

Влияние ограниченных интрогрессий от *Triticum timopheevii* Tausch. в геном мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на физиологические и биохимические признаки в условиях полива и засухи

Т.А. Пшеничникова¹, А.В. Пермяков², С.В. Осипова^{2, 4}, М.Д. Пермякова², Е.Г. Рудиковская², В.В. Верхотуров³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Иркутск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет», Иркутск, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Межвидовая гибридизация у злаков используется как для сравнительного изучения строения и эволюции геномов, так и для извлечения из дикого генофонда полезных для селекции генов. Тетраплоидный вид пшеницы *Triticum timopheevii* давно используется как источник генов устойчивости к грибным болезням. Линия 821, созданная на генетическом фоне засухоустойчивого, но чувствительного к болезням сорта яровой пшеницы Саратовская 29 (С29), несет от этого вида интрогрессии в хромосомы 2А, 2В и в субтеломерный район длинного плеча хромосомы 5А. Два генотипа сравнили по параметрам, связанным с прямой и непрямой реакцией фотосинтетического аппарата на водный стресс. По сравнению с исходным сортом С29 во флаговых листьях линии 821 наблюдали повышенную скорость транспирации и устьичную проводимость (примерно в 4 раза в оптимальных и в 1,3 раза в воддефицитных условиях) и, соответственно, пониженную эффективность использования воды (в 1,6 раз в оптимальных и в 1,2 раза в воддефицитных условиях). Кроме того, в условиях водного стресса у линии 821 были снижены содержание хлорофиллов и каротиноидов, реальная эффективность фотосинтеза, скорость транспорта электронов в фотосистеме II, общая антиоксидантная способность (примерно в 3 раза) и повышена активность липоксигеназы (в 2 раза). В целом устойчивость к дефициту воды у линии снизилась по сравнению с родительским сортом, что сопровождалось подвяданием листьев. Таким образом, можно предположить, что хромосомы 2А, 2В и 5А засухоустойчивого сорта пшеницы С29 несут важные генетические факторы, контролирующие в растениях реакцию на водный стресс.

Ключевые слова: мягкая пшеница; *Triticum timopheevii*; интрогрессии; фотосинтез; флюоресценция хлорофилла; содержание пигментов в листе; активность антиоксидантных ферментов; засухоустойчивость.

Effects of limited introgressions from *Triticum timopheevii* Tausch. into the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on physiological and biochemical traits under normal watering and drought

T.A. Pshenichnikova¹, A.V. Permyakov², S.V. Osipova^{2, 4}, M.D. Permyakova², E.G. Rudikovskaya², V.V. Verchoturov³

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

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

³ National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk, Russia

⁴ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Alien hybridization in cereals is used for comparative investigations of genome structure and evolution as well as for extracting useful genes from the wild gene pool. The tetraploid species *Triticum timopheevii* has long been used as a source of genes for resistance to fungal diseases. Line 821 was developed on the genetic background of cultivar Saratovskaya 29 (S29), which is drought-resistant but is very susceptible to diseases and carries big introgressions in 2A and 2B chromosomes and a small introgression in the subtelomeric region of 5A chromosome. The two genotypes were compared for the parameters associated with direct and indirect reaction of the photosynthetic apparatus to water stress. In flag leaves of 821 line, an increased transpiration rate and stomatal conductance (1.6 times the value in optimal watering and 1.2 times the value under water deficit) and, correspondingly, reduced water use efficiency were found compared to the initial cultivar. Additionally, the actual effectiveness and electron transport rate of photosystem II and chlorophyll and carotenoid content were reduced as well as the total antioxidant capacity (approximately three-fold) under

water stress. Under the same conditions, lipoxygenase activity was increased two-fold. On the whole, water deficit tolerance was decreased in the line in comparison with the parental cultivar and was accompanied by leaf senescence. Thus, it may be supposed that 2A, 2B and 5A chromosomes of the drought-tolerant cultivar S29 carry important genetic factors responsible for reaction to water stress in wheat plants.

Key words: bread wheat; *Triticum timopheevii*; introgressions; photosynthesis; chlorophyll fluorescence; pigment content in leaf; antioxidant enzyme activity; drought tolerance.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Пшеничникова Т.А., Пермяков А.В., Осипова С.В., Пермякова М.Д., Рудиковская Е.Г., Верхотуров В.В. Влияние ограниченных интрогрессий от *Triticum timopheevii* Tausch. в геном мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на физиологические и биохимические признаки в условиях полива и засухи. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):574-580. DOI 10.18699/VJ15.074

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Pshenichnikova T.A., Permyakov A.V., Osipova S.V., Permyakova M.D., Rudikovskaya E.G., Verchoturov V.V. Effects of limited introgressions from *Triticum timopheevii* Tausch. into the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on physiological and biochemical traits under normal watering and drought. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):574-580. DOI 10.18699/VJ15.074

Отдаленная гибридизация между мягкой пшеницей (*Triticum aestivum* L.) и ее дикими сородичами широко используется в современных исследованиях для сравнительного изучения строения и эволюции геномов (Salina et al., 2006), а также с прикладной целью для извлечения полезных в селекции генов из генофонда диких видов, более приспособленных к изменяющимся условиям среды (Qi et al., 2007). Сравнительные физиологические исследования у отдаленных генотипов дают большие возможности для выявления лимитирующих звеньев продукционного процесса. Они позволяют установить, насколько изменились современные сорта в ходе селекции, как можно улучшить их адаптацию к неблагоприятным факторам среды. Однако дикие сородичи пшеницы и их производные формы чаще рассматриваются как источники генов устойчивости к болезням и вредителям. Гораздо реже они вовлекаются в морфофизиологические или биохимические исследования. В настоящее время наиболее изученными являются многочисленные эффекты различных пшенично-ржаных транслокаций на генетическом фоне мягкой пшеницы (Rabinovich, 1998; Ehdai et al., 2003).

Тетраплоидный вид *Triticum timopheevii*, обладающий комплексной устойчивостью к болезням и вредителям (Жуковский, Мигушова, 1969), считается одним из перспективных источников генов иммунитета. В предыдущие годы в ИЦиГ СО РАН была создана коллекция интрогрессивных линий в генетической среде различных отечественных сортов пшеницы (Budashkina, 1988; Budashkina, Kalinina, 2001). Эти линии были вовлечены в многочисленные молекулярные и иммунологические исследования с целью выявления участков интрогрессии от *T. timopheevii* в геноме пшеницы, а также изучения содержащихся в них генов устойчивости к грибным заболеваниям (Leonova et al., 2001; Леонова и др., 2008; Тимонова и др., 2012). Также данные линии были изучены по составу запасных белков зерновки и хлебопекарным свойствам (Обухова и др., 2008). Одна из линий, 821, созданная на генетическом фоне сорта пшеницы Саратовская 29 (С29), значительно отличается от него по фенотипу. Она имеет более продол-

жительный период вегетации, остистый колос, длинное жесткое опушение на листьях, подобное родительскому виду *T. timopheevii*. Как было показано, она несет интрогрессии в хромосомах 2A, 2B и 5A (Leonova et al., 2001). Однако до сих пор не изучено влияние этих интрогрессий на какие-либо физиологические и биохимические признаки, связанные с высокой засухоустойчивостью, которой характеризуется исходный сорт С29.

Засуха индуцирует в растении множество физиологических и биохимических ответов (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Особенно чувствителен к водному дефициту фотосинтез, обеспечивающий образование биомассы растений. Снижение доступной почвенной влаги приводит к закрытию устьиц растения, уменьшению фотосинтетической ассимиляции углекислого газа. При этом с высокой скоростью продуцируется перекись водорода, которая представляет большую опасность для фотосинтеза, так как окисляет сульфгидрильные группы ключевых ферментов цикла Кальвина (Иванов, 2014). Кроме того, при засухе увеличивается продукция супероксидного радикала в фотосинтетической электрон-транспортной сети. В растениях наиболее значимыми и хорошо изученными водорастворимыми низкомолекулярными антиоксидантами являются аскорбиновая кислота (АК) и восстановленный глутатион (ВГТ). Они могут инактивировать активные формы кислорода напрямую либо в реакциях, катализируемых супероксид дисмутазой (СОД) и аскорбат пероксидазой (АП), обеспечивая защиту компонентов фотосинтеза, расположенных в строме хлоропласта (Foyer, Shigeoka, 2011; Gallie, 2013). Уровень АК в листьях пшеницы в условиях водного стресса поддерживается в основном путем регенерации ее окисленных форм дегидроаскорбат редуктазой (ДГАР) (Bartoli et al., 2005). Для регенерации аскорбата ДГАР использует восстановленный глутатион (ГШ), который поддерживается в этом состоянии за счет НАДФН в реакции, катализируемой глутатион редуктазой (ГР). Комплекс реакций образования H_2O_2 , ее детоксикации и регенерации аскорбата в хлоропластах, включающий СОД, АП, ДГАР и ГР, называют аскорбат-глутатионовым (АК-ГШ) циклом (Asada, 1999),

протекающим в различных компартментах клеток. Наряду с ферментами АК-ГШН цикла важную роль в контроле накопления H_2O_2 в листьях пшеницы играет каталаза (Luna et al., 2005). В целом высокий антиоксидантный потенциал считается полезным для растений, так как повышает их толерантность к различным стрессам (Foyer, Shigeoka, 2011).

Устойчивость фотосинтетического аппарата растений формируется за счет изменения концентрации и перераспределения зеленых и желтых пигментов в светособирающем комплексе и/или в реакционном центре фотосистем. Важную роль здесь играют каротиноиды, которые участвуют в тушении триплетного состояния хлорофилла и предотвращают образование синглетного кислорода (Бухов, 2004).

Липоксигеназа, катализирующая присоединение молекулярного кислорода к полиненасыщенным жирным кислотам, может окислять липиды тилакоидных мембран. Это способствует деградации каротиноидов и хлорофиллов и отрицательно влияет на эффективность фотохимического использования энергии. Вместе с тем липоксигеназа защищает фотосинтетический аппарат при стрессе, участвуя в нефотохимическом тушении флюоресценции хлорофилла путем окисления ксантофилов в виалаксантиновом цикле (Jarén-Galán, Minguez-Mosquera, 1997), а также иницируя октадеканоидные защитные и сигнальные пути (Schaller, 2001).

Целью данной работы было сравнить линию 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* с исходным сортом по биомассе побега, ключевым параметрам газообмена и фотосинтеза, активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла, каталазы и липоксигеназы в условиях различного водообеспечения.

Материалы и методы

Объектом исследования служила линия 821, обладающая устойчивостью к бурой ржавчине и несущая маркированные молекулярными маркерами интрогрессии. Эта линия была получена скрещиванием сорта мягкой пшеницы C29 с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* ssp. *viticulosum*, последующим однократным беккроссированием на исходный сорт и отбором в потомстве цитологически стабильных, устойчивых к листовой ржавчине форм (Budashkina et al., 1988). Рекомбинантными являются хромосомы 2A, 2B (интрогрессии в короткое и частично – длинное плечо) и 5A (интрогрессия в субтеломерную область длинного плеча) (Leonova et al., 2001). Контролем служил родительский сорт C29.

Растения выращивали в почвенном субстрате в контролируемых условиях: 16-часовой фотопериод, влажность воздуха – 60 % и температурный режим – 23 °C/16 °C (день/ночь). Условия поддерживались проходной климатической камерой CLF Plant Master (CLF Plant Climatic GmbH, Вертинген, Германия), установленной на фитотроне СИФИБР СО РАН. Растения (по 10 зерен на образец) выращивали в сосудах Митчерлиха, заполненных почвенным субстратом (4 кг), при двух режимах водообеспечения – оптимальном и воддефицитном. Оптимальный режим соответствовал 60 %-му, а дефицитный – 30 %-му содержанию воды от полной почвенной влагоемкости,

которую определяли, как описано в руководстве (Журбицкий, 1968). Водный режим поддерживали весовым методом, взвешивание проводили дважды в неделю. Дефицитный водный режим создавали начиная со стадии 3 листьев и поддерживали до окончания эксперимента на стадии стеблевания, когда проводился отбор растительного материала для анализов. Данная схема водообеспечения приблизительно соответствует естественным условиям выращивания яровой пшеницы в Западной Сибири, для которых характерна ранняя засуха. Все параметры изучали на стадии стеблевания. Биомассу главного побега определяли не менее чем у восьми растений. Показатели газообмена и фотосинтеза изучали на флаговых листьях растений с помощью портативной системы GFS-3000 (HeinzWalz GmbH, Эффельтрих, Германия) для изучения газообмена и флюоресценции хлорофилла. Измеряли следующие показатели: скорость транспирации, устьичную проводимость, скорость ассимиляции CO_2 , или нетто-фотосинтез, потенциальную и реальную эффективность фотосистемы II, скорость транспорта электронов в фотосистеме 2 и нефотохимическое тушение флюоресценции. Эффективность использования воды была рассчитана как отношение нетто фотосинтез/транспирация. Все параметры измеряли в листьях шести растений каждого генотипа и при каждом режиме водообеспечения. У каждого растения все параметры измеряли не менее 8 раз. Содержание листовых пигментов (хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов) измеряли по методике Wettstein (1957) в листьях трех растений каждого генотипа и при каждом режиме водообеспечения. В каждом растении содержание пигментов определяли трижды. Ферментные экстракты получали из листьев трех отдельных растений каждого поливного варианта по ранее описанному методу (Osipova et al., 2013).

Активность ферментов определяли спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Маннедорф, Швейцария) в трех аналитических повторностях. При определении активности АП, ДГАР, ГР, КАТ и ЛОГ использовали УФ-прозрачные микропланшеты (Greiner Bio-One GmbH, Фриккенхаузен, Германия). Во всех случаях реакционная среда объемом 200 мкл содержала 10 мкл ферментного экстракта с известным содержанием белка, которое определяли по Bradford (1976) с использованием бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, Германия) в качестве стандарта. Активность АП (КФ 1.11.1.11) определяли, отслеживая снижение A_{290} в реакционной смеси, содержащей 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), 0,5 мМ аскорбиновую кислоту (Sigma-Aldrich, США) и 0,1 мМ H_2O_2 (коэффициент экстинкции $E = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Nakano, Asada, 1981). Активность ДГАР (КФ 1.8.5.1) определяли по увеличению A_{265} в реакционной среде, содержащей 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), 0,2 мМ дегидроаскорбат (Sigma-Aldrich, США) и 2,5 мМ восстановленный глутатион (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия) ($E = 14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Baier et al., 2000). Активность ГР (КФ 1.6.4.2) определяли, отслеживая окисление НАДФН при 340 нм ($E = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 1 мМ НАДФН (Sigma-Aldrich, США) и 1 мМ окисленного

Таблица 1. Средние значения массы побега и показателей фотосинтеза у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	Масса побега, г		СТ (mmol m ⁻² s ⁻¹)		УП (mmol m ⁻² s ⁻¹)		СА (μmol m ⁻² s ⁻¹)		ЭИВ (A/E)	
	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	4,72	3,48	0,318	1,302	22,4	102,0	1,84	5,28	6,4	4,1
Засуха	3,02	2,62	0,520	0,693	38,9	50,9	2,94	3,55	6,7	5,4
F _G	14,2***		130,8***		134,8***		165,0***		17,3***	
F _E	34,0***		16,2***		19,2***		4,0 н/д		3,3 н/д	

****p* < 0,001; н/д – статистически недостоверно. СТ – скорость транспирации; УП – устьичная проводимость; СА – скорость ассимиляции CO₂; ЭИВ – эффективность использования воды.

Таблица 2. Средние значения содержания пигментов листа (мг/г сырой массы) у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	Хлорофилл <i>a</i>		Хлорофилл <i>b</i>		Каротиноиды	
	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	2,4	2,1	0,91	0,85	0,48	0,47
Засуха	2,1	1,8	1,0	0,78	0,56	0,44
F _G	6,03*		9,61**		8,57**	
F _E	7,60**		0,11 н/д		0,98 н/д	

p* < 0,05; *p* < 0,01; н/д – статистически недостоверно.

глутатиона (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия) (de Lamotte, 2000). Активность КАТ (КФ 1.11.1.6) определяли, отслеживая разрушение H₂O₂ (E = 42,5 mM⁻¹cm⁻¹) при 240 нм в 50 mM натрий-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 10 mM H₂O₂ (Aebi, 1984). Активность ЛОГ (КФ 1.13.11.12) определяли, измеряя скорость образования пероксидов жирных кислот при 234 нм по методике, описанной ранее (Пермякова и др., 2010), модифицированной для микропланшетного ридера. Активность ферментов представлена в мкМ субстрата на мг белка в минуту при 25 °C. Общую активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (NBT) по известной методике (Giannopolitis, Ries, 1977) с некоторыми модификациями (Полеская и др., 2004). Реакционная смесь (200 мкл) содержала 50 mM натрий-фосфатного буфера (рН 7,8), 13 mM метионина (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия), 2 мкМ рибофлавина (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия), 63 мкМ NBT (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мкМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 10 мкл ферментного экстракта. За единицу активности СОД принимали количество фермента, способного на 50 % подавить реакцию восстановления NBT.

Для оценки достоверности эффектов генотипа и условий водообеспечения на физиологические показатели растений применяли двухфакторный дисперсионный анализ. Однофакторная модель использовалась для сравнительной оценки средних одного генотипа. Расчеты проводили с помощью программы MS Excel.

Результаты

Водный дефицит угнетающе действовал на формирование биомассы побега как сорта С29, так и линии 821,

однако родительский сорт превосходил линию по этому признаку независимо от условий выращивания (табл. 1). Они существенно различались по скорости транспирации в оптимальных условиях водоснабжения: у линии 821 она была в 4 раза выше. В условиях водного дефицита скорость транспирации у линии 821 снизилась в 2 раза, тогда как у сорта С29 – увеличилась в 1,8 раза. Это нетипично для большинства растений и, вероятно, связано со специфической реакцией на водный дефицит высокозасухоустойчивого сорта С29. Такие же тенденции наблюдали для устьичной проводимости: в оптимальных условиях устьичная проводимость у линии 821 была почти в 5 раз выше по сравнению с С29, снижаясь в условиях водodefицита в 2 раза. У С29 в условиях водного стресса этот показатель, наоборот, увеличивался. Ассимиляция CO₂ в оптимальных условиях у линии 821 была в 3 раза выше, чем у С29. Хотя двухфакторный анализ не выявил достоверных различий между средними значениями скорости ассимиляции в разных условиях водоснабжения (табл. 1), анализ достоверности различий между средними значениями каждого генотипа в контрастных условиях (однофакторная модель) показал их существенность (для С29 *F* = 14,7; для линии 821 *F* = 179,1, *p* < 0,001). При обоих вариантах водоснабжения эффективность использования воды у линии 821 была снижена по сравнению с исходным сортом, который, как отмечали его создатели (Ильина, 1989), обладает способностью сохранять высокую водоудерживающую способность листьев при засухе.

Два генотипа значимо различались по содержанию хлорофиллов *a* и *b*, причем сорт С29 независимо от условий выращивания содержал больше хлорофилла, как *a* так и *b* (табл. 2). Содержание хлорофилла *a* у С29 и линии 821 одинаково снижалось в водodefицитных условиях

Таблица 3. Средние значения параметров флюоресценции хлорофилла у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	ПЭФ		РЭФ		СЭТ ($\mu\text{mol-электронов m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		НТФ	
	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	0,759	0,739	0,568	0,488	38,0	32,7	0,257	0,375
Засуха	0,776	0,786	0,55	0,494	36,8	33,1	0,282	0,304
F_G	1,2 н/д		74,4***		73,0***		11,8**	
F_E	46,4***		0,5 н/д		0,6 н/д		1,4 н/д	

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; н/д – статистически недостоверно. Эффективность фотосистемы II: ПЭФ – потенциальная, РЭФ – реальная; СЭТ – скорость транспорта электронов в фотосистеме 2; НТФ – нефотохимическое тушение флюоресценции.

Таблица 4. Средние значения активности дегидроаскорбат редуктазы (ДГАР), аскорбат пероксидазы (АП), глутатион редуктазы (ГР), каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и липоксигеназы (ЛОГ) у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	ДГАР		АП		ГР		КАТ		СОД		ЛОГ		Σ ДГАР, АП, ГР, КАТ, СОД	
	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	74,26	72,95	136,3	80,1	20,13	16,94	10,63	9,44	2,70	2,49	3,49	1,48	244,0	181,9
Засуха	113,80	90,34	313,8	105,9	22,83	17,56	6,54	8,99	2,51	2,50	2,72	5,88	665,0	225,3
F_G	4,9*	24,9***	12,9**	1,9 н/д	25,4***	0,9 н/д	–	–	–	–	–	–	–	–
F_E	25,7***	23,1***	2,0 н/д	25,4***	16,9***	8,6**	–	–	–	–	–	–	–	–

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; н/д – статистически недостоверно. Σ ДГАР, АП, ГР, КАТ, СОД – сумма активностей антиоксидантных ферментов.

(табл. 2), тогда как хлорофилла *b* снижалось только у линии 821. По содержанию каротиноидов в оптимальных условиях генотипы не различались.

В условиях воддефицита в листьях С29 содержалось больше каротиноидов, что подтвердил однофакторный анализ этого признака ($F = 8,7$; $p < 0,05$). Более высокое содержание хлорофиллов и способность поддерживать высокий уровень каротиноидов в условиях дефицита воды, вероятно, способствуют лучшей адаптации фотосинтетического аппарата С29 по сравнению с линией 821.

Линия 821 уступала сорту С29 по реальной эффективности фотосинтеза и скорости транспорта электронов в фотосистеме II независимо от условий выращивания (табл. 3). Потенциальная эффективность фотосистемы II не отличалась у двух генотипов и достоверно возрастала в воддефицитных условиях. Нефотохимическое тушение флюоресценции было выше у линии 821.

В оптимальных условиях линия 821 существенно отличалась от исходного сорта по активности двух (АП и ЛОГ) из шести изученных ферментов, которая у линии была ниже в 1,7 и 2,4 раза соответственно (табл. 4). В условиях воддефицита линия 821 существенно уступала исходному сорту по активности ДГАР, АП и ГР, ферментов, играющих важную роль в поддержании восстановленного состояния редокс-пар «аскорбиновая кислота/дегидроаскорбиновая кислота» и «восстановленный глутатион/окисленный глутатион» и контролирующихся в клетках уровнем H_2O_2 . По активности ЛОГ реакция на стресс кардинально различалась у двух генотипов. В листьях линии 821 активность ЛОГ значительно (почти в 4 раза) возрастала, а у С29, напротив, снижалась. Такое резкое повышение активности ЛОГ у менее устойчивого к засухе

генотипа, вероятно, может объясняться необходимостью активизации защитных механизмов, связанных с липидным катаболизмом.

Обсуждение

Сорт яровой пшеницы С29, созданный в конце 1950-х годов в НИИСХ Юго-Востока, широко возделывался в СССР и до сих пор является непревзойденным по занимаемым площадям посевов. Он также вовлекался в разнообразные научные исследования и послужил генетической основой цитогенетических коллекций и коллекций интрогрессивных линий пшеницы (Budashkina, 1988; Arbutova et al., 1996). Сорт хорошо изучен по морфологическим признакам и отличается высокой засухоустойчивостью (Ильина, 1989). К отрицательным свойствам сорта относится его низкая устойчивость к грибным заболеваниям. Для улучшения этого признака в сорт путем гибридизации были интрогрессированы участки генома тетраплоидного вида *T. timopheevii* (Budashkina, 1988), обладающего комплексной устойчивостью к ряду фитопатогенов. Линия 821 из этой коллекции обладает устойчивостью к листовой ржавчине (Леонова и др., 2008) и несет интрогрессии в хромосомы 2A, 2B и 5A, выявленные с помощью микросателлитных маркеров (Leonova et al., 2001). Также обнаружено, что эта линия имеет высокое содержание клейковины в зерне и отличные хлебопекарные качества (Обухова и др., 2008).

Как показали наши исследования, у линии 821 интрогрессии в хромосомы 2A, 2B и 5A оказали влияние на физиологические и биохимические характеристики флагового листа и ее устойчивость к водному дефициту. Интрогрессии привели к существенному увеличению

транспирации и устьичной проводимости линии 821, вследствие чего эффективность использования воды была существенно снижена по сравнению с исходным сортом. По имеющимся данным (Осипова и др., неопубл. данные), локусы количественных признаков, ответственные за устьичный контроль фотосинтеза, локализованы на хромосомах пшеницы второй гомеологической группы, и, вероятно, этот эффект обусловлен интрогрессиями в хромосомы 2A и 2B. У С29 в условиях водного дефицита почти пропорционально (в 1,6–1,7 раз) повышались все показатели газообмена, в отличие от линии 821, и, как следствие, ЭИВ в условиях стресса поддерживалась на высоком уровне. Наши результаты согласуются с данными ранее проведенного эксперимента, в котором сорт пшеницы С29 выращивался в условиях острой засухи, при 10 % влажности почвы от нормы. Было обнаружено, что в этих условиях не происходит значительного снижения ассимиляции CO₂ (Давыдов, 2007). Это объяснялось 1,5–3,0-кратным увеличением числа устьиц на обеих сторонах листа во время засухи, что способствует поддержанию уровня ассимиляции CO₂ в условиях снижения размеров и биомассы листа.

Линия 821 уступала исходному сорту С29 по комплексу параметров, характеризующих ФСА: скорости транспорта электронов в фотосистеме II, реальной эффективности фотосинтеза, содержанию хлорофиллов *a* и *b*, содержанию каротиноидов, которые участвуют в рассеивании избыточной световой энергии и защищают фотосинтетический аппарат от фотоокисления.

Интрогрессированная линия существенно отличалась от исходного сорта по активности ферментов, являющихся важными компонентами прооксидантных (ЛОГ) и антиоксидантных (КАТ, СОД, АП, ДГАР и ГР) систем. В условиях стресса суммарная активность ферментов-антиоксидантов в листьях С29 была почти в 3 раза выше, чем у линии 821, а активность ЛОГ – в 2 раза ниже.

Существенные различия в активности ДГАР, АП и ГР у изученных генотипов, вероятно, связаны с эффектом интрогрессий в хромосомы 2A и 2B, так как ранее (Osipova et al., 2013) у межсортовых замещенных по хромосомам 2-й гомеологической группы линий С29 (Janetzki Probat) была обнаружена значительная вариабельность этого признака. Также известно, что структурные гены СОД находятся в длинных плечах хромосом 2-й гомеологической группы (Neuman, Hart 1986). Li с коллегами (1999) выявили соответствующие генные последовательности.

Значительные различия в активности ЛОГ у изученных генотипов при поливе и при засухе свидетельствуют о том, что участки интрогрессии несут генетический фактор, определяющий активность этого фермента. Вероятно, он находится на рекомбинантном участке хромосомы 5AL, так как в этой области ранее были картированы гены гомеоаллельной серии *Lpx-2*, кодирующие одну из изоформ этого фермента (McIntosh et al., 2013).

Таким образом, интрогрессия в три хромосомы сорта пшеницы С29 от *T. timopheevii* привела к повышению транспирации и устьичной проводимости, снижению эффективности использования воды, ключевых характеристик фотосинтеза и антиоксидантной способности в тканях листа. В результате листья линии 821 в условиях

дефицита воды подвядали, теряя тургор. Это говорит о том, что хромосомы 2A, 2B и 5A исходного сорта С29 несут важные генетические факторы, обеспечивающие физиологические и биохимические механизмы высокой засухоустойчивости. Дальнейшее извлечение из генотипа линии 821 отдельных участков интрогрессии путем создания однохромосомных замещенных и изогенных линий позволит более подробно изучить генетический контроль физиологических и биохимических процессов, участвующих в адаптации к стрессу.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № VI.53.1.3 (подготовка генетического материала) и проекта РФФИ № 15-04-02762 (определение физиологических и биохимических характеристик). В работе использовалось оборудование ЦКП «Фитотрон» СИФИБР СО РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Бухов Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза. Физиология растений. 2004;51(6):825-837.
- Давыдов В.А. Количественные характеристики устьичного аппарата растений яровой пшеницы сорта Саратовская 29 при остром дефиците воды. Сельскохозяйственная биология. 2007;5:90-93.
- Жуковский П.М., Мигушова Э.Ф. Наиболее высокоиммунный эндемичный генофонд для выведения устойчивых сортов пшеницы путем отдаленной гибридизации. Вестн. с.-х. науки. 1969; 2:9-20.
- Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968.
- Иванов Б.Н. Роль аскорбиновой кислоты в фотосинтезе (обзор). Биохимия. 2014;79(3):364-372.
- Ильина Л.Г. Селекция яровой мягкой пшеницы на Юго-Востоке. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1989.
- Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н. П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующих устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине. Генетика. 2008;44:1652-1659.
- Обухова Л.В., Будашкина Е.Б., Ермакова М.Ф., Калинина Н.П., Шумный В.К. Качество зерна и муки у интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генами устойчивости к листовой ржавчине от *Triticum timopheevii* Zhuk. С.-х. биология. 2008;5:38-42.
- Пермякова М.Д., Труфанов В.А., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф. Роль липоксигеназы в определении качества зерна пшеницы. Прикладная биохимия и микробиология. 2010;46(1):96-102.
- Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде. Физиол. растений. 2004;51(5):686-691.
- Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. Вавил. журн. генет. и селекции. 2012;16(1):142-159.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 1984;105:121-126.
- Arbuzova V.S., Efremova T.T., Laikova L.I., Maystnko O.I., Popova O.M., Pshenichnikova T.A. The development of precise genetic stocks in two wheat cultivars and their use in genetic analysis. Euphytica. 1996;89:11-15.

- Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999;50:601-639.
- Baier M., Noctor G., Foyer C., Dietz K.J. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxinin *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiol.* 2000;124:823-832.
- Bartoli C.G., Guamet J.J., Kiddle G., Pastori G.M., Cagno R.D., Theodoulou F.L., Foyer C.H. Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell Env.* 2005;28:1073-1081.
- Bradford M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analyt. Biochem.* 1976;72:248-254.
- Budashkina E. Cytogenetic study of introgressive disease-resistant common wheat lines. *Tag. Ber. Acad. Landwirtsch. Wiss. DDR.* 1988;206:209-212.
- Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust. *Acta Phytopathol. Entomol.* 2001;36:61-65.
- de Lamotte F., Vianey-Liaud N., Duviau M., Kobrehel K. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and Characterization. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:4978-4983. DOI: 10.1021/jf0003808
- Ehdaie B., Whitkus R.N., Waines S.G. Root biomass, water-use efficiency and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat «Pavon». *Crop Sci.* 2003;43:710-717.
- Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 2011;155:93-100.
- Gallie D.R. L-Ascorbic Acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica.* 2013;2013. Article ID 795964, 24 p. DOI:10.1155/2013/795964
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide Dismutase. 1. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol.* 1977;59:309-314.
- Jarén-Galán M., Minguéz-Mosquera M.I. β -caroten and capsanthin co-oxidation by lipoxygenase. Kinetic and Thermodynamic aspects of the reaction. *J. Agric. Food Chem.* 1997;45:4814-4820.
- Leonova I.N., Kalinina N.P., Budashkina E.B., Röder M.S., Salina E.A. Comparative molecular and genetic analysis of *Triticum aestivum* \times *Triticum timopheevii* hybrid lines resistant to leaf rust. *EWAC Newslett.* 2001. Proc. 11th EWAC Conf., Novosibirsk, Russia, **24–28 July**, 2000. Ed. T.A. Pshenichnikova, A.J. Worland.
- Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:226-233.
- Luna C., Pastory G., Driscoll S., Groten K. Drought control on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J. Exp. Bot.* 2005;56:417-423. DOI: 10.1093/jxb/eri039
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J, Morris C, Appels R., XC Xia Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013. 12th Intern. Wheat Genet. Symp., 8–13 September 2013, Yokohama, Japan.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981; 22:867-880.
- Neuman P.R., Hart G.E. Genetic control of the mitochondrial form of superoxide dismutase in hexaploid wheat. *Biochem. Genetics.* 1986; 24:435-446.
- Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Pshenichnikova T.A., Genaev M.A., Börner A. The antioxidant enzymes activity in leaves of inter-varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit. *Acta Physiol. Plant.* 2013;35:2455-2465.
- Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Res.* 2007;15:3-19.
- Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocation for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica.* 1998;100:323-340.
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. *Funct. Integr. Genomics.* 2006;6:71-80.
- Schaller F. Enzymes of biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J. Exp. Bot.* 2001;52(354):11-23.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Expt. Bot.* 2007;58:221-227. DOI: 10.1093/jxb/erl164
- Wettstein D. Chlorophyll-letale und der submikroskopische form wechsel der Plastiden. *Exp. Cell Res.* 1957;12:427–506.