принята к публикации 17 мая 2013 г.

При проведении генетического анализа ржи по признаку «стекловидная соломина» получены сестринские растения с нормальной и стекловидной соломиной. Стебли растений изучены по химическому составу, спектроскопическим показателям и механической прочности. Обнаружены различия между растениями с разными типами соломины по ряду показателей, таких, как содержание ароматических мономеров лигнина и соотношение различных типов химических связей.

Соломины нормальной и стекловидной ржи при одинаковом диаметре различаются по модулю упругости и пределу упругой деформации. Установлено, что стебли мутантных растений при боковой нагрузке разрушаются по хрупкому механизму, а нормальные – по пластическому. При этом пределы упругой деформации и прочность существенно выше для нормальных растений.

Методами ядерного магнитного резонанса обнаружены различия в химической структуре лигнинов: по содержанию альдегидных и метоксильных групп, общей ароматичности, по количеству простых эфирных связей, которыми лигниновые блоки связаны с полисахаридными фрагментами клеточных стенок.

Более высокое содержание лигнина у мутанта не приводит к увеличению механической прочности соломины. Напротив, наблюдаются снижение пределов упругой деформации и увеличение ломкости побегов. Вероятно, мутация *bs*, кроме прямого действия (стекловидность соломины), вызывает разбалансированность метаболических процессов при формировании вторичных клеточных стенок и приводит к отклонению от оптимального соотношения углеводных и лигниновых компонентов. Обнаруженные различия по ряду показателей могут быть использованы в селекционных исследованиях, связанных с хозяйственно значимыми признаками стеблей злаков.

Ключевые слова: рожь, стекловидная соломина, механические свойства, лигнин, химическая структура, протонный магнитный резонанс, ядерный магнитный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Свойства стеблей (соломин) злаков, в первую очередь их длина и прочность, являются объектами селекции по ряду признаков. Оба эти показателя определяют устойчивость злаковых культур к полеганию. Некоторые другие показатели, такие, как толщина стенок, диаметр, длина междоузлий, состав и структура тканей соломины, подвергаются косвенному отбору в

связи с селекцией на продуктивность, неполегаемость, а также устойчивость к ряду грибных инфекций, известных под общим названием «ржавчина».

Механические свойства стеблей злаков обусловлены химическим составом и структурой биополимеров, из которых формируются стенки тканей соломины. Соотношение основных компонентов клеточных стенок – целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина – не является един-

ственным фактором, определяющим физические свойства тканей. Большое значение имеют структура биополимеров, тип химических связей составляющих их мономеров и особенности связей между разными компонентами (Бардинская, 1964; Лигнины ..., 1975; Запрометов, 1993; Далимова, Абдуазимов, 1994; Калабин и др., 2000; Рабинович и др., 2001; Шарова, 2004; Горшкова, 2007).

Описан ряд генов, оказывающих прямое или косвенное влияние на состав и структуру тканей, формирующих цветonoсный побег.

Наиболее существенное влияние оказывают гены, вызывающие ломкость (хрупкость) стебля, описанные у ряда видов злаков: кукурузы (Sindhu *et al.*, 2007), ячменя (Kokubo *et al.*, 1989; Burton *et al.*, 2010), риса (Doat, Marie, 1977; Monties *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986), диплоидной пшеницы *Triticum monococcum* (Ansari *et al.*, 2012).

У ржи неоднократно обнаруживали растения с ломкой («стекловидной») соломиной (Davison *et al.*, 1924; Антропов, Антропова, 1929; Sybenga, Prakken, 1962; Суриков, Романова, 1982; Vries, Sybenga, 1984; Смирнов, Соснихина, 1984; Культурная флора СССР, 1989). Данный признак обозначали *b* или *br* (brittle), а также *bs* (brittle straw). В книге «Генетика ржи» (Смирнов, Соснихина, 1984) приведено обозначение *fr* (fragile) как ломкость стебля и колоса. Признак наследуется как рецессивный и моногенный (Davison *et al.*, 1924; Sybenga, Prakken, 1962; Суриков, Романова, 1982; Vries, Sybenga, 1984; Смирнов, Соснихина, 1984). Ген *b* (*br* или *bs*) находится на коротком плече хромосомы 5R (Schlegel, Melz, 1993). Мутанты из разных источников на аллелизм не проверялись.

Ранее мы установили взаимное расположение генов в хромосоме 5 ржи (Коновалов и др., 2008, 2010). Ген стекловидности соломины *bs* сцеплен с двумя ферментными локусами ароматической алкогольдегидрогеназы (*Aadh1*) и шикиматдегидрогеназы (*Skdh*) и не сцеплен с основным геном яровости–озимости *Vrn1*, расположенным на дистальном конце длинного плеча той же хромосомы 5. Стекловидность наследовалась как моногенный рецессивный признак.

Использование мутантных генотипов по тем или иным метаболическим реакциям является

в настоящее время классическим подходом в изучении биосинтетических путей в живых организмах, в частности при изучении влияния процесса лигнификации на состав, структуру и свойства вторичных клеточных стенок растений (Горшкова, 2007).

В настоящее время в литературе имеется мало физико-химических данных для объяснения прочности стеблей злаковых культур. У злаков ломкость стебля исследована с генетической точки зрения на примере кукурузы, риса и ячменя. Показано, что существует корреляция между концентрацией лигнина и целлюлозы и механическими свойствами стебля (Nagao, Takahashi, 1963; Doat, Marie, 1977; Morrison, 1980; Monties *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986).

Ранее мы провели детальный анализ пяти показателей прочности соломины (модуль упругости, предел упругой деформации, величина упругой деформации, предельная нагрузка и величина необратимой деформации) и обнаружили существенные различия между нормальными и мутантными растениями (Коновалов и др., 2013). Кроме того, были обнаружены различия по коррелятивным связям между динамическими параметрами у мутантных и нормальных растений.

В этом исследовании механические показатели были сопоставлены с данными о химической природе лигнина и его состава в тканях нормальных и мутантных растений, определенными с помощью методов протонного и ядерного резонанса, а также с помощью инфракрасной спектроскопии и гистохимического окрашивания срезов тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили яровые растения ржи со стекловидной и нормальной соломиной (рис. 1). Мутантная форма со стекловидной соломиной (brittle stem) была получена из потомств F₂ озимой ржи к-11511 *bs bs* (образец ВИР от профессора В.Д. Кобылянского) скрещиванием с нормальными растениями ++ из ярового сорта Онохойская.

Содержание лигнина Класона в стеблях ржи определяли сернокислотным методом (Оболенская и др., 1965). Препараты лигнинов выделяли из предварительно обессмоленной

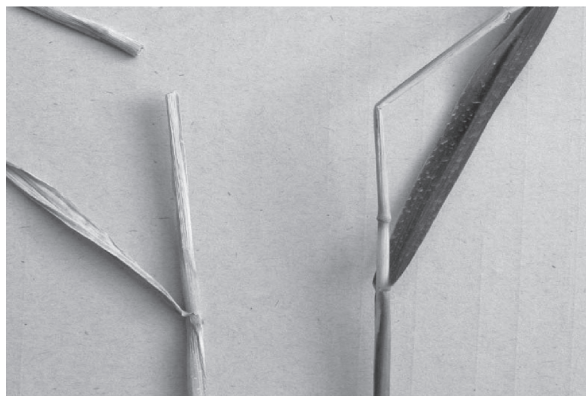


Рис. 1. Ломкостебельная (стекловидная) рожь *brittle stem* (слева) и норма (справа).

соломы путем обработки в течение 2 ч водным диоксаном в присутствии HCl (0,7 %) при температуре кипения (Чудаков, 1996).

Элементный анализ выполнен на CHN-анализаторе Evrovector EA 3000. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C препаратов лигнина в растворе DMCO-d_6 регистрировали на спектрометре DRX-500 (Bruker) с рабочей частотой 500 МГц при 52 °C. Отнесение отдельных диапазонов химических сдвигов в спектрах проведено в соответствии с (Калабин и др., 2000). Диаграммы нагрузки–деформации для соломин (3-го и 4-го междоузлий) регистрировались на динамическом механическом анализаторе DMA 242C Netzsh (Германия) в режиме развертки по деформации. Используемый вид деформации – трехточечный изгиб, частота – 1 Гц.

Микрофотографии поперечных срезов стеблей получали на сканирующем электронном микроскопе TM-1000 (Hitachi) и оптическом конфокальном микроскопе BX51M (Olympus). Для идентификации (визуализации распределения) лигнина в растительных тканях проводили обработку срезов реагентом Визнера (Уайз, 1959).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Механические свойства – это совокупность показателей, характеризующих сопротивление материала воздействующей на них нагрузке. Из полученных диаграмм нагрузки–деформации были определены такие важные физико-механические показатели, как: предел упругости–максимальная нагрузка, при которой материал испытывает только упругую деформацию

($F_{\text{упр}}$), и предел прочности–максимальная нагрузка, которую выдерживает образец до разрушения (F_p).

На рис. 2 показаны типичные диаграммы нагрузки–деформации для нескольких образцов ломкой и неломкой ржи. Механические свойства определяли для третьего и четвертого междоузлий, которые испытывают максимальный изгибающий момент при деформации стебля. Диаметры стеблей нормальной и мутантной ржи соответственно равны $1,81 \pm 0,46$ и $1,84 \pm 0,38$ и достоверно не различаются. При сравнении диаграмм для ломкой и неломкой ржи видно, что для прогиба соломин неломкой ржи на ту же величину деформации требуются более высокие значения силы. Кроме того, вид зависимостей нагрузки–деформации позволяет определить, по какому механизму, хрупкому или пластическому, происходит разрушение материала. Диаграммы нагрузки–деформации для ломкой ржи соответствуют хрупкому разрушению образца, при котором наблюдаются только упругие деформации (зависимость между нагрузкой и деформацией носит линейный характер до начала разрушения). Для стеблей ржи-нормы разрушение носит пластический характер.

На рис. 3 приведены средние значения предела упругой деформации ($F_{\text{упр}}$) и предела прочности (F_p). По величинам этих показателей рожь-норма значительно превосходит рожь bs.

В ряде работ низкие показатели механических свойств для мутантов злаковых культур с ломким стеблем связывают со структурой клеточных стенок, их химическим составом и длиной волокон (Doat, Marie, 1977; Morrison, 1980; Monties *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986). Для того чтобы понять механизм, который контролирует механическую прочность стеблей, был проведен морфологический и гистохимический анализы поперечных срезов стеблей с реактивом Визнера, дающим с лигнином красное окрашивание. Интенсивность окраски примерно отражает общее содержание лигнина. На микрофотографиях срезов нормальной и ломкой ржи видны отличия в строении ткани стебля (рис. 4). Толщина клеточной стенки склеренхимы нормальной соломины составила $4,364 \pm 0,809$ мкм, стекловидной соломины – $0,762 \pm 0,098$ мкм.

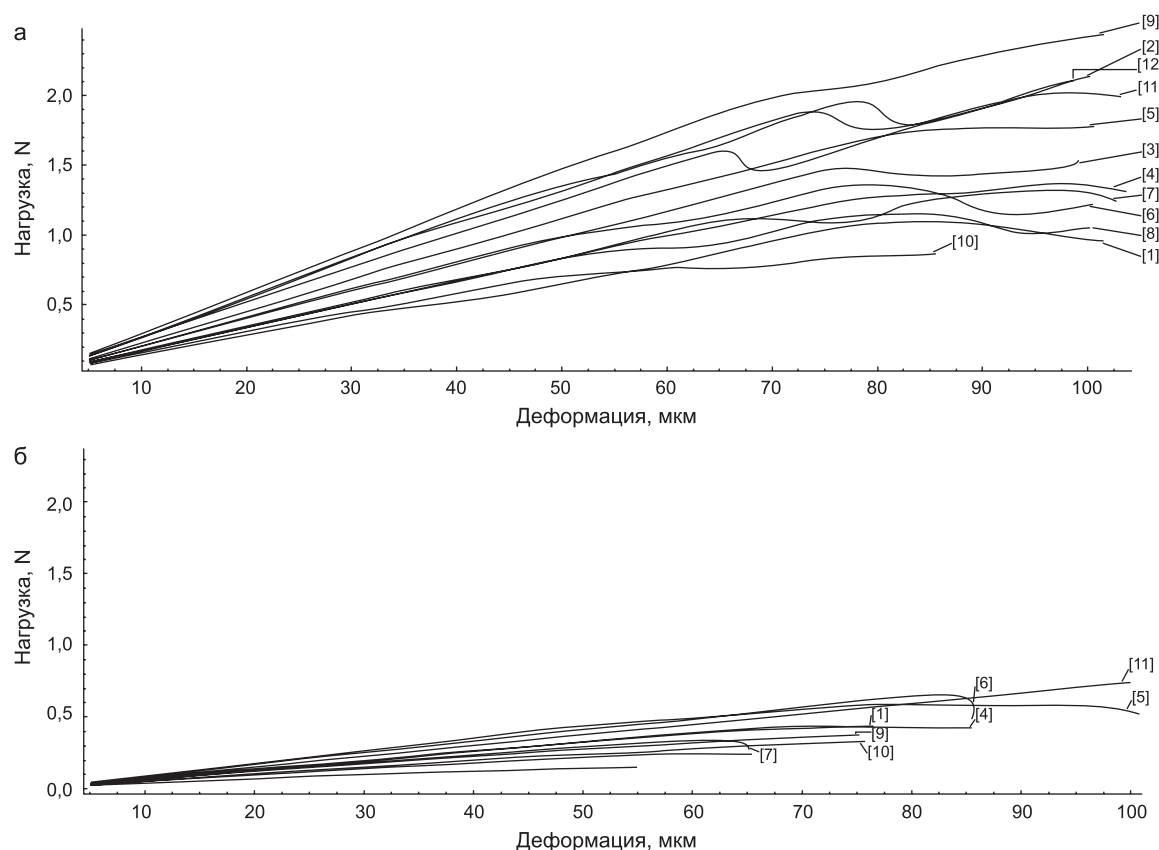


Рис. 2. Диаграммы нагрузки–деформации 3-го междоузлия стеблей ржи.

а – рожь-норма; б – рожь ломкая.

Уменьшение толщины клеточной стенки склеренхимы для мутантов с ломким стеблем по сравнению с нормальными растениями отмечалось в ряде работ на примере таких злаков, как рис, рожь, ячмень. При этом существенных отличий в значениях внутреннего и внешнего диаметров стебля для ломких и нормальных растений выявлено не было. На микрофотографиях также прослеживаются отличия в локализации лигнина в срезах стеблей нормальной и мутантной форм ржи. Большая интенсивность и площадь окрашивания в красный цвет тканей стекловидной ржи указывает на большее

в ней процентное содержание лигнина, чем в нормальной ржи. В стеблях ржи-нормы лигнин в основном сосредоточен в межклеточном веществе, первичной и третичной клеточных стенках. Морфологические особенности внедрения лигнина в полисахаридный каркас клеточной стенки в нормальных и мутантных растениях могут быть связаны с различиями в процессах биосинтеза самого лигнина и целлюлозы.

Нарушение процесса биосинтеза лигнина в мутантных растениях по сравнению с нормой может приводить к изменению как его количественного содержания в тканях, так и его хими-

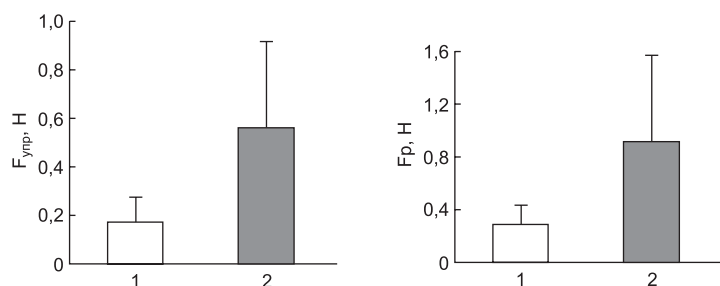


Рис. 3. Предел упругой деформации $F_{\text{упр}}$ и предел прочности F_p для соломин ржи мутанта (1) и нормы (2).

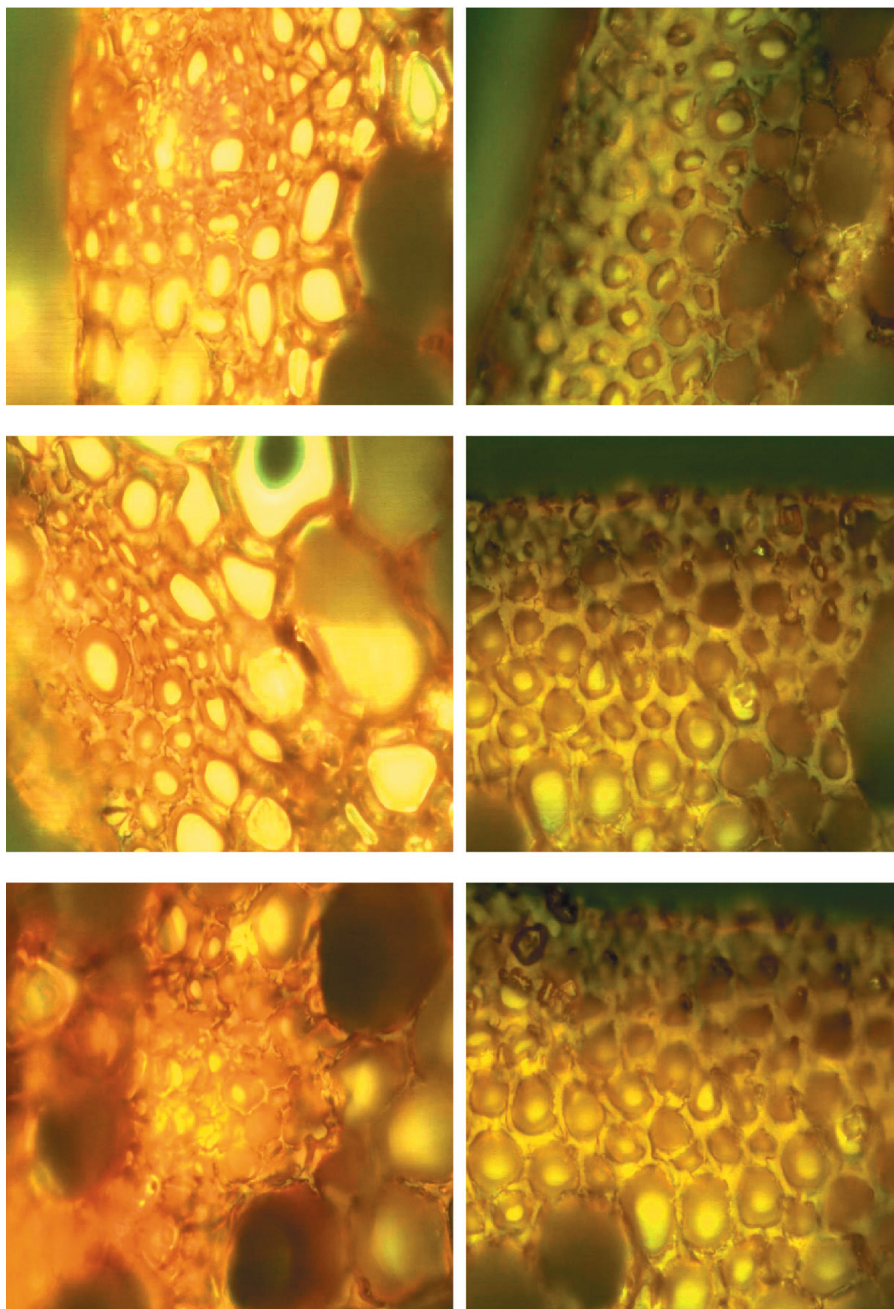


Рис. 4. Срезы стекловидной и нормальной соломин ржи, окрашенные реактивом Визнера.

Слева *bs bs*, справа – норма. Толщина срезов 30 мкм.

ческого состава. Содержание лигнина Класона в стеблях сравниваемых растений составило 21,2 % для нормы и 30,9 % для мутантной формы, что соответствует гистохимическому анализу поперечных срезов с пробой Визнера. Ломкие мутанты диплоидной пшеницы также имели повышенное содержание лигнина (Ansari *et al.*, 2012). В работе Девисона с соавторами отмечено пониженное содержание лигнина у

ломких растений ржи, однако точное количественное определение не проводилось, вывод сделан на основе окраски срезов (Davison *et al.*, 1924). Возможно, мутанты, использованные в этой работе и в настоящем исследовании, неаллельны.

Для проведения химического анализа из растений были выделены препараты диоксан-лигнина (ДЛ), структура которых практически

Таблица 1
Элементный состав
препаратов диоксан-лигнина (%)

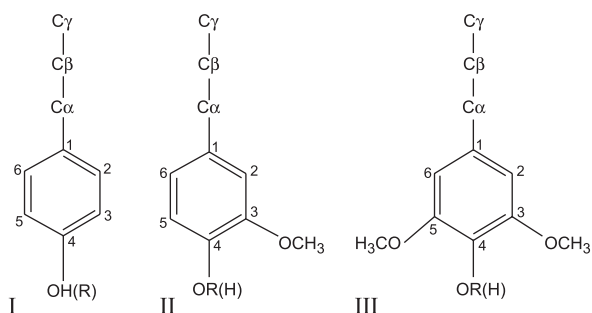
Химические элементы	Норма	<i>bs bs</i>
C	58,05	58,13
H	5,58	5,56
N	0,64	0,66
O	35,73	35,65

не меняется в процессе выделения. Препараты диоксан-лигнинов из нормальных (ДЛНР) и мутантных растений (ДЛМР) практически не отличались по элементному составу (табл. 1).

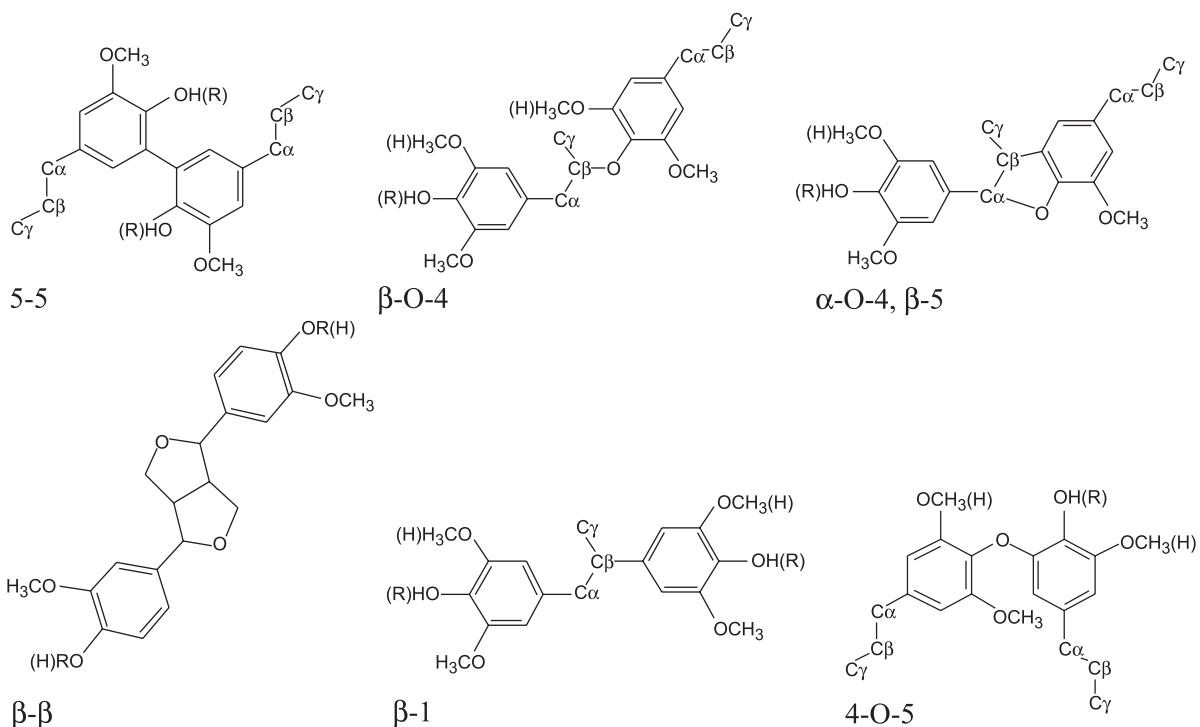
Различия в химической структуре диоксан-лигнинов были исследованы спектральными методами анализа.

Лигнин представляет собой полифенольный разветвленный полимер, не имеющий регулярного чередования повторяющихся единиц в отличие от целлюлозы. Это значительно затрудняет исследование его структуры и определение точного химического состава.

В структуре лигнина выделяют оксифенильные (I), гваяцильные (II) и сиригильные фрагменты (III) (Рабинович и др., 2001):



Биосинтез в растениях п-гидроксикоричных спиртов (п-кумарового, кониферилowego, синяпового), которые, соответственно, и образуют в структуре лигнина фрагменты I–III, контролируется целым рядом ферментов, от активности которых зависит химический состав лигнина. Установлено, что фенилпропановые звенья на первой стадии полимеризации образуют между собой следующие структурные фрагменты лигнина (дилигнолы), дальнейшая полимеризация которых приводит к образованию разветвленного полимера:



Сравнение структуры лигнинов проводят по содержанию функциональных групп, соотношению фенолпропановых единиц, типам и частоте связей между структурными единицами и т. д.

Сам процесс полимеризации является спонтанным (неферментативным), однако происходит при участии так называемых «дирижирующих белков» (dirigent proteins), которые определяют структуру химических связей между мономерами.

ми (Davin, Lewis, 2000; Burlat *et al.*, 2001). Эти белки – гликопротеиды – открыты сравнительно недавно и механизм их действия до конца не изучен.

Структурные фрагменты лигнина и их относительное содержание определялись по спектрам ПМР и ^{13}C ЯМР в растворе ДМСО- d_6 (табл. 2, 3). Результаты анализа приведены в виде относительного содержания атомов углерода определяемого структурного элемента $p_x = I_x / I_{\text{общ}}$ для ^{13}C ЯМР-спектров и в виде доли атомов водорода в определяемой функциональной группе $-(\text{C}=\text{O})\text{OH}$, $-(\text{C}=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(\text{OH})$ $q_x = I_x / I_{\text{общ}}$ для ПМР-спектров, а также в пересчете на одно ароматическое кольцо $n_x = p_x \times 6 / f_a$, где $f_a = I_{\text{ар}} / I_{\text{общ}}$ – ароматичность препарата лигнина, рассчитанная с учетом интенсивностей сигналов олефиновых фрагментов в диапазоне 162–103 м.д., 6 – число атомов углерода в ароматическом кольце).

Анализ данных, приведенных в табл. 2, 3, показывает, что лигнины растений с ломким и нормальным стеблем имеют существенные различия в своей структуре. ДЛНР (табл. 2) содержит больше свободных карбоксильных, альдегидных групп и свободных гидроксильных групп при С-4-углеродном атоме аромати-

ческого кольца всех типов. Низкая доля атомов водорода ОН-групп, дающих резонансные сигналы в области 9,3–8,4 м.д., может быть следствием замещения этого типа атомов в результате образования простых эфирных связей в сирингильных и связанных гваяцильных звеньях. Атом углерода в γ -положении к ароматическому кольцу в ДЛНР не окислен, т. е. находится преимущественно в форме CH_2 -, CH_2 -групп, тогда как в ДЛНР этот атом углерода находится в форме карбонильной $\text{C}=\text{O}$ и карбоксильной COOH групп. Отличия в типах связей алифатической части лигнина отмечены в диапазоне 2–4 м.д. ПМР-спектров.

Содержание ароматических фрагментов в сравниваемых препаратах ДЛ (табл. 3) существенно отличаются – общая ароматичность (f_a , %, доля атомов углерода, входящих в ароматические фрагменты макромолекулы) для ДЛНР составляет ~ 50 %, у нормальной ~ 23 %. Различия в ароматичности возможны из-за разной длины боковой цепи в лигнинах, определяющейся как сумма алифатических и олефиновых атомов углерода, а также карбонильных и карбоксильных групп. Свой вклад в уменьшение общей ароматичности ДЛНР вносит высокое содержание связанных углеводов – 36 % (в ДЛНР ~ 3,4 %)

Таблица 2

Распределение атомов водорода по функциональным группам и структурным фрагментам макромолекулы лигнина соломы ржи по спектрам ПМР

Диапазон δ ^1H (м.д.)	Отнесение	q_x bs bs	q_x норма
14,0–12,0	$\text{H}_{(\text{C}=\text{O})\text{OH}}$ – ОН карбоксильных групп	0,0236	0,0259
9,7–9	$\text{H}_{(\text{C}=\text{O})\text{H}}$ – Н альдегидных групп	0,0052	0,0069
12,4–9,3	$\text{H}_{\text{ОНфен}}$ – ОН при С-4 в гваяцильных и гидроксифенильных фрагментах	0,0305	0,0399
9,3–8,4	$\text{H}_{\text{ОНфен}}$ – ОН при С-4 в сирингильных звеньях, гваяцильных звеньях с 5–5 и β -5 связями	0,0003	0,0035
8,4–6,3	$\text{H}_{\text{ар}}$ – атомы водорода ароматических колец	0,1832	0,1780
6,3–2,9	$\text{H}_{\text{О-ал}}$ – CH_2 -, CHO -, CH_2O -, CH_3O – группы в α , β , γ -положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов	0,6832	0,6925
2,3–0,3	$\text{H}_{\alpha,\beta,\gamma}$ – CH_2 -, CH_3 – группы в α , β , γ -положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов	0,1816	0,1930
4,0–3,37	H – CH_3O , $\text{C}_{\beta,\gamma}\text{H-OH}$ CH_3O – группы в ароматическом кольце, CH_2 -, CH_3 - в β и γ -положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов	0,3376	0,3893
3,37–2,9	$\text{C}_{\gamma}\text{H-OH}$ – CH_2 -, CH_2 - в γ -положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов	0,1621	0,1314

Таблица 3

Параметры фрагментарного состава диоксанлигнинов из ЯМР-спектров ^{13}C

Диапазон	Отнесение	p_x bs bs	p_x норма	n_x bs bs	n_x норма
220–190	C=O кетонов	0,028	0,198	0,336	5,193
210–185	(C=O)H альдегидов	0,032	0,168	0,384	4,392
185–163,5	C=O(O) карбоксильные и сложноэфирные	0,025	0,137	0,299	3,593
163,6–156	C-4 в гидроксифенильных фрагментах, C-2/C-4, C-6 в 2,4,6-тригидроксифенилпропановых звеньях	0,010	0,044	0,124	1,157
156–120	CH=CH в связях Ar-CH=CH-R	0,205	0,146	2,436	3,822
117–112,8	C-5 в гваяцильных, C-3/C-5 в гидроксифенильных звеньях	0,100	0,002	1,194	0,065
112,8–108	C-2 в гваяцильных звеньях	0,036	0,019	0,423	0,509
108–104	C-2/C-6 в сиригильных звеньях (в том числе при кето-группе в α -положении к АК)	0,080	0,004	0,950	0,108
104–102,5	C-2/C-6 в сиригильных звеньях	0,054	0,001	0,647	0,038
90–78	C $_{\alpha,\beta}$ при α -O-4, β -O-4	0,013	0,063	0,160	1,655
80–67	C $_{\alpha,\beta}$ -ОН	0,036	0,063	0,434	1,653
74–64	C $_{\gamma}$ в CH $_2$ -O-R, CH $_2$ -ОН	0,036	0,047	0,429	1,225
58–54	метоксильные группы	0,218	0,028	2,597	0,724
54–52	C $_{\beta}$ в β - β	0,001	0,011	0,014	0,276
54–50	C $_{\beta}$ в β -5	0,013	0,024	0,157	0,626
35–5	CH, CH $_2$, CH $_3$ алифатические	0,208	0,144	2,479	3,779
102,6–95	углеводы	0,005	0,050		
93–80	α -O-4, β -O-4	0,004	0,076	0,043	1,981
220–186	C=O альдегиды и кетоны	0,029	0,225	0,346	5,901
	ароматичность (степень ароматичности лигнина) f_a	0,505	0,229		

в пересчете на ксиланы (по резонансным сигналам в области 102,6–95 м.д.), что говорит о более прочных и многочисленных лигно-углеводных связях в соломе ржи-нормы.

В макромолекуле ДЛНР высоко содержание карбонильных, карбоксильных и сложноэфирных групп, дающих резонансные сигналы в области 220–163,5 м.д. (примерно в 10 раз выше, чем у ржи ломкой). Нормальные растения содержат больше альдегид-содержащих фрагментов в структуре лигнина. Повышенное содержание альдегидных групп во фрагментах лигнина наблюдалось в трансгенных растениях с пониженной активностью фермента CAD (дегидрогеназа коричневого спирта), которая контролирует конечную стадию образования монолигнолов – восстановление ароматических альдегидов до соответствующих спиртов (Halpin *et al.*, 1994).

Содержание метоксильных групп выше в препарате ДЛНР – 2,6 на АК, в препарате ДЛНР – ~0,7, что косвенно указывает на большее содержание сиригильных фрагментов в лигнине ржи ломкой. Содержание олефиновых фрагментов в боковой цепи в препаратах примерно одинаково.

Меньшее количество фрагментов C $_{\alpha,\beta}$ -ОН, C $_{\alpha,\beta}$ при α -O-4-, β -O-4-связывании, C $_{\beta}$ в β - β - и в β -5-связывании в ДЛНР говорит о том, что в этом лигнине углеродные атомы в α - и β -положениях к ароматическому кольцу находятся в составе кето-групп или CH $_2$ -групп.

C-атомы в γ -положениях к ароматическому кольцу в ДЛНР преимущественно окислены до карбонильных и карбоксильных групп, в ДЛНР – в виде CH $_2$ -O-групп, что подтверждают спектры ПМР.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы попытались исследовать причины хрупкости стеблей двух генотипов ржи. Установлено, что стебли мутантных растений при изгибе разрушаются по хрупкому механизму, а нормальные – по пластическому. При этом пределы упругой деформации и прочность существенно выше для нормальных растений. Низкие показатели механических свойств у мутанта могут коррелировать с уменьшенной толщиной клеточной стенки склеренхимы и повышенным содержанием лигнина. Полученные нами выводы подтверждаются и результатами других авторов, что указывает на общий механизм контроля механических свойств стеблей злаков.

Различия резонансного сигнала по атому водорода у четвертого углеродного атома ароматического кольца свидетельствуют о разном количестве простых эфирных связей, которыми лигниновые блоки связаны с полисахаридными фрагментами клеточных стенок. Различия по содержанию связанных углеводов свидетельствуют о том же – уменьшении количества лигнин-углеводных связей у стекловидного мутанта, что, вероятно, сказывается на механической прочности.

Лигнин мутантных растений содержит больше метоксильных групп, что свидетельствует о более высоком содержании сиригильных компонентов лигнина.

При одинаковом диаметре соломины нормальной и мутантной ржи различаются по модулю упругости и пределу упругой деформации.

Спектральные исследования лигнинов, выделенных из нормальных и мутантных растений, позволили выявить существенные различия в их структуре, связанные с содержанием функциональных групп и структурных фрагментов. Более высокое содержание лигнина у мутанта не приводит к увеличению механической прочности соломины. Напротив, наблюдается снижение пределов упругой деформации и увеличение ломкости побегов. Вероятно, мутация *bs* кроме прямого действия (стекловидность соломины) вызывает разбалансированность метаболических процессов при формировании вторичных клеточных стенок и приводит к отклонению от оптимального соотношения углеводных и ароматических компонентов.

Различия в структуре лигнинов могут быть связаны с особенностями протекания биосинтеза лигнина у нормальных и мутантных растений и активностью ферментов, контролирующих этот процесс. Высокое содержание связанных углеводов в структуре лигнина из нормальных растений указывает на формирование более прочных и многочисленных лигно-углеводных связей, которые также могут вносить свой вклад в снижение хрупкости стеблей. Прочность стеблей злаков, как следует из наших результатов и из сопоставления их с данными по другим видам, определяется не столько соотношением углеводных и ароматических компонентов клеточных стенок, сколько их составом, структурой химических связей и распределением компонентов в различных типах тканей, образующих стебель. Вероятно, к хрупкости тканей стебля могут приводить мутации в разных локусах, что подтверждается данными по другим видам злаков.

Обнаруженные различия по ряду показателей могут быть использованы в селекционных исследованиях, связанных с хозяйственно значимыми признаками стеблей злаков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Н.П. Гончарову за помощь при проведении исследований и оформлении рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

- Антропов В.И., Антропова В.Ф. Рожь СССР и сопредельных стран. Л., 1929. 189 с.
- Бардинская М.С. Растительные клеточные стенки и их образование. М.: Наука, 1964. 160 с.
- Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 430 с.
- Далимова Г.Н., Абдуазимов Х.А. Лигнины травянистых растений // Химия природных соединений. 1994. № 2. С. 160–177.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
- Коновалов А.А., Моисеева Е.А., Гончаров Н.П. Анализ наследования и сцепления некоторых признаков в хромосоме 5R у ржи *Secale cereale* L. // Селекция 21 века: новейшие технологии, достижения и перспективы. Харьков, 2008. С. 106–112.

- Коновалов А.А., Моисеева Е.А., Гончаров Н.П., Кондраченко Е.Я. Порядок расположения генов *bs*, *Skdh* и *Aadh1* в хромосоме 5R ржи *Secale cereale* L. // Генетика. 2010. Т. 46. № 6. С. 758–763.
- Коновалов А.А., Шундрин И.К., Маматюк В.И., Гончаров Н.П. Изучение прочности соломины у ржи *Secale cereale* L. методом динамического механического анализа // Докл. РАСХН. 2013. № 5. (В печати).
- Культурная флора СССР. Т. 2. Ч. 1. Рожь / Под ред. В.Д. Кобылянского. Л.: Агропромиздат, 1989. 368 с.
- Лигнины. (Структура, свойства и реакции) / Под ред. К. Сарканена и Людвиг. М.: Лесн. пром-сть, 1975. 630 с. (Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions / Eds K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig. Wiley Interscience. N.Y. a.o., 1971).
- Оболенская А.В., Щеголев В.П., Аким Г.Л. и др. Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Лесн. пром-сть, 1965. С. 85.
- Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондраченко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
- Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Генетика ржи. Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. 264 с.
- Суриков И.М., Романова Н.П. Тесное сцепление гена стекловидной соломины с геном самонесовместимости у ржи // Бюл. ВИР. 1982. Вып. 122. С. 67–71.
- Уайз Л.Э., Джан Э.С. Химия древесины / Под ред. Б.Д. Богомолова. Пер. с англ. М.; Л., 1959. Т. 1. С. 351.
- Чудаков М.И. Исследование процессов конденсации и окислительно-гидролитического расщепления гидролизного лигнина // Тр. ВНИИГС. 1966. Вып. 15. С. 285–290.
- Шарова Е.И. Клеточная стенка растений. СПб.: Изд-во СПбУ, 2004. 156 с.
- Ansari M.J., Kumar R., Singh K., Dhaliwal H.S. Characterization and molecular mapping of EMS-induced brittle culm mutants of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) // Euphytica. 2012. V. 186. P. 165–176.
- Burlat V., Kwon M., Davin L.B., Lewis N.G. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues // Phytochemistry. 2001. V. 57. No. 6. P. 883–897.
- Burton R.A., Ma G., Baumann U. *et al.* A customized gene expression microarray reveals that the brittle stem phenotype fs2 of barley is attributable to a retroelement in the HvCesA4 cellulose synthase gene1 // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 1716–1728.
- Davin B.L., Lewis N.G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis // Plant Physiol. 2000. V. 123. No. 2. P. 453–462.
- Davison F.R., Brewbacer H.E., Thompson N.A. Brittle straw and other abnormalities in rye // J. Agric. Res. 1924. V. 28. No. 2. P. 169–172.
- Doat J., Marie R. Analyse d'un mutant a tige cassante radio-induit chez le Riz, *Oryza sativa* L. // Ann. Amelior. Plantes. 1977. V. 27. P. 705–715.
- Halpin C., Knight M.E., Foxon G.A. *et al.* Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase // Plant J. 1994. V. 6. No. 3. P. 339–350.
- Kokubo A., Kuraishi S., Sakurai N. Culm strength of barley1 correlation among maximum bending stress, cell wall dimensions, and cellulose content // Plant Physiol. 1989. V. 91. P. 876–882.
- Morrison I.M. Changes in the lignin and hemicellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity // Grass Forage Sci. 1980. V. 35. P. 287–293.
- Monties B., Mestres C., Baghdadi K. Chemical and physical properties of a brittle culm lignin rich mutant of rice // Intern. Symp. On Wood and Pulping Chemistry. Stockholm, 1981. V. 5. P. 40–43.
- Nagao S., Takahashi M. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice. Genetical studies on rice plant // J. Fac. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo, 1963. V. 53. P. 72–130.
- Schlegel R., Melz G. Genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.) // Genetic maps. 6 ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1993. P. 6.235–6.255.
- Sharma U., Brillouet J.-M., Scalbert A., Monties B. Studies on a brittle stem mutant of rice, *Oryza sativa* L.; characterization of lignin fractions, associated phenolic acids and polysaccharides from rice stem // Agronomie. 1986. V. 6. P. 265–271.
- Sindhu A., Langewisch T., Olek A. *et al.* Maize *Brittle stalk2* encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity // Plant Physiol. 2007. V. 145. No. 4. P. 1444–1459.
- Sybenga J., Prakken R. Gene analysis in rye // Genetica. 1962. V. 33. No. 2. P. 95–105.
- Vries J.N. de, Sybenga J. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set // J. Plant Breed. 1984. V. 92. No. 2. P. 117–139.

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CULMS IN RYE (*SECALE CEREALE* L.) WITH A BRITTLE STEM

A.A. Konovalov¹, I.K. Shundrina², E.V. Karpova², V.I. Mamatyuk²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: konov@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Test crosses of rye for the brittle stem character yielded sibs plants with normal and brittle culms. The stems were studied with regard to chemical composition, spectroscopic features and mechanical strength. The normal and fragile culms differed in the content of aromatic lignin monomers and the ratio of various types of chemical bonds.

At equal thicknesses, the normal and mutant rye plants differed in the modulus of elasticity and proportional limit. It was found that lateral load breaks stems of mutant plants by the brittle fracture mechanism, and normal plants, by ductile fracture. The normal plants had much higher proportional limits and mechanical strength values.

By means of NMR method differences were found in the lignin chemical structure, such as the content of aldehyde and methoxyl groups, total aromaticity and the number of ether bonds, by which lignin blocks are linked to carbohydrate fragments of cellular walls.

The higher lignin content in the mutant does not improve culm mechanical strength. On the contrary, a decrease in proportional limit and increase in shoot brittleness are observed. Possibly, the *bs* mutation, in addition to its direct action (culm brittleness) unbalances metabolic processes when forming secondary cellular walls and leads to a deviation from the optimum ratio of carbohydrate and aromatic components. The differences in a number of indicators can be used in breeding programs concerning agricultural traits of stems in cereals.

Key words: rye, brittle stem, mechanical properties, lignin, chemical structure, proton magnetic resonance, nuclear magnetic resonance.