

Физиологические реакции линий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетически различным опушением листа на водный дефицит

С.В. Осипова^{1,4}✉, А.В. Рудиковский¹, А.В. Пермяков¹, Е.Г. Рудиковская¹, М.Д. Пермякова¹, В.В. Верхотуров³, Т.А. Пшеничникова²

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия

⁴ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

✉ e-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

Аннотация. Изучение взаимосвязи опушения листьев и засухоустойчивости важно для оценки генетических ресурсов *Triticum aestivum* L. Целью работы был анализ устойчивости к дефициту воды генотипов мягкой пшеницы с различными составом и аллельным состоянием генов, определяющих фенотип опушения листьев. Мы сравнили засухоустойчивый сорт пшеницы Саратовская 29 (С29) с густо опушенными листьями, несущий доминантные аллели генов *H11* и *H13*, и две почти изогенные линии – i: C29 *h11*, *h13* и i: C29 *H12^{aesp}* с интрогрессией дополнительного гена опушения от диплоидного злака *Aegilops speltoides*. В контролируемых условиях климатической камеры изучены параметры флуоресценции хлорофилла, используемые для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений, содержание фотосинтетических пигментов и активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла в листьях С29 и линий. Устойчивость определяли с помощью комплексного индекса D, рассчитанного на основе изученных физиологических признаков. Рецессивное состояние генов опушения, как и введение дополнительного гена *H12^{aesp}*, привели к 6-кратному снижению значений D. Под воздействием водного дефицита у линий менялся профиль параметров флуоресценции и снижался индекс жизнеспособности по сравнению с С29. Активность аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы и дегидроаскорбатредуктазы в листьях линии i: C29 *h11*, *h13* уменьшалась в 1.9, 3.3 и 2.3 раза, в листьях линии i: C29 *H12^{aesp}* – в 1.8, 3.6 и 1.8 раза соответственно по сравнению с С29. В условиях гидропонной теплицы изучена продуктивность линий. По сравнению с С29 у линии i: C29 *h11*, *h13* при водном дефиците была снижена масса тысячи зерен. Продуктивность линии i: C29 *H12^{aesp}* была значительно ниже независимо от условий водоснабжения в сравнении с С29. Предполагается, что выявленные эффекты связаны с нарушениями перекрестных регуляторных взаимодействий белков сети формирования трихом и факторов транскрипции, которые контролируют рост растений и реакцию на стресс. Ключевые слова: засухоустойчивость; гены опушения листа; изогенные линии; *Triticum aestivum* L.; флуоресценция хлорофилла; ферменты аскорбат-глутатионового цикла; продуктивность.

Для цитирования: Осипова С.В., Рудиковский А.В., Пермяков А.В., Рудиковская Е.Г., Пермякова М.Д., Верхотуров В.В., Пшеничникова Т.А. Физиологические реакции линий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетически различным опушением листа на водный дефицит. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(8):813-820. DOI 10.18699/VJ20.678

Physiological responses to water deficiency in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with genetically different leaf pubescence

S.V. Osipova^{1,4}✉, A.V. Rudikovskii¹, A.V. Permyakov¹, E.G. Rudikovskaya¹, M.D. Permyakova¹, V.V. Verkhoturov³, T.A. Pshenichnikova²

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk, Russia

⁴ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

✉ e-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

Abstract. Studying the relationship between leaf pubescence and drought resistance is important for assessing *Triticum aestivum* L. genetic resources. The aim of the work was to assess resistance of common wheat genotypes with different composition and allelic state of genes that determine the leaf pubescence phenotype. We compared the drought resistance wheat variety Saratovskaya 29 (S29) with densely pubescent leaves, carrying the dominant alleles of the *H11* and *H13* genes, and two near isogenic lines, i: S29 *h11*, *h13* and i: S29 *H12^{aesp}*, with the introgression of the additional pubescence gene from diploid species *Aegilops speltoides*. Under controlled conditions of the climatic chamber, the photosynthetic pigments content, the activity of ascorbate-glutathione cycle enzymes and also the parameters of chlorophyll fluorescence used to assess the physiological state of the plants photosynthetic apparatus were studied in

the leaves of S29 and the lines. Tolerance was evaluated using the comprehensive index D, calculated on the basis of the studied physiological characteristics. The recessive state of pubescence genes, as well as the introduction of the additional *HL2^{aes}* gene, led to a 6-fold decrease in D. Under the water deficit influence, the fluorescence parameters profile changed in the lines, and the viability index decreased compared with S29. Under drought, the activity of ascorbate peroxidase, glutathione reductase and dehydroascorbate reductase in the line i: S29 *h11*, *h13* decreased 1.9, 3.3 and 2.3 times, in the line i: S29 *HL2^{aes}* it decreased 1.8, 3.6 and 1.8 times respectively, compared with S29. In a hydroponic greenhouse, line productivity was studied. Compared with S29, the thousand grains mass in the line i: S29 *h11*, *h13* under water deficit was reduced. The productivity of the line i: S29 *HL2^{aes}* was significantly reduced regardless of water supply conditions in comparison with S29. Presumably, the revealed effects are associated with violations of cross-regulatory interactions between the proteins of the trichome formation network and transcription factors that regulate plant growth and stress response.

Key words: drought tolerance; leaf pubescent genes; isogenic lines; *Triticum aestivum* L.; chlorophyll fluorescence; ascorbate-glutathione cycle enzymes; productivity.

For citation: Osipova S.V., Rudikovskii A.V., Permyakov A.V., Rudikovskaya E.G., Permyakova M.D., Verkhoturov V.V., Pshenichnikova T.A. Physiological responses to water deficiency in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with genetically different leaf pubescence. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(8): 813-820. DOI 10.18699/VJ20.678

Введение

Яровой сорт мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Саратовская 29 (С29) – один из наиболее известных сортов, созданных в России, так как обладает высокой засухоустойчивостью и выдающимся качеством зерна (Ильина, 1989). Эти свойства характеризуют С29 как ценный генетический ресурс, который использован для получения не менее 155 других сортов пшеницы как в России, так и за рубежом. Среди 47 генотипов пшеницы и родственных ей видов, ранее изученных по разнообразию этого признака, опушение листьев у С29 отличалось наиболее высокой плотностью и большей длиной трихом (Pshenichnikova et al., 2017). Очевидно, такие морфологические адаптации вносят значительный вклад в засухоустойчивость этого сорта.

Наиболее известная функция трихом – отражение избыточного солнечного света (Ehleringer et al., 1976). Недавние исследования показали, что трихомы могут влиять на смачиваемость листьев, удержание капель и поглощение воды (Bickford, 2016). Плотный слой трихом может увеличивать эффективность использования воды, способствуя образованию росы и уменьшая разницу в потенциале воды внутри листа и в воздухе. Это позволяет устьицам дольше оставаться открытыми, обеспечивая приток углекислого газа без чрезмерной потери воды (Konrad et al., 2015).

У культурных видов растений роль опушения листьев в устойчивости фотосинтетического аппарата малоизучена. У вида *Oryza sativa* L. интрогрессия сегмента хромосомы дикого вида *O. nivara* увеличивала опушение листьев, снижала скорость транспирации и увеличивала эффективность использования воды (ЭИВ) благодаря повышенной стабильности пограничного слоя воздуха (Намаока et al., 2017). Единственный эксперимент на *T. aestivum* L. показал, что устьичная проводимость и скорость фотосинтеза в замещенных и почти изогенных линиях с генетически различным опушением листьев были обратно пропорциональны плотности и длине трихом (Pshenichnikova et al., 2019).

У мягкой пшеницы известно несколько генов, определяющих различные фенотипы опушения листа. Гены *H11* и *H12* были локализованы и картированы на хромосомах 4В и 7В соответственно (Maustrenko, 1976; Taketa et al.,

2002; Dobrovolskaya et al., 2007). Ген *H13*, еще не отнесенный к конкретной хромосоме, обнаружен по результатам генетического анализа у сорта С29 (Doroshkov et al., 2011). В дополнение к ним идентифицирован ген *HL2^{aes}*, аллельный гену *H12*, интрогрессированный в мягкую пшеницу от вида *Ae. speltooides* (Pshenichnikova et al., 2007). Гены *H11* и *H13* в большей степени влияют на инициацию и рост трихом, в то время как ген *HL2^{aes}* регулирует длину трихом (Doroshkov et al., 2016). Знание связи этих генов с физиологическими характеристиками засухоустойчивости и урожайности зерновых необходимо для их целенаправленного использования в селекционном процессе.

Две почти изогенные линии с различным составом и аллельным состоянием генов *H1* созданы на генетической основе сорта С29. Линия i: С29 *h11*, *h13* несет рецессивные аллели генов *H11* и *H13*, которые являются доминантными у реципиента. Линия i: С29 *HL2^{aes}* несет ген длинного опушения в дополнение к двум собственным доминантным генам реципиента. Ранее изучали фотосинтетические показатели в этих двух линиях в контрастных условиях водоснабжения и при естественном освещении, обнаружив различающиеся параметры газообмена (Pshenichnikova et al., 2019). Однако не получено четкого ответа в отношении влияния опушения на параметры флуоресценции хлорофилла, которые описывают физиологическое состояние фотосинтетического аппарата растений (Goltsev et al., 2016).

Цель данной работы – оценка засухоустойчивости пшеницы по широкому спектру физиологических признаков и продуктивности в зависимости от наличия доминантных или рецессивных аллелей генов или дополнительного гена *HL2^{aes}*, определяющих фенотип опушения листьев. Среди физиологических признаков были показатели флуоресценции хлорофилла, в том числе параметры ОЛР-теста, содержание фотосинтетических пигментов и эффективность аскорбат-глутатионового цикла, который, как известно, является мощной защитой клеточных структур от окислительных повреждений (Foyer, Shigeoka, 2011). Устойчивость к засухе оценивали с использованием комплексного показателя устойчивости D (Cao et al., 2015), рассчитанного на основе индексов устойчивости физиологических признаков.

Материалы и методы

Растительный материал. Объектом исследования был устойчивый к засухе яровой сорт пшеницы С29, несущий два гена опушения листа (*H11* и *H13*) и две почти изо-генные линии с контрастным опушением листа. Линия *i*: С29 *h11*, *h13* получена путем скрещивания сорта С29 с неопушенным сортом Родина, несущим рецессивные аллели этих генов. В процессе 8-кратного беккроссирования на сорт-реципиент отбирали неопушенные растения. Линия *i*: С29 *H12^{aesp}* получена путем скрещивания сорта С29 с интрогрессированной линией 102/00ⁱ, которая несет ген *H12^{aesp}* от вида *Ae. speltooides*. Далее проведено 8-кратное беккроссирование на сорт-реципиент с отбором растений, несущих интрогрессированное опушение. Опушение листьев у линии *i*: С29 *h11*, *h13* было слабым, у линии *i*: С29 *H12^{aesp}* – плотным. Количественные характеристики опушения листа у линий в различных условиях полива описаны ранее (Doroshkov et al., 2016; Pshenichnikova et al., 2019).

Условия экспериментов. Физиологические параметры изучали в контролируемых условиях климатической камеры CLF PlantMaster (CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen, Германия), установленной на фитотроне Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия). Почвенная смесь для выращивания растений состояла из перегноя, песка и торфа в отношении 1 : 1 : 1. В камере поддерживали 16-часовой фотопериод с интенсивностью света 300 мкмоль (фотон)/м² · с⁻¹, дневной/ночной температурой 23/16 °С и относительной влажностью 60 %. В каждый сосуд (диаметром 19 см, высотой 0.24 см, содержащий 4 кг почвы) сеяли десять зерен. Для каждой линии один сосуд поддерживали в состоянии оптимального влагообеспечения, которое составляло 60 % полной влагоемкости почвы (контроль), тогда как во втором сосуде начиная со стадии трех листьев полив ограничивали до тех пор, пока содержание воды в почве не снижалось до 30 % полной влагоемкости почвы (водный дефицит или засуха). Такую модель засухи, соответствующую климатическим условиям Западной и Восточной Сибири в весенний период, поддерживали до стадии стеблевания.

Компоненты урожайности линий изучали в гидропонной теплице в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в течение двух сезонов. Растения выращивали в ваннах (размеры: 4 × 1 × 0.35 м), заполненных искусственным грунтом (керамзитом); для питания растений использовали раствор Кнопа. Почти изогенные линии и С29 выращивали в рядах по семь растений, в двух независимых повторностях. От всходов до стадии кущения все растения в ваннах поливали два раза в день. После начала кущения в ваннах были созданы два режима подачи воды. В режиме контроля растения продолжали поливать два раза в день до конца сезона. Во втором режиме водоснабжение было прекращено. Уровень влажности измеряли один раз в неделю на глубине 6 см с помощью влагомера MG-44 («АКВАСЕНКОР», Харьков, Украина). Влажность грунта в контрольном варианте в среднем за сезон составила 28–30 %. Во втором варианте влажность грунта постепенно снижалась и после месячной засухи достигала в среднем 10–12 %. Измерены следующие компоненты урожайности: количество побегов, длина стебля и

колоса, количество и масса зерен в основном и вторичном колосках. Масса тысячи зерен была расчетной величиной.

Определение параметров флуоресценции. Измерения флуоресценции листьев проводили с помощью портативного импульсного флуориметра PAM-2500 (Walz, Effelrich, Германия). Всего измерено и рассчитано 33 параметра флуоресценции хлорофилла, 13 из них были наиболее чувствительны к водному дефициту (рис. 1). Чтобы зарегистрировать минимальный выход флуоресценции адаптированного к темноте состояния (F_0) фотосистемы II (ФСII), мы затемняли листья в течение 30 мин, а затем освещали их модулированным измерительным светом низкой частоты (5 Гц) и низкой интенсивности (630 нм). Интенсивность флуоресценции хлорофилла в условиях закрытых реактивных центров (F_m) измеряли после воздействия светового импульса высокой интенсивности (25000 мкмоль (фотон)/м² · с⁻¹, 630 нм). Кроме того, мы рассчитали скорость переноса электронов (ETR), реальный квантовый выход флуоресценции ($Y(II)$), квантовый выход нерегулируемого тушения флуоресценции ($Y(NO)$), коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции (qN), коэффициент фотохимического тушения флуоресценции (qP). Параметры I_k и ETR_{max} рассчитывали по световой кривой флуоресценции (диапазон ФАР от 0 до 2000 мкмоль (фотон)/м² · с⁻¹).

Количественный анализ характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров кинетической кривой флуоресценции проводили с использованием ОЛР-теста, основанного на теории энергетических путей (Strasser et al., 2004). Рассчитаны следующие параметры:

- $V_1 = (F_{30ms} - F_0) / F_v$ – относительная переменная флуоресценция при 30 мс;
- $PI^{abs} = (RC / ABS) \times [\varphi Po / (1 - \varphi Po)] \times [\Psi 0 / (1 - \Psi 0)]$ – индекс производительности, показатель функциональной активности ФСII;
- $Mo = 4 \times (F_{0.3ms} - F_0) / (F_m - F_0)$ – параметр отражает скорость закрытия реактивных центров ФСII;
- $Rfd = (F_m - F_t) / F_t$ – индекс жизнеспособности (Lichtenhaler et al., 2005).

Определение содержания фотосинтетических пигментов и активности ферментов в листьях. После определения параметров фотосинтеза навески листа замораживали жидким азотом и хранили при температуре –80 °С. Содержание пигментов (мг/грамм сухой массы листьев) и активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-редуктазы (ГР), дегидроаскорбатредуктазы (ДГАР) и аскорбатпероксидазы (АПХ) определяли и рассчитывали, как описано ранее (Osipova et al., 2016).

Статистический анализ. Флуоресценцию измеряли на флаговых листьях у четырех растений на линию. Содержание пигментов и активность ферментов определяли в трех биологических и трех аналитических повторностях. Одно растение каждой линии считали за биологическую повторность. Компоненты урожайности изучали в каждом сезоне в двух повторностях; измерения проведены для двадцати четырех растений каждой линии в условиях засухи и контрольных условиях. Все сравнения сделаны с С29. Для обработки данных и построения гистограмм использован Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., Редмонд, Вашингтон, США). Статистическую значимость

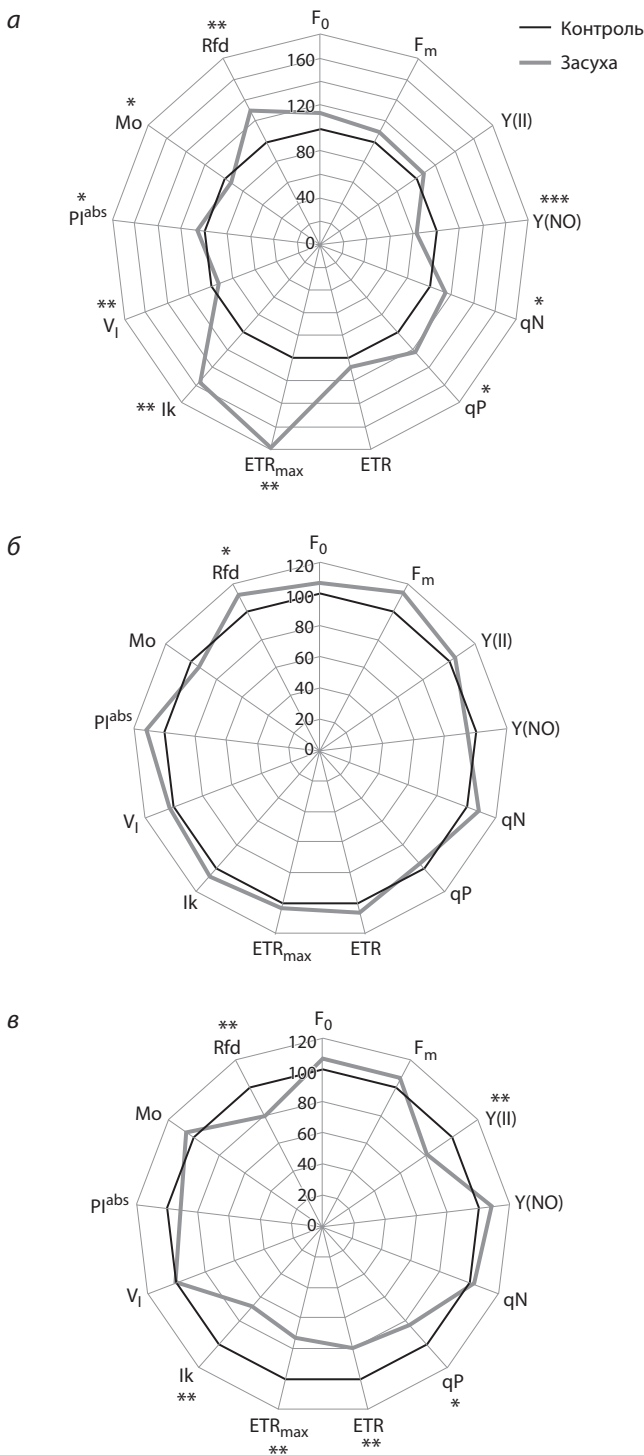


Рис. 1. Относительное отклонение (%) параметров флуоресценции хлорофилла в условиях засухи по сравнению с контролем (полив 100 %) у Саратовской 29 (а) и изогенных линий *i*: C29 *H12aesp* (б) и *i*: C29 *h11, h13* (в).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

F_0 и F_m – минимальный и максимальный выход флуоресценции в адаптированном к темноте состоянии; $Y(II)$ – реальная квантовая эффективность ФСII; $Y(NO)$ – квантовый выход нерегулируемого тушения флуоресценции; qN – коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции; qP – коэффициент фотохимического тушения флуоресценции; ETR – относительная скорость транспорта электронов; ETR_{max} – максимальная скорость транспорта электронов; Ik – интенсивность света, выражающая начало насыщения ФАР; V_1 – относительная вариабельная флуоресценция при 30 мс; Mo – скорость закрытия реакционных центров ФСII; $P1^{abs}$ – индекс производительности ФСII; Rfd – индекс жизнеспособности ФСII.

различий между сортом реципиента и линиями пшеницы по измеренным параметрам сравнивали с помощью теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистический пакет PAST (Hammer et al., 2001) применяли для анализа главных компонент (ГК). Индекс устойчивости (ИУ) к засухе для каждого параметра рассчитывали, как показано в следующей формуле:

$$\text{ИУ (\%)} = \frac{\text{значение признака при засухе}}{\text{значение признака при контроле}} \times 100 \text{ \%}.$$

Данные анализа ГК использованы в дальнейших расчетах значений комплексного ИУ к засухе D (Cao et al., 2015).

Результаты

Влияние водного дефицита на параметры флуоресценции хлорофилла у C29 и линий *i*: C29 *H12aesp* и *i*: C29 *h11, h13*. Реакция фотосинтетического аппарата на дефицит воды значительно различалась у изученных генотипов пшеницы (см. рис. 1).

У C29 наиболее заметными изменениями были увеличение более чем на 50 % ETR_{max} и Ik , статистически значимое увеличение параметров qP , qN , $P1^{abs}$ и индекса жизнеспособности Rfd . Параметры $Y(NO)$, Mo и V_1 у сорта C29 снижались в условиях дефицита воды (см. рис. 1, а). У линии *i*: C29 *H12aesp* флуоресценция хлорофилла оставалась неизменной при водном дефиците, за исключением увеличения индекса жизнеспособности Rfd (см. рис. 1, б). У линии *i*: C29 *h11, h13* при дефиците воды параметры $Y(II)$, qP , ETR , ETR_{max} , Ik и Rfd статистически значимо снизились по сравнению с контролем (см. рис. 1, в).

Влияние водного дефицита на активность антиоксидантных ферментов в листьях C29 и линий *i*: C29 *H12aesp* и *i*: C29 *h11, h13*. При адаптации к водному дефициту у сорта C29 активность АПХ, ГР и ДГАР в листьях была выше, чем при оптимальных условиях полива (рис. 2, б–г).

В листьях линии *i*: C29 *H12aesp* активность этих ферментов была значительно ниже по сравнению с C29 в условиях засухи. Кроме того, активность ГР и ДГАР в данной линии была ниже во время засухи по сравнению с контролем. Активность АПХ, ГР и ДГАР в линии *i*: C29 *h11, h13* была значительно уменьшена по сравнению с C29 независимо от условий водоснабжения. Активность СОД также была снижена по сравнению с C29 в условиях засухи у изогенных линий, в большей степени в линии *i*: C29 *h11, h13* (см. рис. 2, а).

Влияние водного дефицита на содержание фотосинтетических пигментов в листьях C29 и линий *i*: C29 *H12aesp* и *i*: C29 *h11, h13*. Содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях C29 не менялось в зависимости от условий водоснабжения (Прил. 1)¹. При оптимальных условиях линии значительно превышали исходный сорт по содержанию фотосинтетических пигментов. В условиях дефицита воды содержание хлорофиллов и каротиноидов в линиях уменьшалось. У линии *i*: C29 *H12aesp* снижение содержания хлорофилла *b* и каротиноидов было значительно ниже, чем у C29. Независимо от условий соотношение «хлорофилл *a* + *b* / каротиноиды» было выше

¹ Приложения 1–3 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx14.pdf>

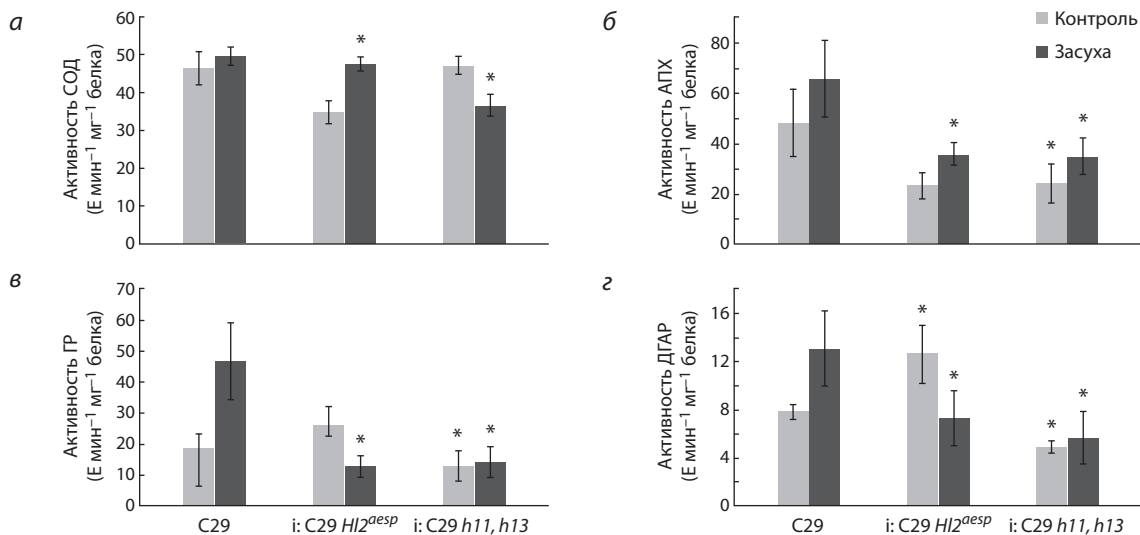


Рис. 2. Средняя активность СОД (а), АРХ (б), ГР (в) и ДГАР (г) в листьях сорта С29 и линий *i: C29 HI2^{aesp}* и *i: C29 h11, h13* при нормальном поливе и засухе.

* $p < 0.05$ по сравнению с С29 в каждом режиме полива.

в линии *i: C29 h11, h13* по сравнению с исходным сортом. Это связано с более высоким содержанием хлорофиллов в листьях этой линии. Индекс устойчивости к засухе по содержанию фотосинтетических пигментов в обеих линиях был снижен по сравнению с С29 (Прил. 2).

Анализ главных компонентов и расчет комплексной оценки устойчивости к засухе D. Индексы устойчивости к засухе для 14 физиологических признаков (см. Прил. 2) были включены в анализ ГК. Суммарный вклад GK_1 и GK_2 составил 100 % общего отклонения (Прил. 3). На GK_1 приходилось 84.9 % общей вариабельности, основной вклад в разнообразие вносили ИУ активности ГР и ДГАР, а также ETR_{max} . GK_2 составил 15.1 % общего разнообразия признаков за счет активности СОД и ДГАР, ETR_{max} и lk , которые играли наибольшую роль в вариабельности. С использованием формулы X. Сао и коллег (2015) рассчитано значение комплексного индекса устойчивости D, учитывающего 14 физиологических показателей и указывающего на относительный уровень устойчивости к засухе сравниваемых генотипов пшеницы. На основании этого критерия сорт С29 со значением D, равным 0.948, имел самую высокую устойчивость к засухе. Линии *i: C29 HI2^{aesp}* и *i: C29 h11, h13* показали значения D 0.150 и 0.160 соответственно. Таким образом, обе изогенные линии продемонстрировали значительно более низкий уровень устойчивости по сравнению с исходным сортом. Наибольший вклад в эти различия внесли активность ГР и ДГАР, а также параметры световой кривой ETR_{max} и lk .

Оценка продуктивности С29 и линий *i: C29 HI2^{aesp}* и *i: C29 h11, h13* в различных условиях водоснабжения. Сорт-реципиент значительно превосходил по продуктивности линию с дополнительным геном опушения листа, *HI2^{aesp}*. Большинство компонентов урожая у линии *i: C29 HI2^{aesp}* были значительно снижены независимо от условий подачи воды (таблица). Ингибирование развития растений наблюдалось начиная с кущения. Зерновая продуктивность как главного, так и вторичного побегов была понижена. Линия *i: C29 HI2^{aesp}* значительно уступала по

продуктивности линии *i: C29 h11, h13* с рецессивными генами. Сорт С29 снизил продуктивность вторичных побегов при засухе, но масса тысячи зерен уменьшилась незначительно. Линия *i: C29 h11, h13* отличалась от С29 сниженной продуктивностью вторичных побегов в нормальных условиях полива (см. таблицу). В условиях засухи линия превышала реципиент по длине стебля и главного колоса, количеству зерен во вторичных колосьях и общему количеству зерен. Однако масса тысячи зерен была ниже по сравнению с исходным сортом, то есть линия *i: C29 h11, h13* при дефиците воды формировала мелкие зерна.

Обсуждение

Плотное опушение листовой пластинки является морфологическим компонентом адаптации сорта С29 к условиям засухи (Ильина, 1989; Pshenichnikova et al., 2017, 2019). На его основе получены две почти изогенные линии с генетически модифицированной морфологией опушения листьев. Линия *i: C29 h11, h13* с рецессивными генами для этого признака характеризуется значительным уменьшением плотности (в 6.6–14 раз) и длины (в 2.5–4.7 раза) трихом на разных сторонах листа и в разных условиях по сравнению с С29. У линии *i: C29 HI2^{aesp}* с интрогрессией гена от *Ae. speltooides* плотность трихом на разных сторонах листа и в разных условиях увеличивалась в 1.08–1.17 раза, а длина трихом – в 1.6 раза по сравнению с реципиентом (Doroshkov et al., 2016; Pshenichnikova et al., 2019). Линии являются подходящей моделью для изучения роли, которую гены опушения играют в устойчивости пшеницы к стрессу. Ранее мы использовали эти линии для оценки связи между плотностью и длиной трихом и параметрами газообмена (Pshenichnikova et al., 2019). В условиях теплицы с естественным освещением скорость транспирации, устьичная проводимость и скорость фотосинтеза С29 и изогенных линий обратно пропорциональны плотности и длине трихом, что согласуется с данными N. Namaoka и коллег (2017) для риса. Самая высокая ЭИВ, рассчитанная

Средние значения компонентов урожая сорта Саратовская 29 и линий *i*: C29 *Hl2^{aesp}* и *i*: C29 *hl1, hl3* при нормальном поливе и засухе в условиях гидропонного полива и питания в искусственном грунте

Компонент урожая	Саратовская 29			<i>i</i> : C29 <i>Hl2^{aesp}</i>			<i>i</i> : C29 <i>hl1, hl3</i>		
	Нормальный полив	Засуха	ИУ, %	Нормальный полив	Засуха	ИУ, %	Нормальный полив	Засуха	ИУ, %
Число побегов	4.8±1.0	2.3±0.6	47.9	3.8±0.8***	2.4±0.7	63.2	4.3±1.0	2.6±0.6*	60.5
Длина стебля, см	95.8±6.8	79.9±10.4	83.4	89.6±9.1*	82.2±11.0	91.7	97.9±9.5	89.4±7.2*	91.3
Главный колос									
Длина, см	7.4±0.4	6.7±0.6	90.5	7.2±0.6	6.7±0.7	93.1	7.6±0.5	7.2±0.4***	94.7
Число зерен	26.5±3.1	25.8±3.7	97.4	22.5±3.9***	21.2±6.5**	94.2	25.3±4.6	25.9±3.5	102.0
Вес зерна, г	1.12±0.2	0.88±0.2	78.6	0.84±0.2***	0.65±0.2***	77.4	1.09±0.2	0.88±0.2	80.7
Вторичные побеги									
Число зерен	77.3±18.6	26.4±7.4	34.2	49.6±16.2***	20.8±8.7*	41.9	65.8±21.4	34.0±10.5**	51.7
Вес зерна, г	2.9±0.9	0.83±0.3	28.6	1.6±0.4***	0.67±0.2*	41.9	2.5±0.8*	1.0±0.4	40.0
Общая продуктивность растения									
Число зерен	101.3±24.7	50.1±8.5	49.5	61.8±26.7***	39.2±15.9**	63.4	93.6±26.5	57.6±12.3*	61.5
Вес зерна, г	4.0±1.0	1.7±0.4	42.5	2.5±0.5***	1.3±0.5**	52.0	3.6±1.0	1.9±0.6	52.8
Масса тысячи зерен, г	39.1±5.6	33.8±4.8	86.4	34.8±3.9**	29.8±5.9*	85.6	39.7±3.6	30.4±4.2*	76.6

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ по сравнению с C29 в каждом режиме полива.

как отношение скорости фотосинтеза к скорости транспирации, отмечена у C29. ЭИВ у линии с рецессивными генами опушения была в 1.9 раза ниже при оптимальных условиях и в 1.5 раза ниже при засухе по сравнению с C29, так как усиленная транспирация приводила к потере воды (Pshenichnikova et al., 2019).

Анализ параметров флуоресценции хлорофилла в данном эксперименте показал, что для C29 при адаптации к засухе характерно значительное увеличение параметров световой кривой ETR_{max} и I_k , увеличение параметра qP и значительное (на 30%) повышение коэффициента жизнеспособности Rfd . Эти данные указывают на то, что C29 может стабильно поддерживать функции ФСII, увеличивая в условиях засухи долю световой энергии, используемую для фотохимических реакций, и скорость ассимиляции фотосинтетического CO_2 (Lichtenthaler et al., 2005). Содержание фотосинтетических пигментов было также стабильно. В условиях засухи в листьях C29 наблюдалось значительное увеличение активности АПХ, ДГАР и ГР, что способствовало поддержанию структурной, функциональной целостности фотосинтетического аппарата и пула аскорбиновой кислоты (АСК) (Foyer, Shigeoka, 2011). В условиях дефицита воды АСК, помимо роли антиоксиданта, может быть донором электронов в фотосинтетическую электрон – транспортную цепь (Tóth et al., 2013). Таким образом, на клеточном уровне высокая засухоустойчивость C29 связана с повышенной антиоксидантной способностью и сохранением функций фотосинтетического аппарата.

Введение дополнительного гена опушения, *Hl2^{aesp}*, в генотип C29 привело к увеличению длины трихом (Pshenichnikova et al., 2019) и значительным изменениям физиологических реакций на дефицит воды. В отличие от

C29 параметры флуоресценции хлорофилла у линии *i*: C29 *Hl2^{aesp}* не изменились при засухе по сравнению с оптимальными условиями, за исключением небольшого повышения индекса жизнеспособности Rfd . В то же время активность АПХ, ГР и ДГАР в линии была снижена в 1.8, 3.6 и 1.8 раза соответственно по сравнению с C29. Поскольку поддержание окислительно-восстановительного состояния АСК путем рециркуляции является критическим в стрессовых условиях (Gallie, 2013), значительное снижение активности ДГАР в линии *i*: C29 *Hl2^{aesp}* могло привести к уменьшению содержания АСК. При низких концентрациях АСК активность АПХ в хлоропластах быстро снижается, что в свою очередь приводит к накоплению H_2O_2 и ограничению эффективности фотосинтеза в стрессовых условиях (Ishikawa, Shigeoka, 2008). Высокое содержание хлорофиллов и каротиноидов в оптимальных условиях, сопоставимое с C29, у линии *i*: C29 *Hl2^{aesp}* не сохранялось при засухе. Вероятно, значительное снижение продуктивности этой линии независимо от условий водного режима было связано с ингибированием физиологических процессов.

Рецессивное состояние генов *Hl1* и *Hl3* в линии *i*: C29 *hl1, hl3* также привело к значительному ослаблению антиоксидантного потенциала. Как и в предыдущей линии, активность СОД, АПХ, ГР и ДГАР в условиях засухи была снижена в 1.4, 1.9, 3.3 и 2.3 раза соответственно по сравнению с реципиентом C29. Параметры флуоресценции хлорофилла указывали на нарушения в функционировании фотосинтетического аппарата в условиях дефицита воды, поскольку значительно снизились значения $Y(II)$, ETR , ETR_{max} и qP (см. рис. 1). Индекс жизнеспособности Rfd снизился в условиях засухи на 20 %. Содержание пигментов также уменьшилось. Известно, что образова-

ние трихом и накопление фенольных соединений взаимосвязаны на молекулярном уровне (Pattanaik et al., 2014; Zhang, Schrader, 2017). Из-за диффузного осаждения фенольных соединений в стенках клеток трихомы обеспечивают защиту от ультрафиолетового излучения, выступая в качестве оптических фильтров и экранируя длины волн, которые могут повредить чувствительные ткани (Karabourniotis et al., 2020). Дальнейшее увеличение световой нагрузки может привести к еще более драматическим изменениям в работе фотосинтетического аппарата неопушенной линии. Изменения в компонентах урожайности линии i: C29 *h11*, *h13* были менее выраженными по сравнению с линией i: C29 *HL2^{aesp}*. При засухе она была даже более продуктивна, чем исходный сорт. Увеличение урожайности произошло за счет количества зерен вторичных колосьев. Однако линия дала более мелкое зерно, что негативно отражается на выходе муки. Можно предположить, что снижение функций фотосинтетического аппарата привело к нарушению синтеза простых углеводов в линии i: C29 *h11*, *h13*. Это в свою очередь снизило уровень синтеза крахмала, связанного с массой тысячи зерен и продуктивностью (Wang et al., 2019). Значения комплексного индекса устойчивости к засухе D, рассчитанного на основе физиологических параметров, у линий были в 6 раз ниже по сравнению с C29.

Генетическая регуляция образования трихом у пшеницы и ее место в общих процессах развития листа изучены недостаточно, чтобы однозначно объяснить причины негативного влияния манипуляций с генами *H11*, *H13* и *HL2^{aesp}* на устойчивость к дефициту воды. Моделью в этом отношении может быть хорошо изученная генетическая сеть развития и дифференциации трихом арабидопсиса, в которой участвуют десятки генов. Большинство продуктов этих генов выступают факторами транскрипции. Они являются компонентами регуляторной сети инициации трихом, образования корневых волосков и биосинтеза флавоноидов, вовлеченных в большое количество перекрестных регуляторных белок-белковых взаимодействий (Pesch, Hülskamp, 2004, 2009; Pattanaik et al., 2014; Zhang, Schrader, 2017). Например, P. Achard и коллеги (2008) показали, что уровни транскрипции СОД Cu/Zn позитивно модулируются белками семейства регуляторных белков DELLA. При этом белки DELLA взаимодействуют с комплексом WD-repeat/bHLH/MYB, который участвует в регуляции развития трихом (Qi et al., 2014). Транскрипционные факторы GIS и GIS2, играющие важную роль в интеграции передачи сигналов цитокинина и гиббереллина, имеют регуляторные взаимодействия с белками сети инициации трихом GL1, SRY и GL3, тем самым влияя на функционирование иницирующего комплекса образования трихом (Gan et al., 2007). Эти и другие представленные в литературе примеры указывают на то, что белки, участвующие в формировании трихом, связаны перекрестными регуляторными взаимодействиями с факторами транскрипции, которые регулируют гормональную передачу сигналов, стрессовые реакции, включая антиоксидантную реакцию и программы развития. Основываясь на этих знаниях, мы предполагаем, что выявленные в нашей работе эффекты негативного влияния рецессивного состояния генов *H11* и *H13* или интрогрессии гена *HL2^{aesp}*

на устойчивость к засухе и урожайность пшеницы связаны с нарушениями перекрестных регуляторных межбелковых взаимодействий, сложившихся в генотипе сорта C29 в процессе искусственного отбора в засушливых условиях.

Заключение

Изменения состава и аллельного состояния генов *HL* повлияли не только на количественные характеристики опушения листьев, но и стабильность содержания фотосинтетических пигментов, параметров флуоресценции хлорофилла, активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла и продуктивности почти изогенных линий хлебной пшеницы. Комплексный индекс устойчивости к засухе D, рассчитанный на основе физиологических показателей, был в 6 раз ниже в линиях по сравнению с C29. Независимо от условий водоснабжения все компоненты урожая значительно уменьшились в линии i: C29 *HL2^{aesp}*, в линии i: C29 *h11*, *h13* снизилась масса тысячи зерен. Предполагается, что эти эффекты связаны с изменениями в перекрестных регуляторных взаимодействиях белков, участвующих в формировании трихом, и факторов транскрипции, регулирующих рост, развитие и реакции на факторы стресса.

Список литературы / References

- Ильина Л.Г. Селекция яровой мягкой пшеницы на юго-востоке. Саратов: изд-во Саратовского университета, 1989.
[Ilyina L.G. Breeding of spring bread wheat in southeastern regions. Saratov: Saratov University Publ., 1989. (in Russian)]
- Achard P., Renou J.-P., Berthomé R., Harberd N.P., Genschik P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr. Biol.* 2008;18: 656-660. DOI 10.1016/j.cub.2008.04.034.
- Bickford C.B. Ecophysiology of leaf trichomes. *Funct. Plant Biol.* 2016;43(9):807-814. Available at: https://digital.kenyon.edu/biology_publications/85.
- Cao X., Jiang F., Wang X., Zang Y., Wu Z. Comprehensive evaluation and screening for chilling-tolerance in tomato lines at the seedling stage. *Euphytica.* 2015;205:569-584. DOI 10.1007/s10681-015-1433-0.
- Dobrovolskaya O.B., Pshenichnikova T.A., Arbusova V.S., Lohwasser U., Röder M.S., Börner A. Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the Triticeae. *Euphytica.* 2007;155(3):285-293. DOI 10.1007/s10681-006-9329-7.
- Doroshkov A.V., Afonnikov D.A., Dobrovolskaya O.B., Pshenichnikova T.A. Interactions between leaf pubescence genes in bread wheat as assessed by high throughput phenotyping. *Euphytica.* 2016;207: 491-500. DOI 10.1007/s10681-015-1520-2.
- Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Afonnikov D.A. Morphological and genetic characteristics of leaf hairiness in wheat (*Triticum aestivum* L.) as analyzed by computer aided phenotyping. *Russian J. Genet.* 2011;47:739-743. DOI 10.1134/S1022795411060093.
- Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 2011;155: 93-100. DOI 10.1104/pp.110.166181.
- Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *J. Exp. Bot.* 2013; 64(2):433-43. DOI 10.1093/jxb/ers330.
- Gan Y., Liu C., Yu H., Broun P. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by Arabidopsis transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development.* 2007; 134(11):2073-2081. DOI 10.1242/dev.005017.
- Goltsev V.N., Kalaji H.M., Paunov M., Baba W., Horaczek T., Mojski J., Kociel H., Allakhverdiev S.I. Variable chlorophyll fluorescence and

- its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016;63:869-893. DOI 10.1134/S1021443716050058.
- Hamaoka N., Yasui H., Yamagata Y., Inoue Y., Furuya N., Araki T., Ueno O., Yoshimura A. A hairy-leaf gene, BLANKET LEAF, of wild *Oryza nivara* increases photosynthetic water use efficiency in rice. *Rice.* 2017;10(1):20. DOI 10.1186/s12284-017-0158-1.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Ehleringer J., Björkman O., Mooney H. Leaf pubescence: effects on absorbance and photosynthesis in a desert shrub. *Science.* 1976; 192(4237):376-377. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.192.4237.376>.
- Ishikawa T., Shigeoka S. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008;72:1143-1154. DOI 10.1271/bbb.80062.
- Karabourniotis G., Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Bresta P. Protective and defensive roles of non-glandular trichomes against multiple stresses: structure-function coordination. *J. For. Res.* 2020;31:1-12. DOI 10.1007/s11676-019-01034-4.
- Konrad W., Burkhardt J., Ebner M., Roth-Nebelsick A. Leaf pubescence as a possibility to increase water use efficiency by promoting condensation. *Ecohydrology.* 2015;8:480-492. DOI 10.1002/eco.1518.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Knapp M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica.* 2005;43:379-393. DOI 10.1007/s11099-005-0062-6.
- Maistrenko O.I. Identification and localization of genes controlling leaf pubescence of young common wheat plants. *Russian J. Genet.* 1976; 12(1):5-15.
- Osipova S., Permyakov A., Permyakova M., Pshenichnikova T., Verkhoturov V., Rudikovskiy A., Rudikovskaya E., Shishparenok A., Doroshkov A., Börner A. Regions of the bread wheat D genome associated with variation in key photosynthesis traits and shoot biomass under both well watered and water deficient conditions. *J. Appl. Genet.* 2016;6:553-559. DOI 10.1007/s13353-015-0315-4.
- Pattanaik S., Patra B., Singh S.K., Yuan L. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 2014;5:259. DOI 10.3389/fpls.2014.00259.
- Pesch M., Hülskamp M. Creating a two-dimensional pattern de novo during *Arabidopsis* trichome and root hair initiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004;14:422-427. DOI 10.1016/j.gde.2004.06.007.
- Pesch M., Hülskamp M. One, two, three... models for trichome patterning in *Arabidopsis*? *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009;12(5):587-592. DOI 10.1016/j.pbi.2009.07.015.
- Pshenichnikova T.A., Doroshkov A.V., Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Efimov V.M., Afonnikov D.A. Quantitative characteristics of pubescence in wheat (*Triticum aestivum* L.) are associated with the parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence under conditions of normal and limited water supply. *Planta.* 2019;249(3):839-847. DOI 10.1007/s00425-018-3049-9.
- Pshenichnikova T.A., Doroshkov A.V., Simonov A.V., Afonnikov D.A., Börner A. Diversity of leaf pubescence in bread wheat and relative species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2017;64:1761-1773. DOI 10.1007/s10722-016-0471-3.
- Pshenichnikova T.A., Lapochkina I.F., Shchukina L.V. The inheritance of morphological and biochemical traits introgressed into common wheat (*Triticum aestivum* L.) from *Aegilops speltoides* Tausch. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2007;54:287. DOI 10.1007/s10722-005-4499-z.
- Qi T., Huang H., Wu D., Yan, Qi Y., Song S, Xie D. *Arabidopsis* DELLA and JAZ proteins bind the WD-Repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *Plant Cell.* 2014;26(3):1118-1133. DOI 10.1105/tpc.113.121731.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Stryastaya A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration. Springer, Dordrecht, 2004;19:321-362.
- Taketa S., Chang C.L., Ishii M., Takeda K. Chromosome arm location of the gene controlling leaf pubescence of a Chinese local wheat cultivar 'Hong-mang-mai'. *Euphytica.* 2002;125:141-147. DOI 10.1023/A:1015812907111.
- Tóth S.Z., Schansker G., Garab G. The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol. Plant.* 2013;148(2): 161-175. DOI 10.1111/ppl.12006.
- Wang Y., Hou J., Liu H., Li T., Wang K., Hao Ch., Liu H., Zhang X. *TaBT1*, affecting starch synthesis and thousand kernel weight, underwent strong selection during wheat improvement. *J. Exp. Bot.* 2019; 70(5):1497-1511. DOI 10.1093/jxb/erz032.
- Zhang B., Schrader A. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-dependent regulation of flavonoid biosynthesis. *Plants.* 2017;6(4):65. DOI 10.3390/plants6040065.

ORCID ID

S.V. Osipova orcid.org/0000-0001-7025-8590
A.V. Rudikovskii orcid.org/0000-0001-8567-0318
A.V. Permyakov orcid.org/0000-0003-0002-5470
E.G. Rudikovskaya orcid.org/0000-0001-5709-2370
M.D. Permyakova orcid.org/0000-0002-0259-8531
V.V. Verkhoturov orcid.org/0000-0003-2979-9867
T.A. Pshenichnikova orcid.org/0000-0001-5639-916X

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00481. Исследование проводилось на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия). Используемые линии пшеницы выращивались в Центре коллективного пользования «Лаборатория искусственного растениеводства» Института цитологии и генетики СО РАН при поддержке бюджетного проекта № 0324-2019-0039-С-01 и хранятся в коллекции ГенАгро Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Мы благодарны Н.М. Ковалевой и А.К. Чистяковой за квалифицированную техническую помощь.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.06.2020. После доработки 28.08.2020. Принята к публикации 06.09.2020.