


Использование метаболомного подхода для поиска форм *Aegilops tauschii* Coss. из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова, устойчивых к грибным патогенам

Т.В. Шеленга , Л.Л. Малышев, Ю.А. Керв, Т.В. Дюбенко, А.В. Конарев, В.И. Хорева, М.Х. Белоусова, М.А. Колесова, Н.Н. Чикида

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

 e-mail: tatianashelenga@yandex.ru

Аннотация. Расширение генетического разнообразия доноров устойчивости *Triticum* L. к биотическим факторам среды – актуальная задача, которую возможно решить благодаря использованию в селекционных программах дикорастущих родичей пшеницы, в частности *Aegilops tauschii* Coss. По существующим представлениям, последний – донор генома D мягкой пшеницы *T. aestivum* L. и носитель ряда ценных селекционных признаков. Это значительно облегчает скрещивание *Ae. tauschii* с мягкой пшеницей. Виды рода *Aegilops* L. являются донорами эффективных генов устойчивости пшеницы к грибным болезням. Так, от видов *Ae. tauschii* в геном *T. aestivum* L. успешно интродуцированы гены, детерминирующие устойчивость мягкой пшеницы к возбудителям ржавчины. Целью нашего исследования было выявление различий по метаболомным профилям форм (генотипов) *Ae. tauschii*, устойчивых и неустойчивых к грибным патогенам (*Puccinia triticina* f. sp. *tritici* и *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*), что позволит использовать такие показатели в качестве биохимических маркеров устойчивости. Сравнительный анализ групп образцов *Ae. tauschii* показал, что метаболомные профили устойчивых и неустойчивых к грибным патогенам форм достоверно различаются между собой по содержанию небелковых аминокислот, многоатомных спиртов, фитостеролов, ацилглицеролов, моно- и олигосахаридов, гликозидов, фенольных соединений (гидрохинона, кемпферола) и др. Последнее подтверждается ранее полученными нами данными о связи устойчивости овса (*Avena sativa* L.) к возбудителям фузариоза с определенными компонентами их метаболомного профиля: ацилглицеролами, небелковыми аминокислотами, галактинолом и др. Таким образом, наши исследования еще раз подтвердили возможность и эффективность применения метаболомного анализа для скрининга генетического разнообразия образцов коллекции ВИР, в частности *Ae. tauschii*, с целью выделения форм, имеющих в метаболомном профиле набор соединений, характеризующих их как устойчивые. К таковым относятся образцы *Ae. tauschii* с высоким содержанием пипеколиновых кислот, ацилглицеролов, галактинола, стигмастерола, глицерола, азелаиновой и пирогалловой кислот, кампестерола, гидрохинона и др., которые могут быть использованы для создания сортов пшеницы и тритикале, высокоустойчивых к грибным патогенам – возбудителям мучнистой росы, бурой и желтой ржавчины.


Ключевые слова: *Aegilops tauschii* Coss; метаболомный подход; устойчивость к болезням; грибные патогены.

Для цитирования: Шеленга Т.В., Малышев Л.Л., Керв Ю.А., Дюбенко Т.В., Конарев А.В., Хорева В.И., Белоусова М.Х., Колесова М.А., Чикида Н.Н. Использование метаболомного подхода для поиска форм *Aegilops tauschii* Coss. из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова, устойчивых к грибным патогенам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(3):252-258. DOI 10.18699/VJ20.618

Metabolomic approach to search for fungal resistant forms of *Aegilops tauschii* Coss. from the VIR collection

T.V. Shelenga , L.L. Malyshev, Yu.A. Kerv, T.V. Diubenko, A.V. Konarev, V.I. Horeva, M.K. Belousova, M.A. Kolesova, N.N. Chikida

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

 e-mail: tatianashelenga@yandex.ru

Abstract. Broadening of the genetic diversity of donors of resistance to biotic environmental factors is a challenging problem concerning *Triticum* L., which can be solved by using wild relatives of wheat, in particular, *Aegilops tauschii* Coss., in breeding programs. This species, believed to be the donor of D genome of common wheat (*T. aestivum* L.), is a source of some traits important for breeding. This greatly facilitates the possibility of crossing *Ae. tauschii* with common wheat. *Aegilops* L. species are donors of effective genes for resistance to fungal diseases in wheat. For instance, genes that determine resistance to rust agents in common wheat were successfully introgressed from *Ae. tauschii* into the genome of *T. aestivum* L. The aim of our study was to identify differences in metabolomic pro-

files of *Ae. tauschii* forms (genotypes), resistant or susceptible to such fungal pathogens as *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* and *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. These indicators may be used as biochemical markers of resistance. A comparative analysis of groups of *Ae. tauschii* accessions showed that metabolomic profiles of the forms with or without resistance to fungal pathogens differed significantly in the contents of nonproteinogenic amino acids, polyols, phytosterols, acylglycerols, mono- and oligosaccharides, glycosides, phenolic compounds (hydroquinone, kempferol), etc. This fact was consistent with the previously obtained data on the relationship between *Fusarium* resistance in oats (*Avena sativa* L.) and certain components of the metabolomic profile, such as acylglycerols, nonproteinogenic amino acids, galactinol, etc. Thus, our studies once again confirmed the possibility and effectiveness of the use of metabolomic analysis for screening the genetic diversity of accessions in the VIR collection, of *Ae. tauschii* in particular, in order to identify forms with a set of compounds in their metabolomic profile, which characterize them as resistant. *Ae. tauschii* accessions with a high content of pipelicolic acids, acylglycerols, galactinol, stigmasterol, glycerol, azelaic and pyrogallic acids, campesterol, hydroquinone, etc., can be used for creating wheat and triticale cultivars with high resistance to fungal pathogens causing powdery mildew, brown rust, and yellow rust.
Key words: *Aegilops tauschii* Coss.; metabolomic approach; disease resistance; fungal pathogens.

For citation: Shelenga T.V., Malyshev L.L., Kerv Yu.A., Diubenko T.V., Konarev A.V., Horeva V.I., Belousova M.K., Kolesova M.A., Chikida N.N. Metabolomic approach to search for fungal resistant forms of *Aegilops tauschii* Coss. from the VIR collection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(3): 252-258. DOI 10.18699/VJ20.618

Введение

Пшеница (*Triticum* L.) – одна из наиболее значимых сельскохозяйственных культур в мире, в том числе в Российской Федерации. У большинства населения земного шара она входит в число основных продуктов питания. Урожайность и качества пшеницы в значительной степени зависят от устойчивости сортов к стрессовым факторам среды, включая грибные болезни. Большая часть возделываемых зарубежных и отечественных сортов восприимчивы к болезням, вызываемым возбудителями стеблевой (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn) и бурой ржавчины (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm f. sp. *triticea* Erikss.), мучнистой росы (*Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* Marchal.) и септориоза (*Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schroet. (= *Septoria tritici*); *Phaeosphaeria nodorum* (E. Muell.) Hedjar. (= *Leptosphaeria nodorum* E. Muell., = *Septoria nodorum* (Berk.)). Потери урожая могут достигать до 40 % (Афанасенко, 2010; Коломиец и др., 2017). Создание сортов пшеницы, устойчивых к наиболее вредоносным грибным патогенам, – эффективный способ борьбы с ними.

Неисчерпаемым источником генов устойчивости для создания высокоурожайных и устойчивых к факторам окружающей среды сортов являются дикие родичи культурных форм пшеницы, ржи, ячменя, овса и др. В эволюционном отношении виды рода *Aegilops* L. близки к видам рода *Triticum* L. (Дорофеев, 1971; Мигушова, 1975; Конарев, 1980; Liu et al., 2015; Arora et al., 2017). Однако доноры, используемые в селекционном процессе, в большинстве случаев характеризуются одними и теми же генами устойчивости, что со временем приводит к появлению «адаптированных» форм патогенов, поражающих сорта, ранее считавшиеся невосприимчивыми. Многие известные гены устойчивости от *Ae. tauschii* Coss. не применяются на практике для улучшения сортов пшеницы, поскольку их защитный эффект считается невысоким (Pretorius, 1997; Kolmer, Anderson, 2011). Расширение генетического разнообразия доноров устойчивости к грибным болезням пшеницы поможет решить такую задачу, и в этом важнейшую роль играет мировая коллекция дикорастущих родичей пшеницы Всероссийского института

генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) (Вавилов, 1919).

Коллекция рода *Aegilops* L. ВИР насчитывает более 5000 образцов различного эколого-географического происхождения и представлена тринадцатью диплоидными, десятью тетраплоидными и пятью гексаплоидными видами. За период с 1956 г. по настоящее время из коллекции выделены виды, обладающие комплексным иммунитетом к грибным болезням: диплоидные – *Ae. mutica* Boiss., *Ae. speltoides* Tausch., *Ae. aucheri* Boiss., *Ae. bicornis* (Forsk.) Jaub. et Spach., *Ae. comosa* Sibth. & Sm., *Ae. uniaristata* Vis., *Ae. heldreichii* Hozm.; тетраплоидные – *Ae. ovata* L., *Ae. triaristata* Wild., *Ae. ventricosa* Tausch., *Ae. variabilis* Eig. Подобное разнообразие генетического материала позволяет проводить отбор необходимых генотипов для последующего получения сортов пшеницы с улучшенными биологическими характеристиками. *Ae. tauschii* является носителем генома D, близкого геному полиплоидной пшеницы, что значительно облегчает скрещивание *Ae. tauschii* с мягкой пшеницей при передаче эффективных генов устойчивости к болезням (Добровольская и др., 2017). Кроме того, мука таких сортов обладает высокими хлебопекарными качествами (Семенова и др., 1973). На сегодняшний день в геном *T. aestivum* L. успешно интрогрессировано большинство эффективных генов, детерминирующих устойчивость к возбудителям ржавчины и темно-бурой листовой пятнистости (McIntosh et al., 1995; Mujeeb-Kazi et al., 2001; Yang et al., 2003; Adonina et al., 2012).

В последнее время для фенотипирования различных видов растений и изучения устойчивости широко используется неспецифический метаболомный анализ, что дает уникальную возможность провести сканирование в исходном материале широкого спектра соединений, составляющих метаболомный профиль, и дать объективную (с помощью метаболомных маркеров) оценку реакции растения на воздействия окружающей среды (Конарев и др., 2015). Этот подход все чаще применяется для выявления отдельных метаболитов или их групп, которые могут характеризовать защитный статус исследуемого объекта, благодаря чему можно выделить образцы, устойчивые к

стрессорам внешней среды (Taji et al., 2006; Chakraborty, Newton, 2011; Valitova et al., 2016; Loskutov et al., 2017). В ВИР им. Н.И. Вавилова проводится изучение метаболомных профилей различных культур из коллекции ВИР. Исследованы дикорастущие и культурные, устойчивые и неустойчивые к фузариозу формы овса, показаны значительные различия между ними по ряду соединений (ацилглицеролы, небелковые аминокислоты, галактинол и др.) (Loskutov et al., 2017; Лоскутов и др., 2019). Тотальный скрининг дикорастущих форм различных сельскохозяйственных культур позволит сформировать модель «метаболомного профиля устойчивого сорта».

Цель нашего исследования – выявление метаболомных маркеров для поиска среди генетического разнообразия диких родичей форм с эффективными генами устойчивости, результативно интродуцируемыми в геном мягкой пшеницы для использования в селекции. Одной из задач было изучение метаболомных профилей образцов вида *Ae. tauschii*, неустойчивых и устойчивых к возбудителям листовой ржавчины и мучнистой росы, для выявления метаболитов, маркирующих восприимчивость *Ae. tauschii* к грибным патогенам. Полученные результаты позволяют сократить сроки и оптимизировать отбор исходного материала при создании высокоустойчивых к грибным патогенам сортов пшеницы.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили 50 образцов *Ae. tauschii* из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова, выращенные на территории Дагестанской опытной станции (ДОС) ВИР в 2017 г., собранные в фазу полной спелости (см. таблицу). Выборка сформирована из основных разновидностей *Ae. tauschii* из коллекции ВИР с учетом наиболее полной эколого-географической представленности.

Полевое изучение образцов вида *Ae. tauschii* проводили на ДОС ВИР на делянках площадью 1 м² (агротехника поливного земледелия) по стандартным методикам ВИР (Мережко и др., 1999). В период вегетации температура воздуха составила в среднем +20.4 °С, количество осадков – 15.4–16.3 мм, сумма активных температур за год – 3400–4500 °С. Полевую оценку пораженности образцов *Ae. tauschii* грибными патогенами выполняли в условиях ДОС ВИР, лабораторную – в отделе генетики ВИР по методам, принятым в ВИР (Тырышкин и др., 2004). Устойчивость определяли по балльной шкале: 9 – отсутствие симптомов болезни или мелкие некротические пятна; 7 – микроскопические пустулы, окруженные зоной некроза; 5 – мелкие пустулы, окруженные широкой зоной некроза; 3 – пустулы среднего размера, окруженные хлоротической тканью; 1 – крупные пустулы, образуют сплошные зоны поражения. К устойчивым относили растения с оценкой 9–7 баллов, к восприимчивым – 5–1. Наблюдения проводили каждые 5 дней в течение вегетационного периода. Для каждого образца выводилась интегральная оценка по наибольшему баллу поражения болезнями (см. таблицу).

Метаболомные профили зерна образцов *Ae. tauschii* изучали в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР (пять биологических и три аналитических повторности)

Показатели устойчивости к листовым болезням образцов вида *Ae. tauschii* Coss.

Номер по каталогу ВИР	Подвид (ssp.), разновидность (var.)	Полевая устойчивость к болезням, баллы		
		Мучнистая роса	Ржавчина бурая	желтая
Азербайджан				
к-101	var. <i>typica</i>	9	3	3
к-108	ssp. <i>strangulata</i>	9	7	7
к-112		9	9	9
к-113		9	9	9
к-291		9	3	7
к-315		9	9	3
к-336		9	9	9
к-338		9	3	3
к-340		9	3	3
к-520		9	9	9
к-617		9	5	3
к-1098	var. <i>typica</i>	9	5	9
к-1102	var. <i>meyeri</i>	9	9	9
к-1111	ssp. <i>strangulata</i>	9	9	3
к-1112		9	9	9
к-1155		9	9	1
к-1723		9	9	9
к-1783	var. <i>meyeri</i>	9	3	3
Армения				
к-527	ssp. <i>strangulata</i>	9	9	5
к-1520	var. <i>typica</i>	9	7	9
к-2271		9	9	7
к-3187		9	9	9
Афганистан				
к-994	var. <i>typica</i>	9	3	3
к-1619		9	3	5
к-1659		9	9	9
к-1740		9	9	9
Грузия				
к-608	var. <i>meyeri</i>	9	3	3
к-1216		9	9	9
Дагестан				
к-1022	var. <i>typica</i>	9	5	3
к-1770	ssp. <i>strangulata</i>	9	9	9
Иран				
к-1657	ssp. <i>strangulata</i>	9	3	3
к-1662		9	9	9
к-1958	var. <i>typica</i>	9	9	9
к-1966	ssp. <i>strangulata</i>	9	9	7
к-4043		9	9	7
к-4049		9	9	7
к-4056		9	9	7
Киргизия				
к-674	var. <i>meyeri</i>	9	5	1
к-677		9	5	1
Нахичевань				
к-553	var. <i>meyeri</i>	9	3	1
к-560		9	3	1
к-1172		9	9	1
к-1498		9	1	3
Нагорно-Карабахская автономная область				
к-494	ssp. <i>strangulata</i>	9	9	7
к-497		9	9	9
Сирия				
к-4564	ssp. <i>strangulata</i>	9	3	3
Туркменистан				
к-423	ssp. <i>strangulata</i>	9	7	3
Узбекистан				
к-394	var. <i>meyeri</i>	9	5	3
к-396		9	3	3
к-663		9	1	3

(Loskutov et al., 2017). Зерна очищали от колосковых чешуй и размалывали; 50 мг муки образца гомогенизировали с 500 мкл метанола, пробу настаивали в течение 30 суток при 5–6 °С. 100 мкл экстракта выпаривали досуха на установке CentriVar Concentrator фирмы Lab-conco (США). Сухой остаток силилировали с помощью бис(триметилсилил)трифторацетамида 40 мин при 100 °С. Триметилсилильные эфиры метаболитов разделяли с помощью капиллярной колонки HP-5MS 5 % фенил 95 % метилполисилоксан (30.0 м, 250.00 мкм, 0.25 мкм) на газовом хроматографе Agilent 6850 с квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 5975B VL MSD (Agilent Technologies, США). Условия проведения анализа: скорость потока инертного газа через колонку 1.5 мл/мин. Программа нагрева колонки: от +70 до +320 °С, скорость нагрева 4 °С/мин. Температура детектора масс-спектрометра +250 °С, температура инжектора +300 °С, объем вводимой пробы 1.2 мкл. Внутренним стандартом служил раствор трикозана в пиридине (1 мкг/мл).

Полученные результаты обрабатывали в программах UniChrom и AMDIS. Идентификацию пиков осуществляли с помощью библиотек масс-спектров NIST 2010 научно-исследовательского парка Санкт-Петербургского университета и Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Puzanskiy et al., 2015). Значения содержания биохимических показателей приведены в ppm (мкг/г).

Статистическая обработка данных выполнена в пакете программ Statistica 7.0. Из первоначального набора признаков методом однофакторного дисперсионного анализа были выделены признаки (метаболиты), по содержанию которых группы образцов *Ae. tauschii*, устойчивых и неустойчивых к изучаемым патогенам, достоверно различались между собой. Для оценки информативности признаков (метаболитов) устойчивости образцов *Ae. tauschii* использовали дискриминантный анализ.

Результаты

Метаболомные профили зерновок *Ae. tauschii*, устойчивых и неустойчивых к грибным патогенам, различались по ряду показателей. Больше содержание органических кислот отмечено у устойчивых форм *Ae. tauschii* (1190 ppm) по сравнению с неустойчивыми (1090 ppm). Доминирующие органические кислоты в метаболомном профиле зерновок *Ae. tauschii* представлены яблочной (203 и 164 ppm соответственно) и метилмалоновой кислотами (168 и 153 ppm). Показатели галактуроновой кислоты в зерновках образцов устойчивых и неустойчивых форм составили 102 и 79 ppm соответственно, молочной – 78 и 76, гулоновой – 43 и 48, глюконовой – 25 и 44, азелаиновой – 30 и 47, янтарной – 32 и 38, щавелевой – 28 и 27, фумаровой – 42.8 и 41.0, рибоновой – 19.9 и 13.0, глицериновой – 11.5 и 10.0 ppm. Сумма минорных кислот (концентрация не выше 10 ppm) для устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii* была равна 24.0 ppm. Наличие в числе идентифицированных кислот фумаровой может быть также связано с особенностями процесса пробоподготовки, так как она является продуктом деградации яблочной кислоты. Все реакции обмена в растениях происходят с участием фосфорной кислоты и ее производных, что объясняет довольно высокое ее содержание в исследуемых

образцах (320.2 ppm для устойчивых форм и 277.0 ppm для неустойчивых); показатели метилфосфата составили 64.0 и 56.0 ppm соответственно.

Свыше половины (60 %) свободных аминокислот у устойчивых и неустойчивых образцов *Ae. tauschii* пришлось на долю небелковых аминокислот: 3-гидрокси-пипеколиновая (137.2 и 116.6), пипеколиновая (0.5 и 0.3) и 5-гидрокси-пипеколиновая (0.7 и 0.7 ppm соответственно). Остальные аминокислоты были представлены «незаменимыми» (валин, изолейцин, треонин, фенилаланин, триптофан) и «заменимыми» (α -аланин, глицин, серин, пролин, оксипролин, аспаргин, глутамин, тирозин, аспарагиновая, глутаминовая кислоты). Доминирующими являлись: аспарагин (18.7 и 13.4), валин (15.6 и 16.0), α -аланин (10.6 и 13.1), глутамин (12.3 и 9.0) и глутаминовая кислота (5.7 и 5.5 ppm). Для остальных аминокислот значения не превышали 4.0 ppm. Суммы свободных аминокислот (кроме небелковых) у изученных устойчивых и неустойчивых к грибным патогенам форм эгилопсов существенно не различались (88.4 и 85.3 ppm соответственно).

Более высокая концентрация многоатомных спиртов и фитостеролов наблюдалась у неустойчивых форм *Ae. tauschii* (341.8 и 336.5 ppm соответственно). В их зерновках преобладали глицерол, ксилитол, дульцитол, мио-инозитол и его производные (59.5, 84.4, 70.4, 23.4 и 9.6 ppm соответственно). У устойчивых форм преобладал галактинол (92.5 ppm). Фитостеролы в основном были представлены ситостеролом, стигмастеролом и кампестеролом. Для неустойчивых форм их значения составили 219.8, 85.8 и 30.9 ppm соответственно, а для устойчивых – 160.3, 44.5 и 22.7 ppm.

Среди жирных кислот зерновок устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii* доминировали пальмитиновая (584.7 и 602.0), стеариновая (173.5 и 187.0), олеиновая (493.9 и 520.0) и линолевая (1515.0 и 1545.0 ppm соответственно). Существенных различий в значениях отдельных жирных кислот и их суммарных показателях (2943.3 и 3064.0 ppm) не выявлено.

Для зерновок устойчивых форм *Ae. tauschii* установлено более высокое содержание ацилглицеролов (954.0 и 745.6 ppm), в основном за счет диацилглицерола – ДАГ (631.0 и 464.0). Количество моноацилглицеролов МАГ-2 С18:3 и МАГ-1 С18:1 тоже было выше у устойчивых форм (188.0 по сравнению со 152.7 ppm и 54.0 по сравнению с 34.2), тогда как содержание МАГ-1 С16:0 – у неустойчивых (94.7 и 81.0 ppm соответственно).

Моносахара зерновок *Ae. tauschii* были представлены преимущественно гексозами (более 80 %). Для устойчивых форм эгилопсов эти значения были выше (1164.8), чем для неустойчивых (1026.7 ppm). Из гексоз у устойчивых форм преобладала глюкоза (819.8), у неустойчивых – глюкоза (455.4) и фруктоза (318.1 ppm). Пентозы (рибоза, ксилоза) в сумме не превышали 40 ppm. Содержания глицерол-3 фосфата у устойчивых и неустойчивых форм эгилопсов не имели существенных различий – 42.8 и 37.4 ppm соответственно.

Количество олигосахаров зерновок устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii* составило 13480.6 и 14920.0 ppm соответственно. В основном они были представлены сахарозой и раффинозой, при этом содержание

сахарозы оказалось выше у неустойчивых форм (11 604.9), а раффинозы – у устойчивых (4882.0 ppm).

В образцах устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii* выявлена производная форма сахаров, идентифицированная как метил-D-галактопиранозид (169.2 и 84.4 ppm соответственно).

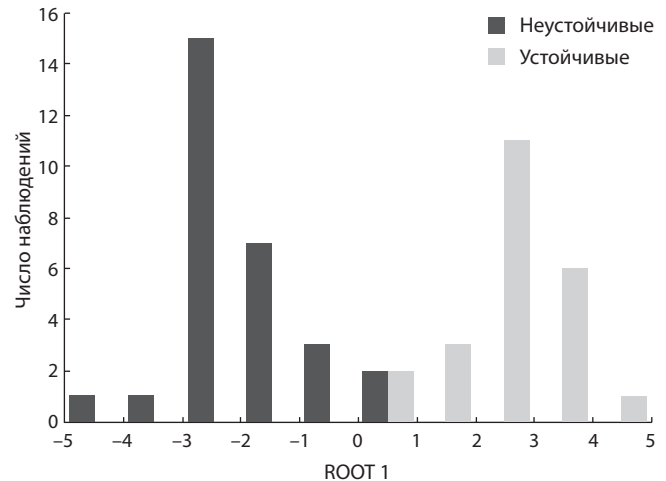
В группе фенольных соединений максимальное содержание установлено для гидрохинона (93.6 ppm для устойчивых образцов и 74.0 ppm для неустойчивых). Показатели кемпферола, пирогалловой, 2,3-дигидроксибензойной, салициловой, кофейной кислот и α -токоферола составили: 29.1, 1.5, 0.2, 0.3, 0.4 и 0.4 ppm для устойчивых форм и 14.0, 1.3, 0.2, 0.2, 0.4 и 0.3 ppm для неустойчивых.

Значения вышеперечисленных показателей отражают активность обменных процессов в зерновках *Ae. tauschii*, характеризующую первичный и вторичный метаболизм (обмен азотсодержащих соединений, в том числе аминокислот, цикл Кребса, карбогидратный обмен, гликолиз, пентозофосфатный цикл, обмен сигнальных соединений – инозитолов, шикиматный и глиоксилатный пути и др.).

Статистическая обработка полученных данных показала, что метаболом неустойчивых форм *Ae. tauschii* с различной степенью достоверности отличается от метаболома устойчивых форм по ряду показателей. Устойчивые формы *Ae. tauschii* были разделены на три группы: первая объединила образцы, устойчивые ко всем рассматриваемым нами возбудителям, вторая – только к бурой и желтой листовой ржавчине, третья – к мучнистой росе. Метаболиты всех устойчивых форм с высокой степенью достоверности ($p = 0.05$) отличались от таковых неустойчивых по небелковым аминокислотам (пипеколиновой и 3-гидроксипипеколиновой), глицеролу, ононитолу, галактинолу, ситостеролу, стигмастеролу, бегеновой кислоте, ДАГ, МАГ-1 C16:1, рибозе, сорбозе, сахарозе, мальтозе и гидрохинону; с достоверностью $0.1 > p > 0.05$ – по фумаровой, галактуроновой, глюконовой кислотам, треонину, дульцитолу, маннитолу, хиро- и мио-инозитолу, пеларгоновой и арахиновой жирным кислотам, МАГ-1 C18:1 и фруктозе. При $p = 0.05$ метаболиты образцов второй группы имели отличия по фосфорной, шавелевой, пирогалловой, азелаиновой, 5-гидроксипипеколиновой кислотам, дульцитолу, кампестеролу, ундециловой и бегеновой жирным кислотам, МАГ-1 C18:1; при более низкой достоверной вероятности ($0.1 > p > 0.05$) – по 3-гидроксипипеколиновой кислоте, МАГ-2 C18:3 и метил-D-галактопиранозиду. Третья группа выделялась по показателям фумаровой, пеларгоновой, пипеколиновой кислот, ононитола, галактинола и гидрохинона при $p = 0.05$, а по значениям треонина, дульцитола, мио-инозитола, гидроксикактозеновой кислоты и сахарозы – при $0.1 > p > 0.05$.

Установлена достоверная связь между показателями устойчивости к грибным патогенам и группой небелковых аминокислот, многоатомных спиртов, фитостеролов, ацилглицеролов, моно- и олигосахаридов, гликозидов, фенольных соединений (гидрохинон, кемпферол). Между показателями суммы свободных аминокислот, органических кислот и чувствительностью к грибным патогенам связи не выявлено.

Дискриминантный анализ метаболомных данных образцов зерновок *Ae. tauschii*, взятых в исследование, про-



Гистограмма распределения устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii* по величине собственных значений канонической переменной.

демонстрировал их разделение по величине коэффициента канонической переменной на две основные группы: устойчивые и неустойчивые к грибным патогенам. Наиболее «информативно ценными» признаками, с точностью до 98 % подтверждающими различие метаболитных профилей и определяющими принадлежность образцов *Ae. tauschii* к группе устойчивых или неустойчивых, оказались показатели стигмастерола, МАГ, ДАГ, пеларгоновой, галактуроновой, 3-гидроксипипеколиновой кислот, галактинола, глицерола, сорбозы, мальтозы, тирозина и гликозидов. Среди вышеперечисленных признаков наиболее статистически значимыми для неустойчивых форм оказались показатели стигмастерола и мальтозы, а для устойчивых – ДАГ.

С использованием «информативно ценных» признаков и классификационной функции был проведен анализ совпадения предполагаемой и реальной принадлежности изучаемых образцов *Ae. tauschii* к устойчивым или неустойчивым формам. В результате получено совпадение статусов для всех исследованных образцов *Ae. tauschii*, кроме к-527 (Армения). Канонический дискриминантный анализ метаболомных признаков позволил уточнить параметры дифференциации устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii*. На гистограмме распределения по величине собственных значений канонической переменной видно, что значение последней для устойчивых образцов располагается в диапазоне от 0 до +5, а для неустойчивых – от 0 до -5 (см. рисунок).

Обсуждение

Результаты нашей работы показали, что метаболомные профили устойчивых и неустойчивых форм *Ae. tauschii* достоверно различаются. Используя данные метаболомного анализа, можно с большой вероятностью (до 98 %), без проведения дополнительных тестов, выделить среди взятых в исследование образцов формы, устойчивые к грибным патогенам. Такой подход в дальнейшем мы рекомендуем к применению на практике для оптимизации процесса селекции.

Анализируя полученные данные по метаболомным профилям неустойчивых и устойчивых форм *Ae. tauschii*, правомерно сделать вывод о степени и характере влияния грибных патогенов на основные этапы первичного и вторичного метаболизма зерновок различных по устойчивости образцов. Практически все возбудители в той или иной степени воздействовали на обменные процессы: цикл Кребса, гликолиз, обмен жирных кислот, ацилглицеролов, полиолов, фитостеролов, моно- и олигосахаров. В то же время грибные патогены практически не оказывали влияния на содержание свободных аминокислот (кроме треонина и тирозина). Поскольку тирозин – предшественник при синтезе многих биологически активных соединений, выполняющих структурную (лигнин), защитную (фенольные соединения, алкалоиды и др.), транспортную (перенос электронов) и другие функции, то влияние патогенов на содержание данной аминокислоты в зерновке может быть обусловлено активацией механизмов защиты в ответ на проникновение возбудителя в ткани растения, что подтверждается исследованиями зарубежных авторов (Schenck, Maeda, 2018). Изменение показателей другой аминокислоты, треонина, ряд авторов также связывает с действием неблагоприятных биотических факторов среды, например насекомых-вредителей. Растение снижает концентрацию веществ, необходимых для питания «паразита», тем самым влияя на его численность. Вероятно, такой же механизм может действовать и в отношении возбудителей листовой ржавчины и мучнистой росы (Gonzales-Vigil et al., 2011). Азелаиновая кислота, являющаяся продуктом окисления олеиновой кислоты, и пипеколиновые кислоты, катаболиты лизина, активно вырабатываются в ответ на внедрение патогенов, в том числе грибных, в ткани растения, поэтому изменение концентрации этих соединений вполне обосновано и подтверждено другими исследователями (Navarova et al., 2012; Zoeller et al., 2012).

Из числа свободных фенольных соединений достоверное влияние на устойчивость к грибным патогенам установлено для гидрохинона (доминирующее соединение этой группы) и пирогалловой кислоты. Известно, что фенольные соединения активно участвуют в формировании иммунитета растения. Наличие свободных форм фенольных соединений – чаще всего показатель интенсивности синтеза гликозидных форм, где последние выступают в качестве агликона. Наши данные показывают, что в зерновках устойчивых форм *Ae. tauschii* в основном накапливаются гидрохинон и пирогалловая кислота. Их присутствие в свободном состоянии, скорее всего, связано с разрушением активных форм – гликозидов, например арбутина. В случае пирогалловой кислоты ее накопление может быть также обусловлено взаимодействием растения с грибными патогенами (роль сигнальных веществ) (Seigler, 1998; цит. по: Gilbert, 2001).

Данные настоящего исследования подтверждают полученные нами ранее результаты относительно связи устойчивости к возбудителям фузариоза форм овса (*Avena sativa* L.) с компонентами метаболомного профиля: ацилглицеролами, небелковыми аминокислотами, галактинолом (Лоскутов и др., 2019).

Заключение

Результаты проведенных исследований подтверждают целесообразность и эффективность использования неспецифического метаболомного анализа для поиска и выделения форм, имеющих набор соединений, предложенных в качестве маркеров устойчивости к определенным патогенам. Образцы вида *Ae. tauschii* с высоким содержанием пипеколиновых кислот, ацилглицеролов, галактинола, стигмастерола, мальтозы, тирозина, сорбозы, глицерола, азелаиновой и пирогалловой кислот, метил-D-галактопиранозиды и др. могут быть включены в селекционные работы по получению сортов основных зерновых культур, высокоустойчивых к мучнистой росе, бурой и желтой ржавчинам.

Список литературы / References

- Афанасенко О.С. Проблемы создания сортов с длительной устойчивостью к болезням. Защита и карантин растений. 2010;3:4-10. [Afanasenko O.S. Problems of creating cultivars with long-term disease resistance. Zashchita i Karantin Rastenii = Plant Protection and Quarantine. 2010;3:4-10. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Иммуитет растений к инфекционным заболеваниям. М., 1919. [Vavilov N.I. Plant Immunity to Infectious Diseases. Moscow, 1919. (in Russian)]
- Добровотворская Т.В., Мартынов С.П., Чикида Н.Н., Митрофанова О.П. Сорта и линии пшеницы, в родословные которых входит эгилопс Тауши (*Ae. tauschii* Coss.). В: Каталог мировой коллекции ВИР. СПб., 2017;842:47. [Dobrovotorskaja T.V., Martynov S.P., Chikida N.N., Mitrofanova O.P. Wheat cultivars and lines whose pedigrees include *Ae. tauschii* Coss. In: Catalogue of the VIR Global Collection. St. Petersburg, 2017;842:47. (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф. Отдаленная гибридизация и происхождение пшеницы. Л., 1971. [Dorofeev V.F. Remote Hybridization and the Origin of Wheat. Leningrad, 1971. (in Russian)]
- Коломиец Т.М., Панкратова Л.Ф., Пахолкова Е.В. Сорта пшеницы (*Triticum* L.) из коллекции GRIN (США) для использования в селекции на длительную устойчивость к септориозу. С.-х. биология. 2017;52(3):561-569. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.561rus. [Kolomiets T.M., Pankratova L.F., Pakholkova E.V. Wheat (*Triticum* L.) cultivars from GRIN collection (USA) selected for durable resistance to *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017; 52(3):561-569. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.561eng.]
- Конарев А.В., Шеленга Т.В., Перчук И.Н., Блинова Е.В., Лоскутов И.Г. Характеристика разнообразия овса (*Avena* L.) из коллекции ВИР – исходного материала для селекции на устойчивость к фузариозу. Аграр. Россия. 2015;5:2-10. DOI 10.30906/1999-5636-2015-5-2-10. [Konarev A.V., Shelenga T.V., Perchuk I.N., Blinova E.V., Loskutov I.G. Characteristic of oat diversity (genus *Avena* L.) from the Collection of N.I. Vavilov All-Russia Research Institute of Plants: initial material for oat breeding for *Fusarium* resistance. Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia. 2015;5:2-10. DOI 10.30906/1999-5636-2015-5-2-10. (in Russian)]
- Конарев В.Г. Белки пшеницы. М., 1980. [Konarev V.G. Wheat Proteins. Moscow, 1980. (in Russian)]
- Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В., Хорева В.И., Шаварда А.Л., Блинова Е.В., Гнутиков А.А. Биохимические аспекты взаимоотношений грибов и растений на примере фузариоза овса. С.-х. биология. 2019;54(3):575-588. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.575rus.

- [Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V., Khoreva V.I., Shavarda A.L., Blinova E.V., Gnutikov A.A. Biochemical aspects of interactions between fungi and plants: a case study of *Fusarium* in oats. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(3):575-588. DOI 10.15389/agrobiol.2019.3.575eng.]
- Мережко А.Ф., Удачин Р.А., Зуев Е.В., Филатенко А.А., Сербин А.А., Ляпунова О.А., Косов В.Ю., Куркиев У.К., Охотникова Т.В., Наврузбеков Н.А., Богуславский Р.Л., Абдулаев А.К., Чикида Н.Н., Митрофанова О.П., Потоккина С.А. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале. СПб., 1999.
- [Merezhko A.F., Udachin R.A., Zuev E.V., Filatenko A.A., Serbin A.A., Liapunova O.A., Kosov V.I., Kurkiev U.K., Okhotnikova T.V., Navruzbekov N.A., Boguslavskii R.L., Abdulaev A.K., Chikida N.N., Mitrofanova O.P., Potokina S.A. Enriching, Conserving Viable, and Studying the Global Collections of Wheat, Aegilops, and Triticale. St. Petersburg, 1999. (in Russian)]
- Мигушова Э.Ф. К вопросу о происхождении геномов пшеницы. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1975; 55(3):3-26.
- [Migushova E.F. On the origin of wheat genomes. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1975;55(3):3-26. (in Russian)]
- Семенова Л.В., Мигушова Э.Ф., Девяткина Э.П. Качество зерна сородичей пшеницы – эгилопса. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1973;50(1):216-226.
- [Semenova L.V., Migushova E.F., Devjatkina E.P. Grain quality of *Aegilops* grain, ancestor of wheat. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1973;50(1):216-226. (in Russian)]
- Тырышкин Л.Г., Колесова М.А., Чикида Н.Н. *Aegilops tauschii* Coss. Характеристика образцов по ювенильной устойчивости к листовым болезням. В: Каталог мировой коллекции ВИР. 2004; 763:3-15.
- [Tyryshkin L.G., Kolesova M.A., Chikida N.N. *Aegilops tauschii* Coss. Characteristics of accessions for juvenile leaf disease resistance. In: Catalogue of the VIR Global Collection. St. Petersburg, 2004;763:3-15. (in Russian)]
- Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Christov Yu.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. genetic material. *Russ. J. Genet.* 2012;48:404-409. DOI 10.1134/S1022795412020020.
- Arora S., Singh N., Kaur S., Bains N.S., Uauy C., Poland J., Chhuneja P. Genome-wide association study of grain architecture in wild wheat *Aegilops tauschii*. *Front. Plant Sci.* 2017;8:886. DOI 10.3389/fpls.2017.00886.
- Chakraborty S., Newton A.C. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathol.* 2011;60:2-14. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x.
- Gilbert K. Plant Secondary Metabolism. Seigler David S. *Plant Growth Regul.* 2001;34(1):149-149. DOI 10.1023/A:1013354907356.
- Gonzales-Vigil E., Bianchetti Ch.M., Phillips G.N., Jr., Howe G.A. Adaptive evolution of threonine deaminase in plant defense against insect herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(14):5897-5902. DOI 10.1073/pnas.1016157108.
- Kolmer J.A., Anderson J.A. First detection in North America of virulence in wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) to seedling plants of wheat with *Lr21*. *Plant Dis.* 2011;95:1032. DOI 10.1094/PDIS-0411-0275.21.
- Liu Y., Wang L., Mao S., Liu K., Lu Y., Wang J., Wei Y., Zheng Y. Genome-wide association study of 29 morphological traits in *Aegilops tauschii*. *Sci. Rep.* 2015;5:15562. DOI 10.1038/srep15562.
- Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V., Shavarda A.L., Blinova E.V., Dzubenko N.I. The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena* L.). *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(5):501-508. DOI 10.1134/S2079059717050136.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. *Wheat Rust: An Atlas of Resistance Genes*. Australia: CSIRO Publ., 1995.
- Mujeeb-Kazi A., Cano S., Rosas V., Cortes A., Delgado R. Registration of five synthetic hexaploid wheat and seven bread wheat lines resistant to wheat spot blotch. *Crop Sci.* 2001;41(5):1653-1654. DOI 10.2135/cropsci2001.4151653x.
- Navarova H., Bernsdorff F., Doring A.C., Zeier J. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell.* 2012;24(12):5123-5141. DOI 10.1105/tpc.112.103564.
- Pretorius Z.A. Detection of virulence to *Lr41* in a South African pathotype of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 1997;81(4):423. DOI 10.1094/PDIS.1997.81.4.423A.
- Puzanskiy R.K., Shavarda A.L., Tarakhovskaya E.R., Shishova M.F. Analysis of metabolic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under autotrophic conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015;51(1):83-94. DOI 10.1134/S0003683815010135.
- Schenck C.A., Maeda H.A. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry.* 2018;149:82-102. DOI 10.1016/j.phytochem.2018.02.003.
- Taji T., Takahashi S., Shinozaki K. Inositol and their metabolism in abiotic and biotic stress responses. *Subcell. Biochem.* 2006;39:239-264. DOI 10.1007/0-387-27600-9_10.
- Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow).* 2016;81(8):819-834. DOI 10.1134/S0006297916080046.
- Yang W.-Y., Yu Y., Zhang Y., Hu X.-R., Wang Y., Zhou Y.-C., Lu B.-R. Inheritance and expression of stripe rust resistance in common wheat (*Triticum aestivum*) transferred from *Aegilops tauschii* and its utilization. *Hereditas.* 2003;139:49-55. DOI 10.1111/j.1601-5223.2003.01671.x.
- Zoeller M., Stingl N., Krischke M., Fekete A., Wallter F., Berger S. Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol.* 2012;160(1):365-378. DOI 10.1104/pp.112.202846.

ORCID ID

T.V. Shelenga orcid.org/0000-0003-3992-5353
L.L. Malyshev orcid.org/0000-0002-8595-1336
Yu.A. Kerv orcid.org/0000-0002-3728-6968
T.V. Diubenko orcid.org/0000-0002-3142-2877

A.V. Konarev orcid.org/0000-0003-2938-1014
V.I. Horeva orcid.org/0000-0003-2762-2777
M.K. Belousova orcid.org/0000-0003-0980-3531
M.A. Kolesova orcid.org/0000-0001-6310-127X
N.N. Chikida orcid.org/0000-0002-9698-263X

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР, номер государственной регистрации 0662-2019-0006.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.09.2019. После доработки 21.11.2019. Принята к публикации 04.12.2019.