

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЗИМОСТОЙКОСТИ СОРТООБРАЗЦОВ И ГЕНОТИПОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТКАНЕЙ ПРОРОСТКОВ

И. В. Кархардин, старший преподаватель
А. Ф. Петров, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент
Н. В. Гаврилец, начальник информационно-аналитического отдела
П. В. Алексахина, студент
М. Ю. Шнайдер, магистрант
В. А. Смоляков, студент

Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: ikarkhardin@yandex.ru

Ключевые слова: озимая мягкая пшеница, зимостойкость, морозоустойчивость, автофлуоресценция, конфокальная микроскопия, ФАЛ – фенилаланинаммониалаза.

Реферат. *Озимые посевы зерновых являются наиболее продуктивным компонентом агроценозов, но в условиях РФ большие потери урожая озимых зерновых культур происходят из-за повреждения и гибели растений при неблагоприятных условиях перезимовки, главным из которых является действие низких температур в позднеосенний, зимний и ранневесенний периоды. Задача определения зимостойкости озимых зерновых культур простым и быстрым способом является актуальной. В нашей работе изучена связь содержания лигнина с устойчивостью растений к морозу. Проанализированы растения озимой пшеницы с различными генотипами по гену CAD1-F, отвечающему за морозоустойчивость. Также проведен анализ флуоресценции у ряда сортов с известной морозоустойчивостью. Установлено, что чем выше содержание лигнина в растении озимой мягкой пшеницы, тем выше ее морозоустойчивость. Разработан метод автофлуоресценции, позволяющий оценивать сорта и генотипы озимой мягкой пшеницы на морозоустойчивость.*

STUDYING POTENTIAL WINTER RESISTANCE OF COLORIFICATIONS AND GENOTYPES OF WINTER SOFT WHEAT BY ANALYSIS OF AUTO-FLUORESCENCE OF TISSUE PROTEINS

I. V. Karhardin, Senior Teacher
A. F. Petrov, Candidate of Agricultural Sciences, Docent
N. V. Gavrilets, Head of Information and Analytical Department
P. V. Alexakhina, Student
M. Yu Shnajder, Undergraduate
V.A. Smolyakov, Student

Novosibirsk State Agrarian University

Key words: Novosibirsk region, winter soft wheat, winter hardiness, frost resistance, autofluorescence, confocal microscope, cryotron.

Abstract. *Winter crops of cereals are the most productive component of agrocyanozes, but in the conditions of the Russian Federation, large losses in the yield of winter grain crops occur due to damage and death of plants under unfavorable conditions of wintering, the main of which is the effect of low temperatures in the late autumn, winter and early spring periods. The task of determining winter hardiness of*

winter grain crops in a simple and fast way is relevant. In our work, the relationship between lignin content and plant resistance to frost has been studied. Winter wheat plants with different genotypes for the CAD1-F gene responsible for frost resistance are analyzed. A fluorescence analysis was also carried out in a number of varieties with known frost resistance. It was found that the higher the lignin content in the plant of winter soft wheat, the higher its frost resistance. A method of autofluorescence has been developed that makes it possible to evaluate varieties and genotypes of winter soft wheat for frost resistance.

Основной причиной гибели озимой пшеницы в сибирском регионе является использование в сельскохозяйственном производстве сортов этой культуры, обладающих недостаточно выраженной зимостойкостью и низкой морозоустойчивостью, а также несовершенство технологий её возделывания, методов оценки и приёмов повышения устойчивости озимых к неблагоприятным зимним условиям, в частности к низкой отрицательной температуре в сочетании с неустойчивостью или полным отсутствием на полях снежного покрова [1].

В результате проведённых ранее исследований накопился обширный материал по вопросам культивирования озимой пшеницы, который отражает агроэкологические, метеорологические, селекционные и другие аспекты [2]. В то же время остаётся малоисследованным отрицательное влияние агроэкологических факторов зимнего периода на формирование морозостойкости и зимостойкости новых сортов озимой пшеницы. Кроме того, не разработаны эффективные, оперативные и низкочатратные методы оценки зимостойкости озимых. В связи с этим данное исследование направлено на получение оценки о формировании морозоустойчивости озимой пшеницы [3].

Известно, что повышенное содержание лигнина увеличивает устойчивость растений к морозу. Лигнин образуется в шикиматном (или фенилпропаноидном) пути метаболизма – одном из двух основных путей синтеза ароматических соединений у растений. Было установлено, что и другие продукты фенилпропаноидного пути, такие как лигнаны, мономерные и олигомерные фенольные метаболиты (как правило, в виде гликозидов) обладают многообразным физиологическим действием, в том числе защитным [4].

Активация фенилпропаноидного пути холодом у самых разных растений не вызывает сомнений, однако результаты такой активации могут быть двоякими. Во-первых, усиление процесса лигнификации клеточных стенок (т.е. увеличение механической прочности) повышает сопротивляемость разрушению клеток при промерзании. Активация фенилпропаноидного пути, приводящая к утолщению клеточной стенки, наблюдается при холодной акклиматизации рододендрона. Во-вторых, накопление мономерных, и, возможно, олигомерных продуктов этого пути (скорее всего, в виде гликозидов) понижает температуру замерзания клеточного сока и цитоплазмы, предотвращая образование в клетчатках кристаллов льда (т.е. увеличивая степень гелификации). Полиморфизм по генам ферментов, задействованным в фенилпропаноидном пути, оказывает также влияние на конечные продукты и на многие признаки роста и развития растений. Чаще всего исследователи обнаруживают функциональный полиморфизм по начальному ферменту фенилпропаноидного пути PAL (phenylalanine ammoniaklyase, EC 4.3.1.24), и терминальному ферменту CAD (cinnamil alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.195) [5].

Л.Е. Макаровой, О.П. Родченко было показано, что в листьях ячменя экспрессия генов синтеза лигнина, включая CAD, повышалась холодом. Эти авторы предположили, что монолигнолы, а не лигнин биосинтезировались в листе, так как гены пероксидазы, вовлеченные в синтез лигнина из монолигнолов, понижали экспрессию [6].

При закаливании растений озимой пшеницы сорта Мироновская 808 увеличивалось содержание растворимых фенольных соединений в листьях ювенильных растений на стадии 5–7 листьев, при этом содержание лигнина не менялось [7]. Однако в узлах кушения наблюдалось противоположное: содержание растворимых фенольных соединений немного уменьшалось, содержание лигнина увеличивалось более чем в 2 раза. При этом активность ФАЛ – фенилаланинаммониалазы в обеих тканях уменьшалась, соответственно увеличилось содержание свободного L-фенилаланина [8]. Из этих данных видно, что динамика фенилпропаноидных метаболитов, как свободных, так и полимерных, задействована в процессе закаливания озимых генотипов, и эти процессы не обязательно сопровождаются увеличением активности ФАЛ. В узлах кушения и в листьях эти процессы могут иметь разнонаправленный характер [9].

Гены устойчивости к морозу, как и CAD, также локализованы на 5-х гомологичных хромосомах пшеницы и ржи [10].

Возможные механизмы активации экспрессии соответствующих генов и защитного действия фенольных метаболитов рассмотрены в обзорах.

В нашей работе получены растения озимой пшеницы с различными генотипами по гену CAD1-F, локализованному в хромосоме 5A [11]. У этих генотипов изучены зимостойкость и флуоресценция тканей проростков с целью установления связи между данными признаками. Также проведен анализ флуоресценции у ряда сортов с известной морозостойкостью.

Цель исследования – изучить и выделить образцы озимой мягкой пшеницы, обладающие высокой морозостойкостью, с использованием метода автофлуоресценции.

Для её достижения поставлены следующие задачи:

1. Определить уровень морозостойкости образцов озимой пшеницы методом автофлуоресценции.
2. Оценить возможность использования данного косвенного метода и оценки селекционного материала по морозостойкости озимой пшеницы.

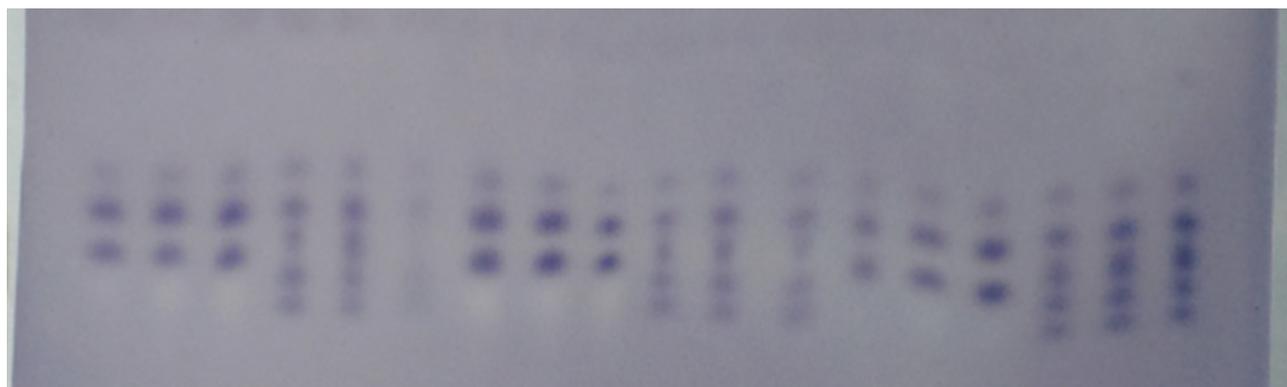
В качестве объекта исследования использовали сорт озимой мягкой пшеницы Житница (Zitnica, к- 159716, бывш. Югославия), полученный из ВИР, и сорт Новосибирская 9, а также 28 озимых сортообразцов, полученных из Краснодарского НИИ сельского хозяйства им. П. П. Лукьяненко, морозостойкость которых предварительно определялась промораживанием при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-19,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и подсчетом выживших растений.

Растения выращивали на полях Селекционно-генетического центра ИЦиГ ($54^{\circ}51'08''$ северной широты, $83^{\circ}06'21''$ восточной долготы, высота над уровнем моря 151 м).

Изоферментный спектр CAD1 определяли с помощью электрофореза в крахмальном геле. Флуоресценцию тканей оценивали на микроскопе AxioImager Z1.

В Химцентре СО РАН (НИОХ) была проведена экстракция метаболитов из узла кушения (фрагменты размером 5 мм), полученные экстракты изучены спектроскопическими и хроматографическими методами.

Методом электрофореза в крахмальном геле в сортах озимой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. были обнаружены различия в спектрах изоферментов ароматической алкогольдегидрогеназы, НАДФ-ААДГ или CAD1 (cinnamil alcohol dehydrogenase; EC 1.1.1.195) (рис. 1).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Рис. 1. Типы спектров САД у сортов мягкой пшеницы.

Дорожки: 1–3, 7–9, 13–15 – неморозоустойчивый сорт Житница;
4–6, 10–12, 16–18 – морозоустойчивый сорт Новосибирская 9

Однократно в течение трех лет в (2017, 2018 и 2019 гг.) высевали под зиму 11 потомств FF и 11 потомств 00. Зимостойкость оценивали по числу перезимовавших растений от числа посеянных семян. Данные представлены в табл. 1. Генотипы FF перезимовывали в среднем лучше, чем генотипы 00, при этом наблюдались различия по годам и срокам посевов.

Таблица 1

Зимостойкость генотипов FF и 00 озимой пшеницы в сезонах 2016/17, 2017/18 и 2018/19 гг.

| Сезон. | Генотип озимого растения пшеницы по САД | | Критерий Пирсона, χ^2 |
|---------|---|--------------------------|----------------------------|
| | FF-генотип (функциональный) | 00-генотип (контроль) | |
| 2016/17 | 880/552 (62,7) * | 880/369 (41,9) | 24,01 |
| 2017/18 | 2310/1365 (59,1) | 2310/1149 (49,7) | 12,00 |
| 2018/19 | 2694/1652 (61,3) | 2436/1440 (59,1) | 0,64 |
| Всего | 5884/3569 (60,7) | 5626/2958 (52,6) | 21,08 |

* В скобках – доля перезимовавших растений, %.

Фермент САД является одним из ключевых ферментов ароматического метаболизма растений, приводящего к формированию ряда ароматических веществ – лигнина, лигнанов, ароматических гликозидов и т.д. Многие из этих веществ имеют хромофорные группы и способны к автофлуоресценции [9].

Флуоресцентные методы исследования не позволяют идентифицировать конкретный метаболит, но дают общую картину содержания и локализации флуоресцирующих веществ в тканях и широко используются при изучении микроморфологии растений.

Каждой весной перезимовавшие проростки брали с поля, срезы узлов кущения просматривали под флуоресцентным микроскопом. Ткани проростков FF флуоресцировали значительно сильнее, чем ткани проростков 00 (рис. 2).

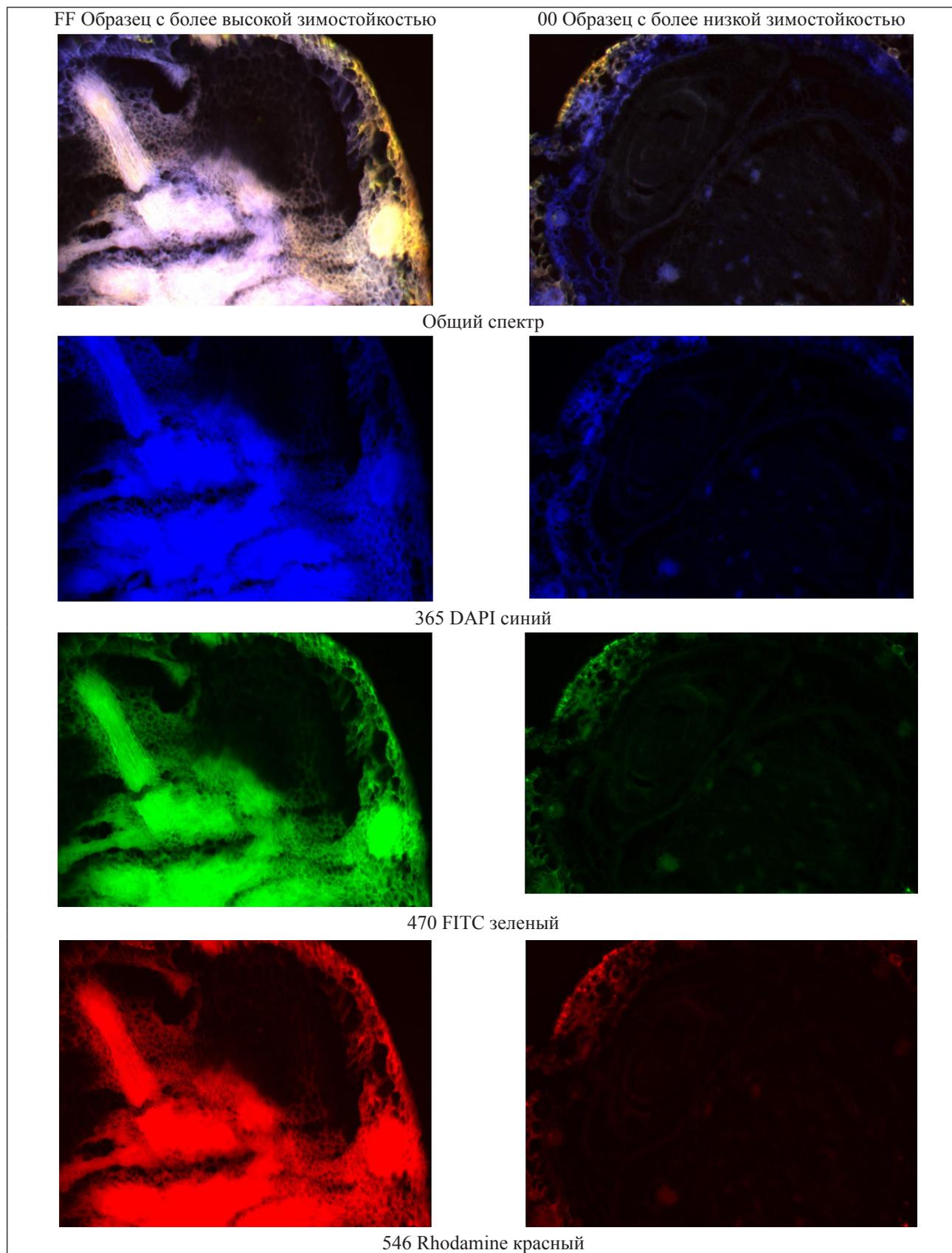


Рис. 2. Автофлуоресценция срезов узла кушения у проростков подзимнего посева в зависимости от длины волны возбуждающего излучения, 2018/19 г.

В Химцентре СО РАН (НИОХ) была проведена экстракция метаболитов из узла кушения (фрагменты размером 5 мм). В последующем экстракты были изучены спектроскопическими и хроматографическими методами. Были обнаружены различия по содержанию ряда метаболитов (рис. 3), которые в дальнейшем будут идентифицироваться.

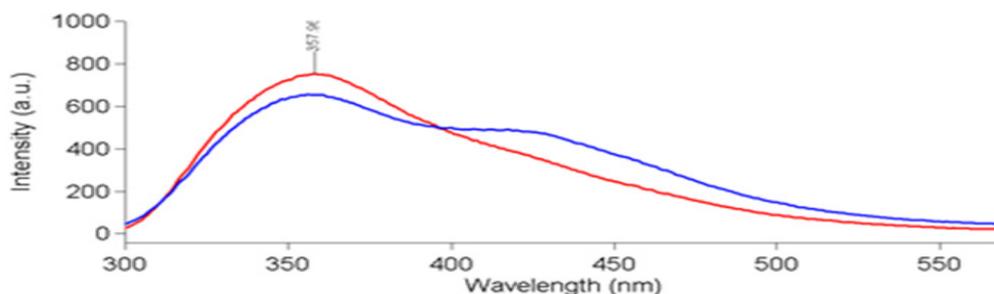


Рис. 3. График флуоресценции водных экстрактов узлов кушения озимой пшеницы: красный FF, синий 00.

Флуоресцентные методы исследования не позволяют идентифицировать конкретный метаболит, но дают общую картину содержания и локализации флуоресцирующих веществ в тканях и широко используются при изучении микроморфологии растений.

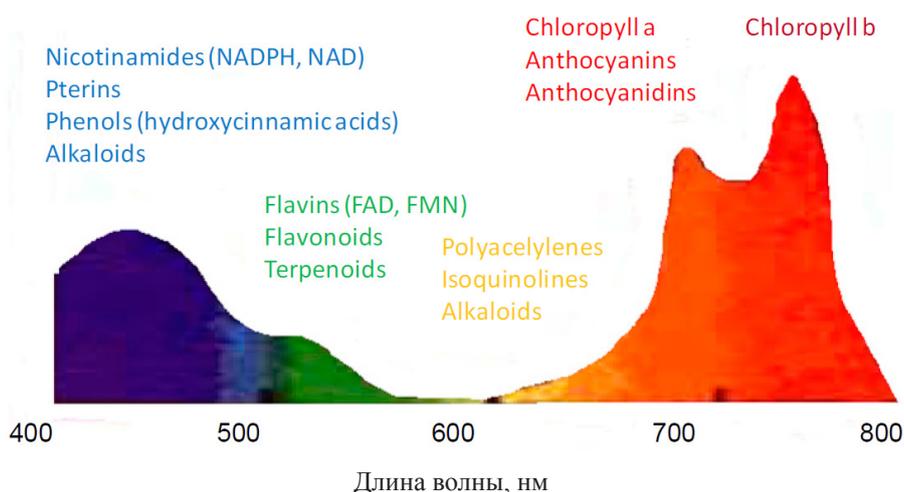


Рис. 4. Автофлуоресценция экстракта из типичного зеленого листа при возбуждении 355 нм

Ароматические гликозиды способствуют гелификации клеточного сока и замерзанию воды в аморфном состоянии, без образования кристаллов льда, которые являются основным повреждающим фактором в зимний период.

У 28 сортообразцов с ранее определенной по стандартной методике морозоустойчивостью определяли суммарную автофлуоресценцию на срезах проростков (табл. 2).

Таблица 2

Корреляции между морозоустойчивостью 28 сортов озимой пшеницы и автофлуоресценцией срезов проростков

| Показатель | 7 дней | | | 14 дней | | | 21 день | | |
|----------------------------|--------|------|------|---------|------|------|---------|------|------|
| | 365 | 470 | 546 | 365 | 470 | 546 | 365 | 470 | 546 |
| Длина волны, нм | 365 | 470 | 546 | 365 | 470 | 546 | 365 | 470 | 546 |
| Температура промораживания | | | | | | | | | |
| -18 °С | 0,80 | 0,88 | 0,78 | 0,50 | 0,64 | 0,88 | 0,59 | 0,75 | 0,78 |
| -19,5 °С | 0,71 | 0,48 | 0,69 | 0,77 | 0,77 | 0,92 | 0,72 | 0,85 | 0,62 |

Можно отметить, что при анализе срезов растений первого срока посева все корреляции были положительные, позже более половины корреляций становятся отрицательными. Максимальное значение 0,88 свидетельствует о корреляции средней степени.

На основании полученных результатов делаем вывод о возможности оценки сортообразцов в ранние сроки посева. При анализе 7 наиболее контрастных по морозоустойчивости сортов результаты получились более контрастными и можно было выделить группу наиболее морозостойких растений (табл. 3).

Таблица 3

Корреляции между морозоустойчивостью и автофлуоресценцией срезов проростков у 7 наиболее контрастных по данному признаку сортов озимой пшеницы

| Показатель | 7 дней | | | 14 дней | | | 21 день | | |
|----------------------------|--------|------|------|---------|------|------|---------|------|------|
| | 365 | 470 | 546 | 365 | 470 | 546 | 365 | 470 | 546 |
| Длина волны, нм | | | | | | | | | |
| Температура промораживания | | | | | | | | | |
| -18 °С | 0,87 | 0,72 | 0,70 | 0,81 | 0,43 | 0,97 | 0,61 | 0,55 | 0,71 |
| -19,5 °С | 0,72 | 0,48 | 0,61 | 0,80 | 0,30 | 0,89 | 0,73 | 0,81 | 0,69 |

Примечание. Морозоустойчивость 7 сортов при –18°С: 93, 95, 92, 93, 37, 34 и 5%; при –19,5°С: 74, 86, 61, 78, 19, 12 и 0%.

Определяющими отличиями способа определения морозоустойчивости методом автофлуоресценции по сравнению с иными методами являются:

1) для анализа в лабораторных условиях используют двух-четырёхнедельные проростки, что позволяет ускорить процесс отбора (при стандартных методах отбор образцов проводят на более поздних фазах развития растений);

2) у проростков готовят срезы узла кущения и оценивают потенциальную зимостойкость по интенсивности флуоресценции тканей проростков, измеренной на флуоресцентном микроскопе с длинами волн 365, 470 и 546 нм, при этом в качестве зимостойких отбирают образцы с повышенной флуоресценцией, что позволяет значительно упростить и ускорить процесс селекции за счет сокращения времени получения оценки и значительного уменьшения трудоёмкости анализов.

Вывод: в результате использования метода автофлуоресценции происходит существенное сокращение длительности и упрощение процесса оценки селекционного материала с повышенной потенциальной зимостойкостью на ранних этапах селекционной работы.

Из полученных результатов следует, что генотипы локуса *CAD1* влияют на содержание ароматических веществ – производных фенилпропаноидного пути, которые, в свою очередь, оказывают влияние на зимостойкость озимой пшеницы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Генетика* изоферментов / под ред. акад. Д. К. Беляева. – Новосибирск: Наука, 1977. – 275 с.
2. *Губанов Я. В., Иванов Н. Н.* Озимая пшеница. – М.: Агропромиздат, 1988. – С. 109–110.
3. *Гудвин Т., Мерсер Э.* Введение в биохимию растений: в 2 т. – 2-е изд. М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 393 с.; Т. 2. – 312 с. (Goodwin T. W., Mercer E. I. Introduction to Plant Biochemistry, Second Edition. – Published by Pergamon Press. Oxford et al., 1983. – 677 p).
4. *Запромёттов М. Н.* Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
5. *Канцер А. Н.* Динамика содержания лигнина и морозостойкость древесных растений // Физиология и биохимия культурных растений – 1972. – Т. 4, № 1. – С. 92–95.
6. *Макарова Л. Е., Родченко О. П.* Содержание фенолкарбоновых кислот в клетках корней сортов кукурузы, различающихся по устойчивости к низким температурам // ДАН СССР. – 1984. – Т. 279, № 5. – С. 1272–1276.

7. Мокану Н. В., Файт В. И. Различия эффектов аллелей генов Vrd1 и Ppd-D1 по зимостойкости и урожаю у озимой пшеницы // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 6. – С. 26–33.
8. Олениченко Н. А., Загоскина Н. В. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланин-аммиак-лиазы // Прикладная биохимия и микробиология – 2005. – № 41(6). – С. 681–685.
9. Родченко О. П., Маричева Э. А., Акимова Г. П. Адаптация растущих клеток корня к пониженным температурам. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. – 1988. – 150 с.
10. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology / V. Cheynier, G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio, S. Martens // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. – Vol. 72. – P. 1–20. – Doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
11. Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodelling as a specific feature of crown tissues / A. Janská, A. Aprile, J. Zámecník, L. Cattivelli J. // Funct Integr Genomics. – 2011. – Vol 11. – P. 307–325. – DOI: 10.1007/s10142–011–0213–8.

REFERENCES

1. Genetika izofermentov (pod red. akad. D. K. Belyaeva). Novosibirsk: Nauka. 1977. 275 s.
2. Gubanov Ya. V., Ivanov N. N. Ozimaya pshenicza // M.: Agropromizdat. – 1988. – S. 109–110.
3. Gudvin T., Merser E. Vvedenie v bioximiyu rastenij. Vtoroe izdanie. V 2-x tomah. M.: Mir. 1986. T. 1. 393 s. T. 2. 312 s. (Goodwin, T. W.; Mercer, E. I. Introduction to Plant Biochemistry, Second Edition. Published by Pergamon Press. Oxford et al. 1983. 677 p).
4. Zapromyotov M. N. Fenol'ny'e soedineniya: rasprostranenie, metabolizm i funkcii v rasteniyax. M.: Nauka, 1993–272 s.
5. Kancer A. N. Dinamika sodержaniya lignina i morozostojkost drevesny'x rastenij // Fiziologiya i bioxiimiya kul'turny'x rastenij – 1972. – Т. 4, № 1. – S. 92–95.
6. Makarova L. E., Rodchenko O. P. Soderzhanie fenolkarbonovy'x kislot v kletkax kornej sortov kukuruzy», razlichayushhixsya po ustojchivosti k nizkim temperaturam. DAN SSSR. 1984. – Т. 279, № 5. – S. 1272–1276.
7. Mokanu N. V., Fajt V. I. Razlichiya e'ffektov allelej genov Vrd1 i Ppd-D1 po zimomorozostojkosti i urozhayu u ozimoy psheniczy // Citologiya i genetika. – 2008. – Т. 42, № 6. – S. 26–33.
8. Olenichenko N. A., Zagoskina N. V. Otvetnaya reakciya ozimoy psheniczy na dejstvie nizkix temperatur: obrazovanie fenol'ny'x soedinenij i aktivnost L-fenilalanin-ammiak-liazy // Prikladnaya bioxiimiya i mikrobiologiya – 2005–41 (6) – 681–685.
9. Rodchenko O. P., Maricheva E. A., Akimova G. P. Adaptaciya rastushhix kletok kornya k ponizhenny'm temperaturam. – Novosibirsk: «Nauka», Sib. otdelen. – 1988. – 150 s.
10. Cheynier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. 72:1–20. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
11. Janská A., Aprile A., Zámecník J., Cattivelli L., Ovesná J. Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodelling as a specific feature of crown tissues / Funct Integr Genomics – 2011–11:307–325 DOI 10.1007/s10142–011–0213–8.