

ГХ-МС исследование липофильных компонентов в листьях *Triticum aestivum* L.

Васильева А.Р.^{1, 2*}, Слынько Н.М.^{1, 2}, Гончаров Н.П.¹, Татарова Л.Е.^{1, 2}, Куйбида Л.В.³, Пельтек С.Е.^{1, 2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Курчатowski геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск, Россия

* vasilieva@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; ГХ-МС; полиморфизм; хемотаксономия; метаболизм

Мотивация и цель: Пшеница *Triticum aestivum* L. принадлежит к числу основных зерновых культур на земном шаре. Количество сортов и подвидов пшеницы огромно и продолжает увеличиваться. Метаболические исследования позволяют глубже понять фенотипическое разнообразие внутривидового полиморфизма *T. aestivum* и являются ключевыми в хемотаксономической классификации и идентификации видов и подвидов на основе их химического состава. Определение химического состава липофильных метаболитов в экстрактах зеленых листьев даст возможность установить взаимосвязи как внутри отдельных метаболических путей, так и между этими конкретными путями. Реализация такого сравнительного изучения на широкой выборке сортов и подвидов *T. aestivum* является целью данного исследования.

Методы и алгоритмы: Изучена коллекция 30 сортообразцов пшеницы из коллекции сектора генетики пшениц ИЦиГ СО РАН: гексаплоидной (мягкой *T. aestivum* и ее подвида *T. aestivum* ssp. *petropavlovskyi* N.P. Gontsch.), тетраплоидной (*T. carthagicum* Nevski № 21, 24) и диплоидной (*T. monococcum* L. № 26, 27). Для аннотирования соединений брались данные, полученные на системах: Pegasus 4D GCxGC–TOF MS (включает Agilent Technologies 7890B) и хроматограф Agilent Technologies 6890 с масс-спектрофотометрическим детектором 5973. Для визуализации различий между исследуемыми экстрактами листьев разных сортов пшеницы был использован иерархический кластерный анализ. Для более полного охвата и глубокого анализа изучаемых процессов применяли подходы многомерного анализа, в частности метод главных компонент (PCA).

Результаты: В результате интерпретации данных на основе анализа масс-спектров было определено, что наибольшим содержанием в большинстве экстрактов обладают алифатические спирты линейного строения и их производные. Углеводороды, как линейные, так и разветвленные, определены в диапазоне C10–C40, среди линейных преобладают C29, C31. Всего идентифицировано 16 насыщенных алифатических кислот, 5 их эфиров, 5 ненасыщенных кислот, 6 их эфиров, 2 лактона. Алифатические альдегиды и кетоны представлены 14 линейными насыщенными и 5 ненасыщенными альдегидами, 4 линейными и 2 кетонами с разветвленным строением, 4-Гидроxy-2-butanone, а также тремя β- и одним γ-дикетонами. Hentriacontane-14,16-dione и его гидроксипроизводное, согласно литературным данным, являются фактором осизости листьев пшеницы. Производные изопрена, обнаруженные на хроматограммах образцов, включают:

монотерпены (11) и образующиеся из них в растении цимолы (2), дитерпены (17), сесквитерпен (1), стероиды и их производные (13), а также их предшественники (2). К этой же группе относятся идентифицированные соединения, включающие в структуру полипреновый фрагмент: витамин Е, токоферолы α , γ , их эфиры, токоспиро А и Б, а также 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide. Кроме того, на хроматограммах определены Geranylacetone, Farnesylacetone, Geranylinalool. Ароматические соединения, идентифицированные в экстрактах: фенолы (13) и их производные (5), бензойная кислота и ее производные (3), ароматические системы, сопряженные с карбонильной группой (5) или с двойной связью (3), конденсированные системы (5). Кроме того, на хроматограммах обнаружен Benzeneacetaldehyde. Пики в масс-спектрах с индексами Ковача 2043, 2267, 2367, 2467, 2667, 2767, 2863 программой AMDIS, LECO ChromaTOF определяются либо как N-этиламиды, либо как N,N-диметиламины тетрадекановой, гексадекановой, гептадекановой, октадекановой, эйкозановой, генэйкозановой и докозановой кислот соответственно. Дополнительные исследования утверждают структуру N-этиламидов жирных кислот.

Данные о метаболическом синтезе N-этиламидов жирных кислот отсутствуют. Можно предположить, что этот процесс включает в себя следующие стадии: 1 – взаимодействие соответствующей будущему амиду жирной кислоты с ацетил-КоА, протекающее с расходом АТФ; 2 – реакция активированной кислоты с аланином с образованием N-ацилаланина жирной кислоты; 3 – реакция с участием фермента декарбоксилазы и пиридоксаль-5'-фосфата с образованием N-этиламида.

Расчет по методу PCA с использованием всех идентифицированных соединений позволил выделить несколько кластеров с возможным хемотаксономическим сходством (рис. 1). Образцы с преобладающим содержанием октакозанола можно выделить в отдельную группу, расположенную в зоне отрицательных значений PC1 (кластер 1), в отличие от образцов с преобладанием октакозанола и ацетатов фитола (кластер 2). Отдельно расположены образцы с преобладанием алкиламинов жирных кислот (кластер 3).

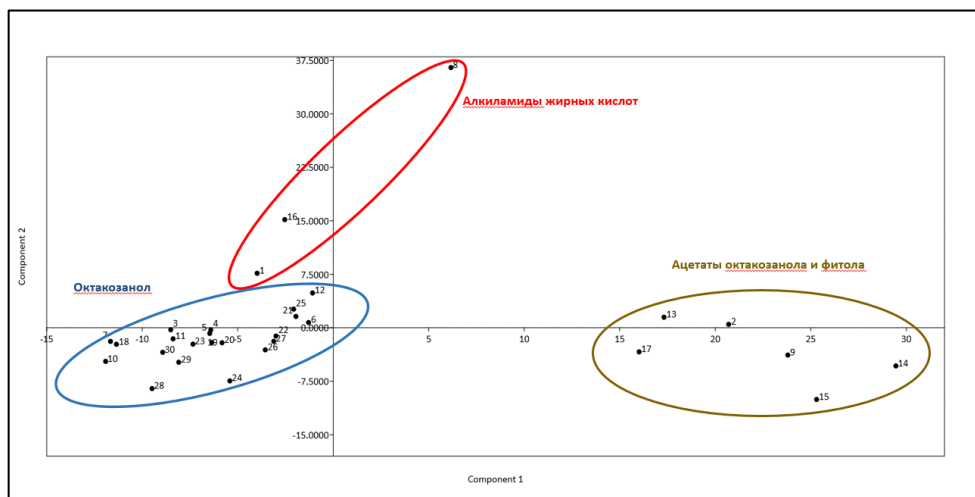


Рис. 1. Биплоты PCA на основе всех идентифицированных соединений в 30 сортах пшеницы. Внутренняя таблица содержит собственные значения и процент изменчивости для первых двух главных компонент

Ацилирование алифатических спиртов, преобладающих в кластере 1, в ацетаты (основные компоненты кластера 2) предположительно происходит в ответ на изменение влажности окружающей среды. Это ацилирование блокирует гидрофильные фрагменты алифатических спиртов, тем самым придавая кутикуле гидрофобные свойства. В результате эта модификация препятствует проникновению избыточной влаги в лист.

Выводы: В результате исследования составов липофильных фракций экстрактов листьев 30 сортов *Triticum aestivum* отмечено наличие хемотаксономической полиморфности.

Специфическими маркерами этих полиморфизмов являются: октакозанол, преобладающий в экстрактах большей части исследованных сортов, а также N-этиламиды жирных кислот, β -дикетоны и ацетаты октакозанолола и фитола.

Впервые обнаруженные в большом количестве в части экстрактов образцов N-этиламиды жирных кислот могут играть важную роль в адаптации растений к абиотическим стрессам.

Корреляций между составом кутикулы и географическим происхождением не обнаружено.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по гранту № ФВНР-2022-0022 в Федеральном исследовательском центре ИЦиГ СО РАН и в рамках программы ICIG SB RAS Core Facility of Proteomic and metabolomic profiling of microorganisms (поддержана проектом № 075-15-2019-1662).

A GC-MS chemotaxonomic study on lipophilic compounds in the leaves of *Triticum aestivum* L.

Vasilieva A.R.^{1, 2*}, Slynko N.M.^{1, 2}, Goncharov N.P.¹, Tatarova L.E.^{1, 2}, Kuibida L.V.³, Peltek S.E.^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* vasilieva@bionet.nsc.ru

Key words: *Triticum aestivum*; GC-MS; polymorphism; chemotaxonomy; metabolism

Motivation and Aim: Wheat *Triticum aestivum* L. is one of the major cereal crops on the globe. The number of wheat varieties and subspecies is enormous and continues to increase. Metabolic studies provide a deeper understanding of phenotypic diversity within the species polymorphism of *T. aestivum* and are key to chemotaxonomic classification and identification of species and subspecies based on their chemical composition. Determination of the chemical composition of lipophilic metabolites in green leaf extracts will provide an opportunity to establish relationships both within individual metabolic pathways and between these specific pathways. The realization of such a comparative study on a wide sample of *T. aestivum* cultivars and subspecies is the aim of this study.

Methods and Algorithms: A collection of 30 hexa- soft (*T. aestivum*) and its subspecies *T. aestivum* ssp. *petropavlovskiy* N.P. Gontsch., tetra- (*T. cartholicum* Nevski) No. 21, 24 and diploid (*T. monococcum* L.) No. 26, 27 wheat from the collection of the wheat

genetics sector of ICIG SB RAS was studied. For annotation of compounds, data were taken on the following systems: Pegasus 4D GCxGC-TOF MS (includes Agilent Technologies 7890B) and Agilent Technologies 6890 chromatograph with 5973 mass spectrophotometric detector. Hierarchical cluster analysis was used to visualize the differences between the studied leaf extracts of different wheat cultivars. For a more comprehensive coverage and in-depth analysis of the studied processes, we used multivariate analysis approaches, in particular, the principal component analysis (PCA) method.

Results: As a result of data interpretation on the basis of mass spectra analysis it was determined that aliphatic alcohols of linear structure and their derivatives have the highest content in the majority of extracts. Hydrocarbons, both linear and branched, were identified in the range C10–C40, among the linear ones C29, C31 predominate. A total of 16 saturated aliphatic acids, 5 of their esters, 5 unsaturated acids, 6 of their esters, and 2 lactones were identified. Aliphatic aldehydes and ketones are represented by 14 linear saturated and 5 unsaturated aldehydes, 4 linear and 2 branched ketones, 4-Hydroxy-2-butanone, and three β - and one γ -diketones. Hentriacontane-14,16-dione and its hydroxy derivative are reported in the literature to be a factor in wheat leaf ossification. Isoprene derivatives detected in the chromatograms of the samples include: monoterpenes (11) and cymols formed from them in the plant (2), diterpenes (17), sesquiterpenes (1), steroids and their derivatives (13), and their precursors (2). Identified compounds that include a polyprenoid fragment in their structure belong to the same group: vitamin E, tocopherols α , γ , their esters, tocospiro A and B, and 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide. In addition, Geranylacetone, Farnesylacetone, and Geranylinalool were identified in the chromatograms. Aromatic compounds identified in the extracts: phenols (13) and their derivatives (5), benzoic acid and its derivatives (3), aromatic systems conjugated to a carbonyl group (5) or to a double bond (3), condensed systems (5). In addition, Benzeneacetaldehyde was detected in the chromatograms. Peaks in mass spectra with Kovacs indices 2043, 2267, 2367, 2467, 2667, 2767, 2863 by the AMDIS, LECO ChromaTOF program are identified as either N-ethylamides or N,N-dimethylamides of tetradecanoic, hexadecanoic, heptadecanoic, octadecanoic, eicosanoic, genecosanoic and docosanoic acids respectively. Additional studies validate the structure of N-ethylamides of fatty acids.

No data are available on the metabolic synthesis of N-ethylamides of fatty acids. It can be assumed that this process involves the following steps: 1 – interaction of the fatty acid corresponding to the future amide with acetyl-CoA, proceeding with the consumption of ATP, 2 – reaction of the activated acid with alanine, with the formation of N-acylalanine fatty acid, 3 – reaction with the participation of decarboxylase enzyme and pyridoxal-5'-phosphate with the formation of N-ethylamide.

The PCA calculation using all the identified compounds allowed us to identify several clusters with possible chemotaxonomic similarities (Fig. 1). Samples with a predominant octacosanol content can be identified in a separate group located in the zone of negative PC1 values (cluster 1), in contrast to samples with a predominant octacosanol and phytol acetates (cluster 2). The samples with a predominance of fatty acid alkylamides (cluster 3) are located separately.

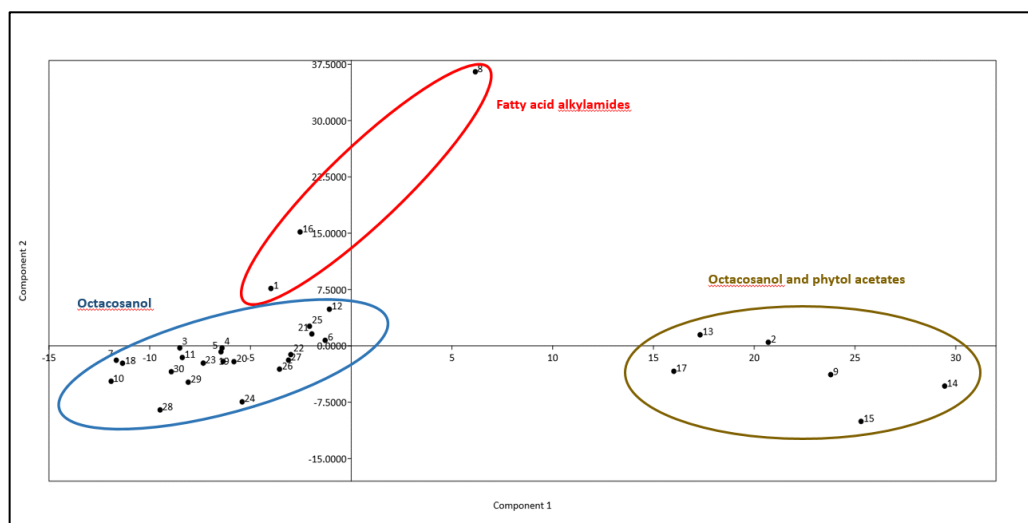


Fig. 1. PCA biplots based on all identified compounds in 30 wheat cultivars. The inner table contains the eigenvalues and percentage of variability for the first two principal components

Acylation of aliphatic alcohols, which are predominant in Cluster 1, into acetates (the primary components of Cluster 2) presumably occurs in response to changes in environmental humidity. This acylation blocks the hydrophilic fragments of the aliphatic alcohols, thereby imparting hydrophobic properties to the cuticle. As a result, this modification prevents excessive moisture from penetrating the leaf.

Conclusion: The study of compositions of lipophilic fractions of leaf extracts of 30 varieties of *Triticum aestivum* resulted in the presence of chemotaxonomic polymorphism.

Specific markers of these polymorphisms are: octacosanol, prevailing in the extracts of most of the studied varieties, as well as N-ethylamides of fatty acids, β -diketones and acetates of octacosanol and phytol.

N-ethylamides of fatty acids detected for the first time in large amounts in part of the sample extracts may play an important role in plant adaptation to abiotic stresses.

No correlations were found between cuticle composition and geographical origin.

Funding: The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under grant No. FVNR-2022-0022 at the Federal Research Center ICG SB RAS and under the ICG SB RAS Core Facility of Proteomic and metabolomic profiling of microorganisms (supported by project No. 075-15-2019-1662).