

На правах рукописи



Пермякова Марина Диомидовна

**Липоксигеназы пшеницы *Triticum aestivum* L.:
генетический контроль активности, роль в качестве клейковины
и устойчивости к засухе**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Иркутск – 2020

Работа выполнена в лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск.

Научный консультант: доктор биологических наук Осипова Светлана Владимировна

Официальные оппоненты:

Савченко Татьяна Викторовна, доктор биологических наук, доцент; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук Институт фундаментальных проблем биологии», ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией фотосинтетического окисления воды.

Тимофеев Максим Анатольевич, доктор биологических наук; Научно-исследовательский институт биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный университет», директор, заведующий лабораторией «Проблемы адаптации биосистем»; профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВО «ИГУ».

Щербань Андрей Борисович, доктор биологических наук; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», отдел молекулярной генетики растений, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева.

Защита состоится «21» мая 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 003. 047. 01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

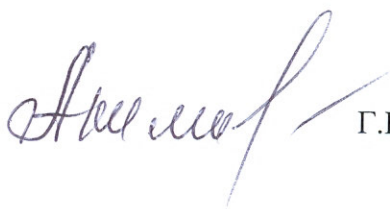
Факс (3952)510754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

Официальный сайт: <http://www.sifibr.irk.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан « » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 003. 047. 01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие и выживание растений в неблагоприятных условиях в большой степени зависит от мобилизации запасных и мембранных липидов и оксилипиновой сигнализации. Образование оксилипинов происходит в результате самоокисления, а также с участием ферментов, среди которых основным является липоксигеназа (ЛОГ) (Mosblech et al., 2009). Оксигеназные реакции превращения полиненасыщенных жирных кислот, инициированные липоксигеназой – это метаболические пути образования физиологически активных веществ, в том числе фитогормона жасмоновой кислоты (ЖАК) (Largie, Vernoux, 2016), а также оксилипинов с функцией характерных реактивных эпоксидов, α,β -ненасыщенных карбониллов или альдегидов, которые вовлечены в различные процессы в онтогенезе растений и ответные реакции на стрессоры. (Liavonchanka, Feussner, 2006).

Пшеница – одна из основных продовольственных культур в мире, поэтому сохранение ее урожайности и хлебопекарных свойств в разных экологических условиях является важной и актуальной задачей. Исследование влияния липоксигеназы семян *Triticum aestivum* L. на формирование и качество клейковины востребовано для практического применения в хлебопекарной промышленности (Bahal et al., 2013).

Значительная площадь посевов пшеницы находится в зоне недостаточного или неустойчивого увлажнения. Учитывая огромные потери урожая, вызванные засухой, существует настоятельная необходимость в повышении устойчивости пшеницы к дефициту воды (Khanna-Chopra, Singh, et al., 2015). В последние годы стало известно, что при адаптации к водному дефициту у *Arabidopsis thaliana* главное значение имеет синергическое действие абсцизовой кислоты (АБК) и оксилипинов, образованных липоксигеназой и ферментами липоксигеназного пути катаболизма липидов (de Ollas, Dodd, 2016; Savchenko et al., 2014).

В настоящее время хорошо изучены липоксигеназы семян у тетраплоидной пшеницы в связи с негативным действием на ее макаронные свойства (Fu et al., 2013). Имеются некоторые сведения о влиянии семенных ЛОГ на хлебопекарные свойства гексаплоидной пшеницы (Bahal et al., 2013) и трех изоферментов ЛОГ листьев на устойчивость к патогенам (Bohland et al., 1999). Данных о других липоксигеназах у *T. aestivum* крайне мало. Изучение изоферментов ЛОГ и взаимосвязи их активности с устойчивостью пшеницы к засухе поможет выявить неизвестные функции пшеничных липоксигеназ при адаптации растений пшеницы к стрессу.

Разработанные в последние десятилетия молекулярные технологии картирования геномов растений позволяют определять геномную архитектуру сложных полигенных признаков, таких как засухоустойчивость. В настоящее время крайне актуально фенотипирование картирующих пшеничных популяций по физиологическим и биохимическим признакам с целью идентификации в геноме *T. aestivum* локусов количественных признаков (ЛКП) (Gupta et al., 2017), ассоциированных с устойчивостью к засухе. Выявление кандидатных генов, лежащих в основе ЛКП, с использованием опубликованного в 2018 году референсного генома гексаплоидной пшеницы позволит понять молекулярные механизмы устойчивости и адаптации растений к засухе.

Изучение генетической регуляции активности липоксигеназы, как фактора, участвующего в перестройке метаболизма растений пшеницы при адаптации к неблагоприятным условиям, а также в формировании хлебопекарного качества пшеницы представляет интерес для создания новых улучшенных генотипов пшеницы методами хромосомной и генетической инженерии и селекцией с помощью ДНК-маркеров.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было исследование активности липоксигеназы и её генетической регуляции у *T. aestivum* L. в разных условиях среды, выявление изоферментного состава и роли в формировании качества клейковины и устойчивости к засухе.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить изоферментный состав и активность липоксигеназы в белковых фракциях, обогащенных растворимой, микросомальной, и хлоропластными формами фермента в семенах, проростках и листьях растений разных генотипов *T. aestivum* L. при оптимальных и стрессовых условиях выращивания. Выявить взаимосвязь ферментативной активности с физиологическими и хлебопекарными параметрами пшеницы.

2. Оценить значение семенных ЛОГ в определении хлебопекарных свойств гексаплоидной пшеницы по результатам изучения мукомольных и тестосмесительных параметров, физических свойств теста, качества клейковины и хлеба.

3. Изучить влияние интрогрессии диких злаков в геном *T. aestivum* L. на активность ЛОГ и физиологические параметры пшеницы, используя линии с интрогрессией *Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii* и *Triticum timopheevii*.

4. Провести генетическое картирование локусов количественных признаков, ассоциированных с активностью разных форм ЛОГ при помощи рекомбинатных линий пшеницы. Выявить ко-локализацию липоксигеназных локусов с ЛКП физиологических и технологических признаков пшеницы и идентифицировать в ее геноме регионы, контролирующие формирование хлебопекарного качества и адаптацию к неблагоприятным факторам.

5. Отобрать *a priori* кандидатные гены, связанные с регуляцией активности ЛОГ при водном дефиците с использованием биоинформационного анализа референсного генома *T. aestivum* L. и показать их место в генной сети для перестройки метаболизма растений пшеницы при адаптации к засухе.

6. Определить функциональные роли для отдельных форм ЛОГ на основе анализа корреляционной взаимосвязи активности растворимой, микросомальной и двух хлоропластных форм фермента с 49 физиологическими и хлебопекарными признаками и их ко-локализации в геноме *T. aestivum* L.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Факторы регуляции активности липоксигеназы широко представлены в геноме *T. aestivum* L., тесно сцеплены с локусами многих физиологических признаков и контролируют хлебопекарное качество и перестройку метаболизма при адаптации к стрессу.

2. Липоксигеназа семян пшеницы способствует формированию мягкой текстуры эндосперма и укреплению клейковины путем снижения ее растяжимости.

3. Интрогрессия сегментов генома *Ae. tauschii* в хромосому 2D *T. aestivum* L. изменяет изоферментный состав ЛОГ листьев с преимуществом цитозольных изоформ над хлоропластными и стратегию адаптации пшеницы к водному дефициту за счет снижения транспирации и увеличения эффективности использования воды.

4. Активность растворимых, микросомальных и хлоропластных липоксигеназ листьев *T. aestivum* связана с их специфическими функциями при адаптации к засухе.

Научная новизна. Данная работа является первым комплексным исследованием липоксигеназы пшеницы, ее генетического контроля и функциональности в адаптации к неблагоприятным факторам и формировании хлебопекарного качества клейковины путем изучения ее активности в большом наборе специально подобранных генетических моделей.

Впервые выявлен изоферментный состав растворимой и мембранной форм липоксигеназы в разных органах растений пшеницы при оптимальных и стрессовых условиях.

Впервые определена взаимосвязь между активностью различных форм ЛОГ листьев гексаплоидной пшеницы и устьичной проводимостью, транспирацией, содержанием фотосинтетических пигментов, флуоресценцией хлорофилла, а также зерновой продуктивностью в зависимости от условий выращивания.

Впервые проведено генетическое картирование локусов количественных признаков, ассоциированных с активностью нескольких форм липоксигеназы, и показана их ко-локализация с ЛКП многих физиологических признаков в геноме *T. aestivum* L.

Биоинформационным анализом референсного генома *T. aestivum* L. на длинном плече хромосомы 2A впервые выявлены аннотированные гомологи генов биосинтеза двух изоферментов ЛОГ и 50-ти кандидатных генов для регуляции ее активности.

Впервые выявлена генная сеть регуляции оксилипинового сигналинга в хромосомных регионах 2A 149.5 – 151.3 сМ и 2A 99.3 – 115.1 сМ генома *T. aestivum* L., тесно вплетенная в генную сеть гормональной регуляции перестройки метаболизма при водном дефиците.

Впервые определена физиологическая роль для нескольких форм липоксигеназы пшеницы и показано их дифференцированное участие в адаптации к засухе.

Впервые показано влияние интрогрессии сегментов генома диких злаков *Ae. tauschii* и *T. timopheevii* в геном *T. aestivum* L. на активность липоксигеназы и физиологические параметры, связанные с устойчивостью к водному дефициту.

Впервые сформулирована гипотеза о синергичном действии липоксигеназы и пуриноидов, которая представляет новый взгляд на формирование текстуры эндосперма, качество клейковины и мобилизацию липидов эндосперма при прорастании семян гексаплоидной пшеницы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обнаружение в геноме пшеницы регионов, ассоциированных с регуляцией активности липоксигеназы, и выявление *a priori* кандидатных генов способствует познанию механизма перестройки метаболизма растений при стрессе.

Идентифицированные в данной работе ЛКП, связанные с активностью разных форм липоксигеназы в геномах A, B и D гексаплоидной пшеницы, можно применить в

ассоциированной с ДНК-маркерами селекции для улучшения засухоустойчивости и технологического качества пшеницы.

Понимание механизма воздействия ЛОГ на формирование белково-липидного комплекса клейковины пшеницы может быть полезно для целенаправленного применения фермента в хлебопекарной и кондитерской технологиях как средства регуляции твердозерности и улучшения качества хлеба и мучных кондитерских изделий.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования выполнялись в рамках тематических планов НИР лабораторий технической биохимии и физиолого-биохимической адаптации растений СИФИБР СО РАН в период с 1989 по 2019 гг., а также при финансовой поддержке грантов РФФИ 15-04-02762 и 18-04-00481.

Личный вклад автора. Автору принадлежат постановка цели и задач исследования, обработка, интерпретация и обобщение результатов. Исследование активности ЛОГ во всех изученных генотипах *T. aestivum* L. выполнено автором. Моделирование засухи, изучение физиологических и технологических параметров и изоферментный анализ выполнены совместно с сотрудниками лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений СИФИБР СО РАН и сектора генетики качества зерна ИЦиГ СО РАН. Генетическое картирование выполнено А. Бернером (IPK, Институт генетики растений и изучения культурных растений им. Лейбница, Германия, Гатерслебен). Биоинформационный анализ для трех хромосомных регионов пшеницы проведен сотрудниками ИЦиГ СО РАН А.В. Дорошковым и Д.К. Константиновым. Выявление геной сети для перестройки метаболизма растений пшеницы при стрессе и *a priori* кандидатных генов для регуляции активности ЛОГ выполнено автором.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены более чем на 16 различных российских и международных конференциях, в том числе, на 11-й, 12-й, 13-й и 14-й международных конференциях Европейского сообщества по анеуплоидам пшеницы (EWAC) (2000, Новосибирск; 2002 Норвич; 2005, Прага; 2007, Стамбул), 15-й, 16-й и 17-ой международных конференция EWAC Eucarpia (2011, Нови Сад; 2015, Люблин; 2018, Бухарест), 11-м международном симпозиуме по генетике пшениц (2008, Брисбен), международном симпозиуме «Липиды и оксипирины растений» (2008, Казань), международной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений (2010, Новосибирск; 2012, Иркутск; 2019, Новосибирск), 1-м международном рабочем собрании «Plant Genetics and Genomics for Food Security» (2016, Новосибирск), всероссийской конференции с международным участием «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (2009, 2016, 2018, Иркутск), 2-й всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (2018, Иркутск).

Публикации. По результатам исследования опубликовано более 75 научных работ, в том числе 18 статей в ведущих отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, индексируемых в WoS и Scopus.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка

литературы. Материал диссертации изложен на 313 страницах печатного текста, включая 38 таблиц и 57 рисунков. Список цитированной литературы содержит 652 работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. Объектами исследований служили сорта *T. aestivum* L., синтетические гексаплоидные пшеницы, несколько серий линий с межсортовым замещением хромосом, интрогрессированные линии и три набора рекомбинантных линий пшеницы.

Моделирование почвенной засухи. Растения выращивали в контролируемых условиях проходной климатической камеры CLF Plant Master (CLF Plant Climatic GMBH, Вертинген, Германия) при двух режимах водообеспечения. Оптимальный режим соответствовал 60 %-му, а дефицитный – 30 %-му содержанию воды от полной почвенной влагоемкости, которую определяли, как описано в руководстве (Журбицкий, 1968). Проростки пшеницы были получены проращиванием семян в течение трех суток на воде (контрольный вариант) и в условиях осмотического стресса на 12% растворе полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ6000), имитирующем водный дефицит.

Получение ферментных экстрактов. Для получения экстракта семенной ЛОГ навески непросеянной муки (0.1 г) экстрагировали 0.1 М трис-НСl буферным раствором с рН 7.5, содержащим 1 mM ЭДТА в течение 30 мин. Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 30 мин.

Для получения ферментного экстракта семенной тиолпротеиндисульфид оксидоредуктазы (ТПДО) 2 г муки грубого помола гомогенизировали с 0.1 трис-НСl буферным раствором с рН 7.5, содержащим 1 mM ЭДТА в соотношении 1:3 в течение 20 мин. Гомогенат последовательно центрифугировали при 5000 g и 30000 g в течение 20 мин. Супернатант диализовали в течение 12 часов против исходного буфера.

Ферментные экстракты ЛОГ листьев получали из трех отдельных растений каждого поливного варианта растиранием в ступке в течение 25 мин замороженного в жидком азоте материала с тройным количеством 0.1 М трисНСl буферного раствора, содержащего 1 mM ЭДТА (рН 7.5).

Были исследованы следующие белковые фракции:

- 1) растворимая фракция листьев, обогащенная цитозольными ЛОГ, листРЛОГ (супернатант после центрифугирования при 105000 g);
- 2) микросомальная фракция листьев, обогащенная мембраносвязанными формами ЛОГ, листМЛОГ (интенсивно растертый и ресуспендированный в том же буферном растворе осадок после центрифугирования при 105000 g);
- 3) фракция, обогащенная растворимой ЛОГ хлоропластов, хлРЛОГ (отцентрифугированный при 8000 g ресуспендированный осадок после центрифугирования при 1000 g);
- 4) фракция, обогащенная связанной с мембранами хлоропластов ЛОГ, хлМЛОГ (интенсивно растертый и ресуспендированный в том же буферном растворе осадок после центрифугирования при 105000 g растворимой фракции хлоропластов, получение которой описано в пункте 3).

Экстракты растворимой и мембраносвязанной ЛОГ проростков (прРЛОГ и прМЛОГ) получали аналогично листРЛОГ и листМЛОГ, исключив предварительное осаждение хлоропластов и ядер при 1000 g.

Грубые экстракты растворимых белков, содержащих ЛОГ, супероксиддисмутазу (СОД), глутатион редуктазу (ГР) и дигидроаскорбатредуктазу (ДГАР) из листьев пшеницы Саратовская 29, линии 821 и РЗДЛ С29/ЯП2А получали растиранием в ступке 250 мг замороженных в жидком азоте листьев в течение 25 мин с добавлением 2.5 мл трис-НСl буфера pH 7.5, содержащего 2 mM ЭДТА, 1 mM фенил метил сульфонил, 0.1% поливинилпирролидона и 0.1 mM дитиотреитола. После 20 мин экстракции все образцы были центрифугированы 40 мин при 25000 g.

Определение активности ферментов. Активность ЛОГ определяли по модифицированной методике Zimmerman и Vick (1970), измеряя скорость образования пероксидов жирных кислот при 234 нм. Субстратом служила эмульсия линолевой кислоты (ЛК) в этаноле (1:1), растворенная в 0.1 M трис-НСl буферном растворе, pH 7.5. Концентрация ЛК в реакционной смеси 56.7 мкМ/мл. Для определения активности ТПДО семян использовали метод Minoda с соавторами (1973). Активность семенной ЛОГ и ТПДО определяли на спектрофотометрах СФ-26 и Hitachi U-1100 (Япония). Удельную активность выражали в единицах активности (Е) на мг белка. Содержание белка определяли по методу Брэдфорд (1976).

Активность ЛОГ проростков и листьев и активность СОД, ДГАР и ГР в листьях определяли на микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd, Маннедорф, Швейцария). Реакционная среда объемом 200 мкл содержала 5-10 мкл ферментного экстракта с известным содержанием белка.

Общую активность СОД определяли по методике Giannopolitis и Ries (1977) с модификациями (Полесская и др., 2004). Активность ДГАР определяли по Baier с соавторами (2000). Активность ГР определяли по de Lamotte (2000). Активность ферментов представлена в мкМ субстрата на мг белка в минуту при 25°C.

Электрофорез и иммуноблоттинг изоферментов липоксигеназы. Нативные белки экстрактов пшеницы анализировали ПААГ-электрофорезом по Девису (1964). Для выявления зон локализации молекулярных форм ЛОГ использовали метод Хейдека (Heydeck, Schewe, 1985). Нативный гель-электрофорез проводили по Шуколюкову (2011). Восстановленные белки ферментных экстрактов анализировали в щелочной буферной системе по Лэммли (Laemmli, 1970). При Вестерн-блоттинге (Timmons, 1990) перенос белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для блоттинга Criterion Blotter (BioRad) в охлажденном буфере для переноса при pH = 9.2 (48 mM Трис, 39 mM глицин, 10% метанола) при напряжении 150 V в течение 5 часов.

Экстракция и определение концентрации пигментов. Содержание хлорофиллов и каротиноидов вычисляли согласно формуле Wettstein (1957). Концентрация пигментов (мг/г сырого веса) представлена как среднее трех растений одного генотипа, образец каждого растения выполнен в трех повторностях.

Определение биомассы побега, параметров газообмена и фотосинтеза. Биомассу главного побега определяли не менее чем у восьми растений. Показатели газообмена и фотосинтеза изучали на флаговых листьях растений с помощью портативной системы для

изучения газообмена и флуоресценции хлорофилла GFS-3000 (HeinzWalzGmbH, Эффельтрих, Германия).

Оценка технологических свойств зерна и муки. Анализ технологических показателей проводили по методике Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1988). Определение хлебопекарных параметров пшеницы определяли по стандартным методам (Василенко, Комаров, 1987).

Картирование локусов количественных признаков и выявление кандидатных генов. Для выявления целевых ЛКП у популяции ITMI и интрогрессивных рекомбинантных линий ЧС(Син 6х) по геному D был использован программный пакет QGENE (Nelson, 1997). Для молекулярного маркирования РЗДЛ С29/ЯП2А был использован микрочип Wheat 15K (Trait Genetics) (Wang et al. 2014). Анализ генетической структуры популяции был проведен с помощью программы STRUCTURE 2.3.4. Ассоциативное картирование проводилось с помощью программы TASSEL 3.1. Для поиска генов-кандидатов в выявленных областях концентрации ЛКП на хромосомах 2А была использована сборка пшеницы iwgsc_refseqv1.0 (<http://wheat-urgi.versailles.inra.fr>). Поиск координат маркеров на хромосоме 2А пшеницы производился при помощи программы BLASTn из пакета BLAST+ (Camacho et al., 2009). Извлеченные гены были проанализированы с использованием ассоциированных терминов генных онтологий (GO). Термины GO, ассоциированные с генами, гомологичными генам пшеницы, были извлечены из базы TAIR. Далее для каждого гена из списка генов-кандидатов был описан доменный состав. Описание доменов производилось при помощи программы Hmsearch из пакета HMMER v.3 (<http://hmmer.org/>) и описанных скрытых марковских цепей (Hidden Markov Model), взятых из базы данных pfam (<http://pfam.xfam.org>) с порогом e-value = 10^{-4} .

Статистическая обработка результатов. Использовали данные 3-кратных биологических и 3-4-6-8-кратных аналитических повторностей 2–3 независимых экспериментов. Для обработки полученных результатов применяли программу Microsoft Excel 2000 и Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Липоксигеназы семян пшеницы

Во фракции растворимых белков зрелых семян пшеницы у всех изученных нами сортов и линий обнаруживали по три молекулярные формы липоксигеназы. На рисунке 1 представлена типичная картина на примере родительских сортов и нескольких линий пшеницы с межсортовым замещением отдельных пар хромосом.



Рис. 1. Молекулярные формы липоксигеназы у исходных сортов пшеницы Саратовская 29 (С29, реципиент), Янецкис Пробат (ЯП, донор хромосом) и линий с межсортовым замещением хромосом.

В настоящее время структурные гены изоферментов липоксигеназы семян пшеницы достаточно хорошо изучены (Carrera et al., 2007). Наши исследования были сосредоточены на изучении генетической регуляции активности семенной ЛОГ и ее влиянии на

формирование клейковины, определяющей хлебопекарное качество пшеницы в разных условиях среды.

Исследование ЛОГ семян в нескольких сериях линий с замещением хромосом 4-й и 5-й гомеологических групп хромосом, несущих структурные гены ЛОГ, в том числе в замещенных линиях (ЗЛ) Саратовская 29/Янецкис Пробат (С29/JP) в течение трех лет, показало, что активность семенной ЛОГ не связана с хромосомами 5 гомеологической группы (рис. 2, а). Изучение ЗЛ С29/JP по разным гомеологическим группам хромосом выявило участие, как минимум 12 хромосом в регуляции активности (рис. 2, б), а изучение ЗЛ Диамант2/Новосибирская67 (Дм/Н67) по хромосомам 1 и 6 гомеологических групп, связанных с качеством клейковины – сопряженность активности ЛОГ семян с реологическими свойствами теста (рис. 2, в).

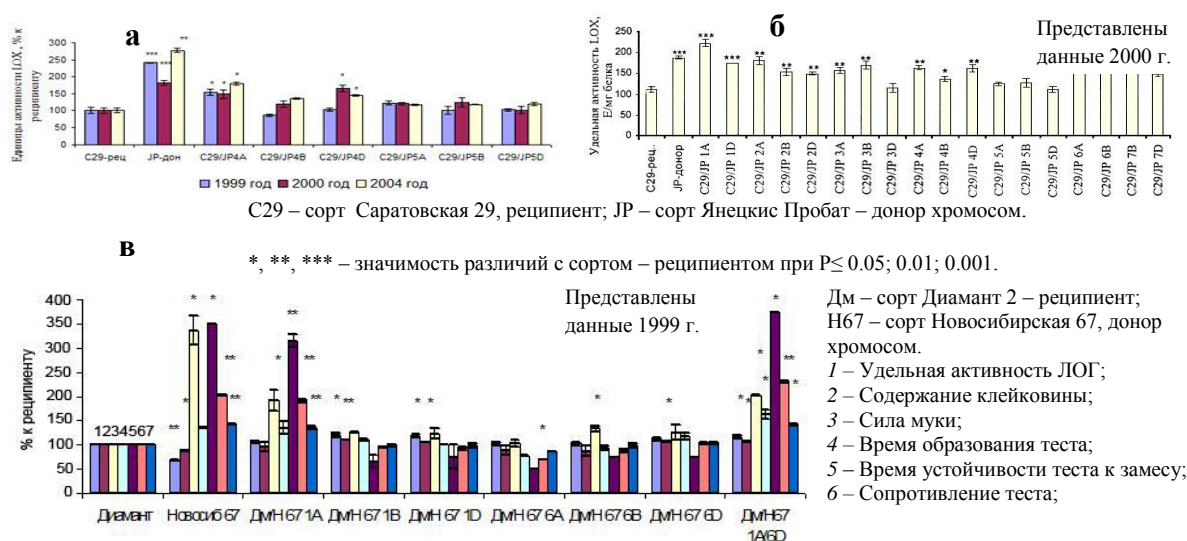


Рис. 2. Активность растворимой ЛОГ в семенах линий пшеницы с межсортовым замещением хромосом.

Влияние растворимой липоксигеназы семян на хлебопекарные свойства пшеницы.

Таблица 1. Корреляция активности растворимой ЛОГ семян с технологическими параметрами качества клейковины пшеницы

Параметры	Корреляция с ЛОГ
Масса 1000 зерен	0.25*
Содержание сырой клейковины	-0.36**
Упругость/ Растяжимость теста, Р/Л	0.31**
Водопоглощительная способность теста, ВПС	-0.31**

n = 74. *, ** – значимо при $P \leq 0.05$; 0.01.

Липоксигеназа известна как фермент, укрепляющий клейковину (Bahal et al., 2013). Статистически значимые корреляционные связи активности эндогенной ЛОГ с такими технологическими показателями, как Масса 1000 зерен, Содержание сырой клейковины, Водопоглощительная способность теста, обнаруженные нами в разных популяциях пшеницы и большой выборке, включающей все изученные сорта и линии (табл. 1) подтверждают, что фермент оказывает влияние на технологические свойства зерна, муки и теста.

Однако у разных пшеничных популяций в разные годы характер взаимосвязи активности ЛОГ с хлебопекарными признаками (положительный или отрицательный) не был постоянным и зависел от уровня ферментативной активности. Результаты корреляционного анализа у популяции рекомбинантных инбредных линий International Triticeae Mapping Initiative (РИЛ ITMI) привели к заключению, что активность ЛОГ связана с высокими значениями многих параметров (табл. 2), однако высокий уровень ферментативной активности отрицательно влияет на качество клейковины (табл. 3).

Таблица 2. Корреляция между параметрами качества клейковины с низким и высоким уровнями значений и активностью ЛОГ семян у популяции РИЛ ITMI 2000 г.

Уровни значений параметров	n выборки	Ср. значение выборки	Корреляция с ЛОГ
Масса 1000 зерен, г			
Низкий	29	54.8 ± 0.5	0.13
Высокий	26	62.5 ± 0.7	0.46*
Содержание сырой клейковины, %			
Низкий	25	34.3 ± 0.4	0.20
Высокий	30	39.7 ± 0.4	0.43*
Упругость теста Р, мм			
Низкий	35	79.2 ± 1.6	0.02
Высокий	20	126.6 ± 2.7	0.46*
Растяжимость теста L, мм			
Низкий	34	81.5 ± 3.0	-0.45**
Высокий	21	119.6 ± 2.4	-0.54*

*, ** – значимо при $P \leq 0.05$; 0.01.

Таблица 3. Корреляция между активностью растворимой ЛОГ семян и параметрами качества клейковины в выборке с высоким уровнем активности у популяции РИЛ ITMI 2000 г.

Параметры	Корреляция с ЛОГ
Масса 1000 зерен	0.42*
Сила муки	-0.40*
Устойчивость теста к замесу	-0.43*
Сопrotивление теста замесу	-0.39*
Валориметрическая оценка	-0.38*

n = 29, ср зн. = 144.6, ст. откл = 29.0

Взаимосвязь между активностью ЛОГ и параметром Растяжимость теста была отрицательной и выявлялась независимо от уровня его значений (табл. 2), что подтверждает укрепляющее действие ЛОГ на клейковину. Но в то же время отрицательная корреляция активности ЛОГ с параметром Размер частиц муки, свидетельствует об ее отрицательной взаимосвязи с твердостью (табл. 4), которая ассоциируется с крепостью клейковины (Конарев, 1980).

Таблица 4. Корреляции между активностью ЛОГ и параметрами текстуры эндосперма среди 7 сортов *Triticum aestivum* L. и одного синтетического гексаплоида в течение двух сезонов

Параметры	Корреляция с ЛОГ
Размер частиц муки	-0.68**
Стекловидность зерна	-0.51*

n = 16; **, *** – значимо при $P \leq 0.01$, 0.001.

В нашей работе мы объяснили это противоречие. Семенные ЛОГ среди других оксидоредуктаз вовлечены в фолдинг и полимеризацию запасных белков эндосперма

(Osipova et al., 2012). В настоящее время считают, что интермедиант – радикал, образующийся в процессе реакции ЛОГ, ответственен за окисление -SH групп при формировании белковой матрицы клейковины и ее укрепление (Hayward et al., 2017). Однако по нашему мнению, существует еще один механизм влияния ЛОГ на клейковину; он обусловлен утилизацией фосфо- и галактолипидов, связанных с поверхностью крахмальных гранул, которые происходят из остатков деградировавших в процессе высушивания семени мембран амилопласта. Как известно, при образовании клейковины эти липиды при помощи специфических для гексаплоидной пшеницы липид-переносящих белков пуроиндолинов (широко известных как маркеры мягкости зерна), внедряются в белковый матрикс, связываясь с глиадином и глютеином, что придает клейковине пластичность, увеличивая ее растяжимость. ЛОГ, конкурируя с клейковинными белками за связывание этих липидов, тем самым способствует снижению растяжимости клейковины и ее укреплению. Это предположение основано не только на отрицательной корреляционной взаимосвязи между активностью ЛОГ и твердостью зерна, выявленной в различных наборах сортов и линий, но и на результатах наших геномных исследований, показавших ко-локализацию локуса, ассоциированного с активностью ЛОГ с известным локусом твердозерности *Ha*, включающем гены пуроиндолинов (глава 5).

Влияние водного дефицита на активность липоксигеназы семян пшеницы, ее хромосомную регуляцию и взаимосвязь с физиологическими и технологическими параметрами. Как для родительских форм пшеницы, так и для 45 РИЛ ИТМІ, изученных в течение двух сезонов, было характерно повышение активности ЛОГ в 1.4 – 1.8 раз в засушливых условиях 2003 года в сравнении с благоприятными условиями 2000 года (табл. 5). В условиях благоприятного года активность ЛОГ была связана с параметрами Масса 1000 зерен (0.34*), Содержание сырой клейковины (0.27*), Водопоглотительная способность теста (0.29*) и Устойчивость теста замесу (-0.27*), однако статистически значимых корреляций активности ЛОГ с технологическими параметрами в условиях засушливого 2003 года обнаружено не было.

Таблица 5. Активность липоксигеназы у рекомбинантных инбредных линий ИТМІ и их родительских форм в разные годы

Год репродукции	Родительские формы		Линии ИТМІ	
	Опата- 85	Синтетик W7984	Ср. значение	Размах изменчивости
2000 (благоприятный)	71.7 ± 0.8	173.7 ± 1.2	114.2 ± 39.7	53.8 – 197.8
2003 (засуха)	129.6 ± 8.6	247.9 ± 11.8	206.3 ± 63.0	119.6 – 337.3

Представлены выборочная средняя ± стандартное отклонение трех биологических повторностей.

Влияние водного дефицита на активность ЛОГ семян и другие признаки мы изучали также в двух наборах линий пшеницы с одними и теми же родителями Чайниз Спринг (ЧС) и Синтетик 6х (Син6х) – в замещенных линиях и интрогрессированных рекомбинантных линиях (ИРЛ). На рис. 3 влияние засухи наглядно выражено в Индексах устойчивости признаков (отношение значений признака в условиях засухи к значениям признаков в контроле в %, ИУ%). В обоих наборах линий родители различались по ИУ% активности ЛОГ. В эксперименте с 3Л (рис. 3, а) уровень активности ЛОГ в условиях засухи значительно возрастал у сорта ЧС, а у Син6х, напротив – снижался. Такая же

тенденция наблюдалась и по скорости агрегации клейковинных белков (САБ). По ИУ% большинства признаков Синбх и ЧС статистически значимых различий не проявили. Такие признаки, как Активность ЛОГ, Масса флагового листа и Скорость агрегации белков под действием засухи лучше сохранялись у ЧС, а Масса побега – у Синбх.

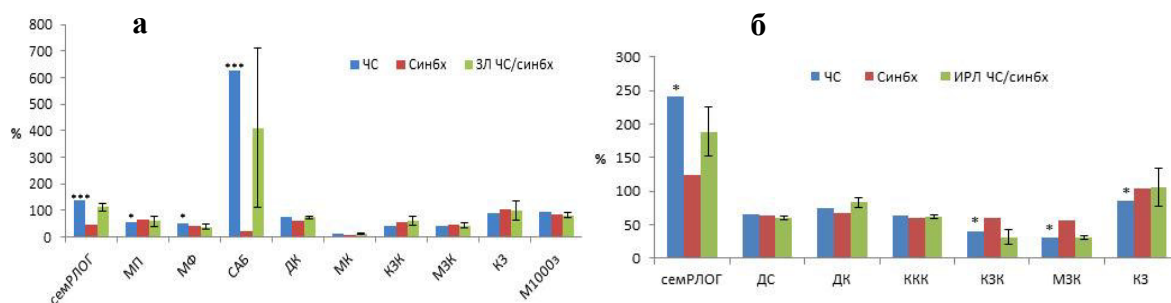


Рис. 3. Индексы устойчивости к засухе активности растворимой липоксигеназы семян и компонентов урожая у родителей Чайниз Спринг и Синтетик 6х и разброс значений в наборах замещенных (а) и интрогрессированных рекомбинантных линий (б) пшеницы.

ЧС - Чайниз Спринг, Синбх - Синтетик 6х, ЗЛ - замещенные линии, ИРЛ - интрогрессированные рекомбинантные линии, семРЛОГ – активность растворимой ЛОГ семян, МП – масса побега в стадии цветения, МФ – масса флагового листа, САБ – скорость агрегации белков, ДК – длина колоса, ДС – длина стебля МК – масса колоса, ККК – количество колосков в колосе; КЗК – количество зерен в колосе, МЗК – масса зерна в колосе, КЗ – крупность зерна, М1000з – масса 1000 зерен. *, ***, – значимость различий средних значений сорта-реципиента Чайниз Спринг и синтетической пшеницы Синтетик 6х при $P \leq 0.05, 0.001$.

В эксперименте с ИРЛ (рис. 3, б) под воздействием засухи уровень активности ЛОГ увеличивался у обоих родителей, но ИУ% активности ЛОГ был значительно выше у ЧС. Ферментативная активность у ЧС под воздействием засухи увеличилась в 2,4 раза, а у Синбх увеличилась только на 23.5%. ИУ% параметров зерновой продуктивности Количество зерен в колосе (КЗК), Масса зерна в колосе (МЗК), Крупность зерна (КЗ) оказались выше у Синбх, т.е. Синбх, имеющий более низкую активность семенной ЛОГ и незначительно, в сравнении с сортом ЧС, увеличивающий ее под влиянием засухи, лучше сохранял зерновую продуктивность.

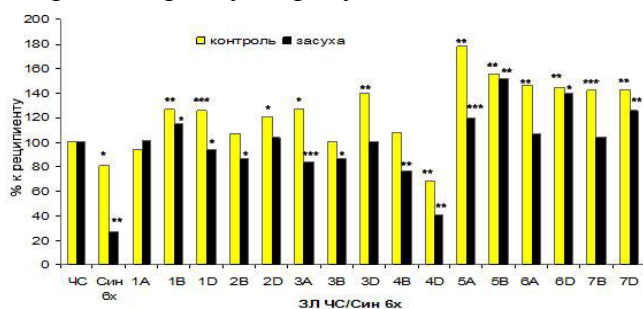


Рис. 4. Активность ЛОГ семян у замещенных линий пшеницы Чайниз Спринг/Синтетик 6х и их родителей при разных режимах водообеспечения относительно сорта-реципиента Чайниз Спринг.

*, **, *** – значимость различий с ЧС при $P \leq 0.05, 0.01, 0.001$.

На примере ЗЛ ЧС/Синбх было показано, что уровень активности растворимой ЛОГ семян и эффект замещения по этому признаку у отдельных генотипов отличался в зависимости от водного режима. При оптимальных условиях он проявился у одной линии – с замещением хромосомы 4D, а в условиях засухи у шести ЗЛ – 1D, 2В, 3А, 3В, 4В и 4D (рис. 4). Эти данные свидетельствуют о том, что многие хромосомы участвуют в генетическом контроле активности ЛОГ и о том, что контроль ферментативной активности при водном дефиците более сложный.

Таким образом, наши результаты изучения активности растворимой ЛОГ семян показывают ее связь с продуктивностью зерна и качеством клейковины пшеницы. Полиморфизм по активности растворимой ЛОГ семян оказался связанным не только с хромосомами, несущими структурные гены этого фермента, но и с другими хромосомами, что указывает на существование и экспрессию регуляторных генов, модулирующих функциональную активность ЛОГ семян в разных условиях среды.

2. Липоксигеназы проростков пшеницы

Липоксигеназы проростков изучали у ИРЛ ЧС/Син6х по хромосоме 5D и их родителей. Семена проращивали в течение трех суток на воде и 12% растворе полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ6000), имитируя осмотический стресс у растений при действии засухи.

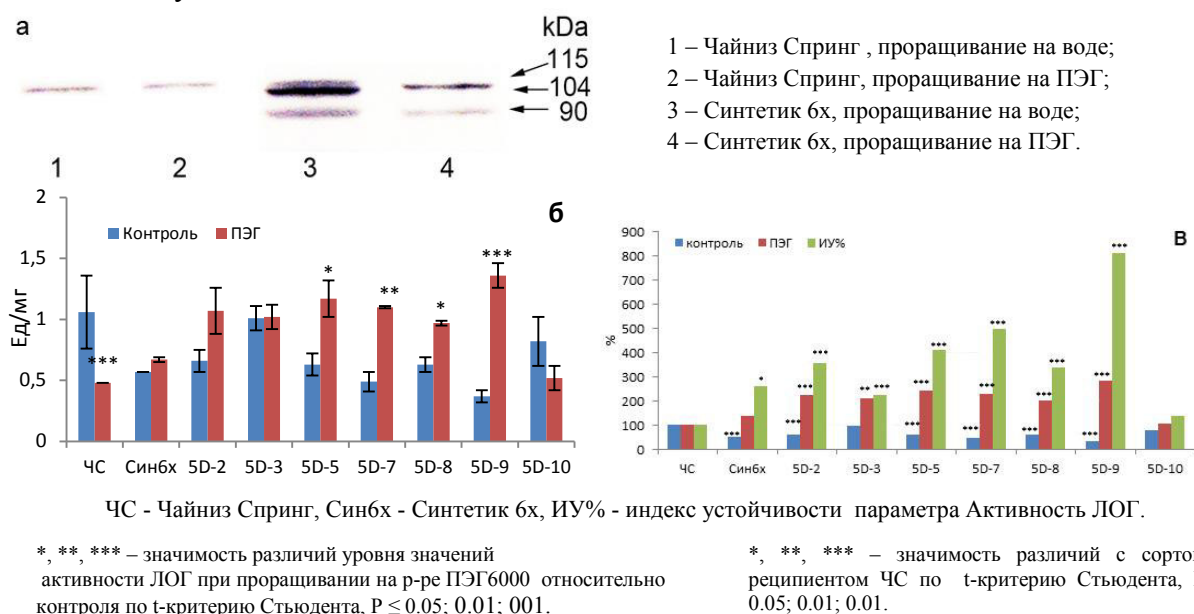


Рис. 5. Молекулярные формы и активность ЛОГ во фракции растворимых белков из проростков пшеницы интрогрессированных рекомбинантных линий Чайниз Спринг/Синтетик 6х по хромосоме 5D.

Изоферментный состав ЛОГ проростков, изученный методом вестерн-блоттинга, различался у родителей ИРЛ ЧС/Син. Во фракции растворимых белков (рис. 5, а) у сорта ЧС была обнаружена одна молекулярная форма ЛОГ с молекулярной массой 104 кДа, как в контроле, так и в условиях стресса. У Син6х обнаружили три молекулярные формы фермента с молекулярной массой 90, 104 и 115 кДа, однако в условиях стресса молекулярная форма 115 кДа не выявилась. В условиях стресса у обоих родителей отмечалось уменьшение содержания ЛОГ-белка (снижение интенсивности окраски полос).

Активность растворимой формы ЛОГ проростков в контрольных условиях проращивания на воде у ЧС была немного выше, чем у Син6х, но снижалась более чем в 2 раза при проращивании на ПЭГ6000 (рис. 5, б). У Син6х активность ЛОГ в стрессовых условиях значимо не изменялась. Уровни значений активности в ИРЛ варьировали, однако относительно сорта реципиента все линии, за исключением 5D-10, независимо от

условий проращивания, а также по ИУ% показали тенденции донора хромосом Син6х (рис. 5, в).

В микросомальной фракции (рис. 6, а) у ЧС выявилось две изоформы ЛОГ с молекулярным весом 104 и 90 кДа. Интенсивность окраски изофермента 104 кДа была меньше при осмотическом стрессе. Те же молекулярные формы ЛОГ были обнаружены у Син6х, но в отличие от ЧС, у Син6х содержание изофермента 104 кДа было выше в контрольных условиях и увеличивалось в условиях стресса. Кроме того у Син6х была обнаружена дополнительная изоформа 115 кДа.

В микросомальной белковой фракции уровень активности ЛОГ в контрольных условиях проращивания на воде у родителей статистически значимо не отличался. В условиях осмотического стресса уровень активности ЛОГ у ЧС не изменялся, а у Син6х увеличивался почти в 2 раза (рис. 6, б). В контроле по уровню ферментативной активности линии 5D-3 и 5D-5 отличались от сорта-реципиента ЧС, но только одна линия 5D-5 была выше ЧС. В условиях стресса линии 5D-2, 5D-3, 5D-5, 5D-6, как и Син6х, отличались от реципиента. Эти линии показали такой же характер изменения уровня активности ЛОГ под воздействием стресса, как Син6х (рис. 6, в).

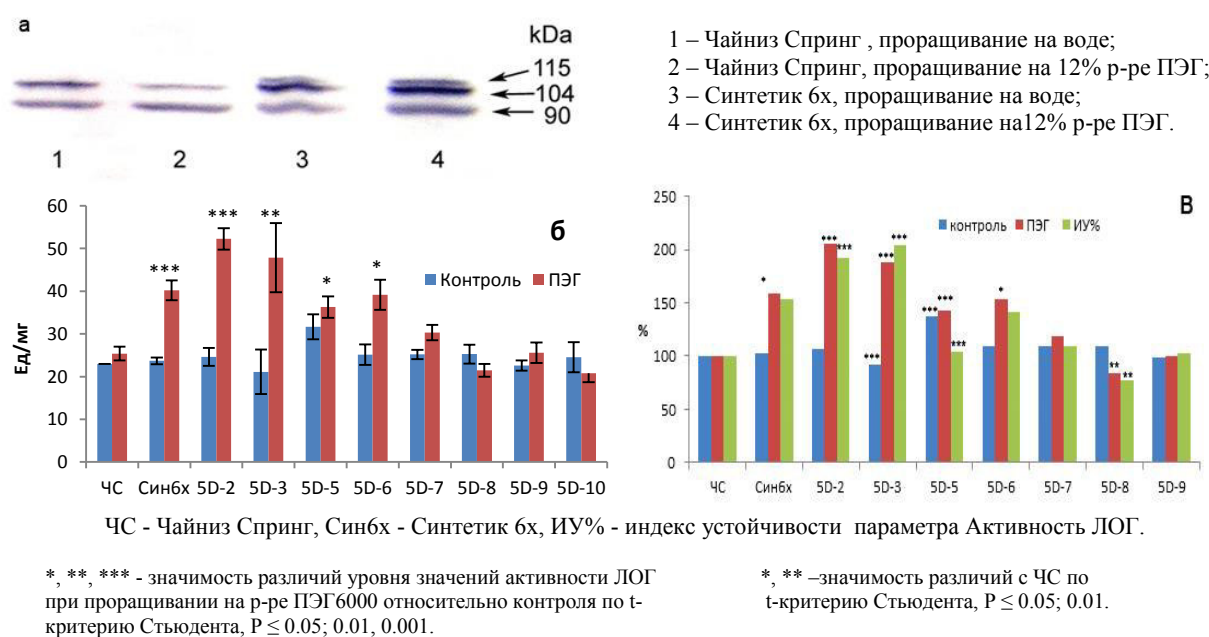


Рис. 6. Молекулярные формы и активность ЛОГ в микросомальной фракции из проростков пшеницы интрогрессированных рекомбинантных линий Чайниз Спринг/Синтетик6х по хромосоме 5D.

Таким образом, у проростков пшеницы активность мембранной формы фермента была значительно выше, чем растворимой. По сравнению с сортом ЧС, Син6х имел две дополнительные изоформы во фракции растворимых белков и одну микросомальную изоформу 115кДа. Вероятно, с ней связано двукратное увеличение активности мембраной ЛОГ при действии засухи у синтетического гексаплоида. В отличие от сорта ЧС у проростков нескольких линий осмотический стресс инициировал увеличение уровня активности как растворимой, так и микросомальной ЛОГ.

Известно, что при прорастании семян липиды, хранящиеся в эндосперме, разлагаются под действием ферментов, которые синтезируются и секретируются из тканей алейрона и щитка. В результате чего транспортабельные молекулы липидов передаются путем абсорбции щитком для питания растущего эмбриона. Окисление запасных липидов резко возрастает в течение прорастания, а продукты ЛОГ были обнаружены в запасных триацилглицеридах и, в большей степени, в фосфолипидах, окружающих липидные тела как монослой. Известно также, что жасмонаты, наряду с гибберелином, АБК и этиленом, контролируют прорастание семян растений и их защиту от патогенов посредством гормонального сигналинга, сконцентрированного в алейроновом слое. Очевидно, обе обнаруженные нами формы ЛОГ проростков связаны с катаболизмом липидов эндосперма. На основании анализа литературных и полученных нами геномных данных (глава 5) мы также предполагаем, что они участвуют в мобилизации связанных с поверхностью крахмальных гранул фосфо- и галактолипидов, которые происходят из остатков деградировавших в процессе высыхания семени липидных мембран амилопласта, и вместе с липид-переносящими белками пуроиндолинами вовлечены в гормональный сигналинг в алейроновом слое при прорастании семян пшеницы.

3. Липоксигеназы листьев пшеницы

Изученные генотипы Чайниз Спринг и Синтетик бх различались по составу как растворимых, так и мембранных липоксигеназ листьев (рис. 7). Во фракции растворимых белков листьев (листРЛОГ) в контрольных условиях у сорта ЧС выявилась одна молекулярная форма 90 кДа, а Синбх имел две растворимые молекулярные формы 90 и 104 кДа. В условиях засухи молекулярный состав у ЧС оставался без изменений, а у Синбх появлялась третья изоформа 115 кДа. Интенсивность окраски изоформ во всех случаях была выше у синтетической пшеницы (рис. 7, а).

В микросомальной фракции (листМЛОГ) сорт ЧС независимо от условий водообеспечения имел одну молекулярную форму 115 кДа, интенсивность окраски которой значительно снижалась в условиях засухи. У Синбх в контроле, кроме изоформы 115 кДа выявлялись еще две дополнительные изоформы 90 и 104 кДа, однако, изоформа 115 кДа исчезала в условиях засухи. Содержание белка оставшихся изоформ у Синбх незначительно снижалось при водном дефиците (рис. 7, б).

Во фракции растворимых белков хлоропластов (хлРЛОГ) Чайниз Спринг и Синтетик бх тоже отличались по количеству изоферментов ЛОГ. ЧС имел две молекулярные формы 90 и 104 кДа, а Синбх только одну 90 кДа. В условиях засухи количество изоферментов у генотипов оставалось неизменным (рис. 7, в).

Во фракции хлоропластных мембранных белков (хлМЛОГ) у ЧС в контроле было две молекулярные формы 104 и 90 кДа, в условиях засухи выявлялась третья молекулярная форма 115 кДа, а интенсивность окраски изоформы 104 кДа значительно увеличивалась. У Синбх как в контроле, так и в условиях засухи выявлялась только одна молекулярная форма 90 кДа, а ее содержание было слегка выше в условиях водного дефицита (рис. 7, г).

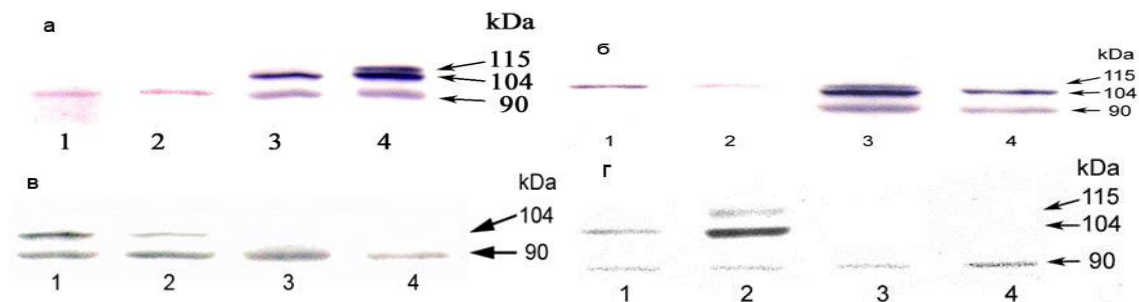


Рис. 7. Изоферментный состав липоксигеназы листьев в стадии кушения у сорта пшеницы Чайниз Спринг и синтетического гексаплоида Синтетик 6х при разных режимах водообеспечения.

а – Растворимая фракция без хлоропластов (листРЛОГ); б – Микросомальная фракция (листМЛОГ);
в – Растворимая фракция хлоропластов (хлРЛОГ); г – Мембранная фракция хлоропластов (хлМЛОГ);
1 – Чайниз Спринг, нормальное водообеспечение; 2 – Чайниз Спринг, засуха;
3 – Синтетик 6х, нормальное водообеспечение; 4 – Синтетик 6х, засуха.

Таким образом, в листьях пшеницы было обнаружено пять растворимых и шесть связанных с клеточными мембранами молекулярных форм ЛОГ. Изоферментный состав изменялся в зависимости от генотипа и условий выращивания растений. Синтетик 6х, несущий интрогрессии *Ae. tauschii*, в сравнении с сортом ЧС имел по две дополнительные молекулярные формы растворимой и мембранной ЛОГ, однако у него отсутствовали выявляемые у сорта ЧС три_хлоропластные изоформы.

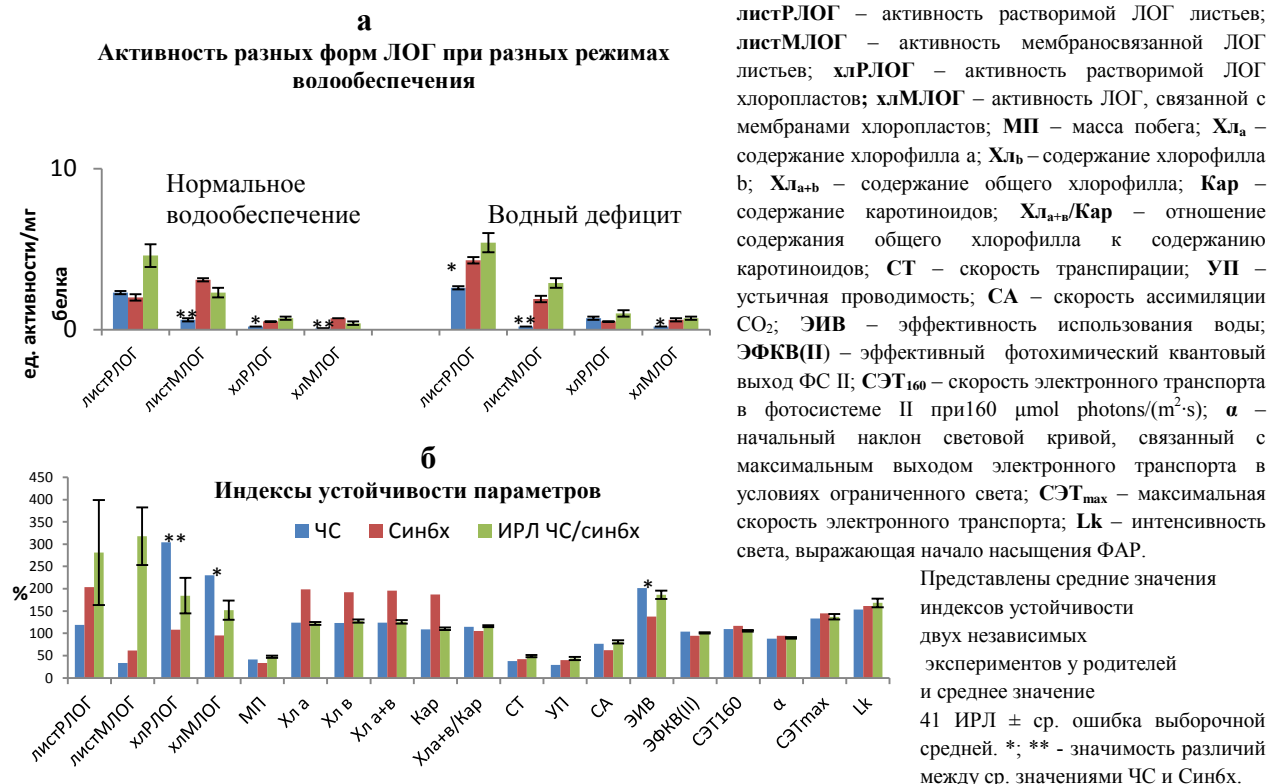


Рис. 8. Активность нескольких форм ЛОГ при разных режимах водообеспечения и индексы устойчивости активности ЛОГ, биомассы, содержания фотосинтетических пигментов, параметров газообмена и флуоресценции хлорофилла у родителей, среднее и разброс значений в наборе интрогрессированных рекомбинантных линий Чайниз Спринг/Синтетик 6х.

Изученные генотипы ЧС и Синбх различались конститутивным уровнем ферментативной активности, а также характером его изменения при водном дефиците. Независимо от условий водного режима наибольшей активностью отличалась листРЛОГ, а наименьшей – хлоропластные формы фермента (рис. 8, а). В условиях водного стресса активность большинства форм ЛОГ увеличивалась или оставалась на том же уровне, кроме активности листМЛОГ, которая значительно уменьшалась у обоих родительских генотипов. Родители различались по уровню активности отдельных форм фермента, содержанию фотосинтетических пигментов, параметрам газообмена при нормальном и (или) недостаточном водообеспечении. ИУ% активности хлоропластных форм ЛОГ были выше у ЧС, но он уступал Синтетикубх по ИУ% растворимых и мембранных форм ЛОГ листьев. Одновременно ЧС и Синбх показали значимые различия по ИУ% ЭИВ. Среди ИРЛ по активности всех форм ЛОГ независимо от водного режима и по ИУ% многих параметров наблюдалась высокая вариабельность (рис. 8, б).

Результаты корреляционного анализа показали, что активности четырех изученных форм фермента были слабо взаимосвязаны. Коррелировали между собой только активности двух мембранных форм независимо от водного режима (контроль 0.34**, засуха 0.40**) и растворимой и мембранной форм ЛОГ листьев в условиях засухи (0.27*).

Наибольшее число положительных корреляций с физиологическими признаками обнаружила активность листРЛОГ, более значимые при водном дефиците (табл. 6). Активность микросомальной ЛОГ в условиях засухи показала невысокие положительные корреляции с Содержанием хлорофилла b (0.24*) и Скоростью электронного транспорта в фотосистеме II при 160 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ (СЭТ₁₆₀) (0.26*), а в наборе ЗЛ ЧС/Синбх она была положительно связана с Содержанием связанной воды (0.58*) и Количеством зерен в колосе (0.51*). Эти корреляции и ко-локализация активностей этих форм фермента в геноме (глава 5, рис. 14) позволяет предполагать их синергическое положительное действие в условиях стресса, направленное на защиту фотосинтеза и сохранение зерновой продуктивности.

Таблица 6. Корреляции активности растворимой липоксигеназы листьев с физиологическими параметрами у интродуцированных рекомбинантных линий Чайниз Спринг/Синтетик бх

Параметры	Контроль	Засуха
Масса побега	-0.26*	0.54**
Хлорофилл a+b/ Каротиноиды	0.56**	нз
Скорость транспирации	0.23*	0.41**
Устьичная проводимость	0.26*	0.44**
СЭТ ₁₆₀	0.51**	0.41**
СЭТ _{max}	0.38**	0.54**

n=65. СЭТ₁₆₀ – скорость электронного транспорта в фотосистеме II при 160 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$; СЭТ_{max} – максимальная скорость электронного транспорта. *, ** – значимо при P < 0.05; 0.01.

Таблица 7. Корреляции активности ЛОГ, связанной с мембранами хлоропластов с физиологическими параметрами у интродуцированных рекомбинантных линий Чайниз Спринг/Синтетик бх

Параметры	Контроль	Засуха
Хлорофилл a	0.32**	0.30*
Хлорофилл b	0.32**	0.34**
Хлорофилл a+b/ Каротиноиды	0.33**	0.32**
Каротиноиды	0.45**	0.29*
Скорость транспирации	-0.31**	нз

n=65. *, ** – значимо при P < 0.05; 0.01.

Хлоропластная мембранная форма фермента независимо от водного режима была положительно связана с содержанием хлорофиллов и каротиноидов (табл. 7). Активность растворимой ЛОГ хлоропластов не проявила значимых корреляций, за исключением невысокой отрицательной корреляции с СЭТ₁₆₀ (-0.25*), однако в эксперименте с более суровой засухой она положительно коррелировала с нефотохимическим тушением флуоресценции хлорофилла (NPQ) (0.46**).

Продукты ЛОГ способны разрушать каротиноиды (Feussner, Wasternack, 2002), но известно, что в окислении каротиноидов в виолаксантиновом цикле и синтезе АБК участвуют не ЛОГ, а каротин-разрушающие диоксигеназы. Тем не менее, положительная корреляция активности хлМЛОГ с содержанием каротиноидов и хлРЛОГ с параметром NPQ, может предполагать причастность обеих хлоропластных форм ЛОГ к нефотохимическому тушению флуоресценции хлорофилла, защищающему фотосинтетический аппарат от деструкции АФК, на регуляторном уровне, вследствие перекрестной сигнализации АБК и ЖАК (Dave et al., 2011).

Наибольшее число положительных корреляций с физиологическими признаками обнаружила активность листРЛОГ, что свидетельствует о преимуществе ее положительного влияния на адаптацию к засухе среди всех форм ЛОГ. Поэтому в листьях рекомбинантных замещенных дигаплоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2A (РЗДЛ С29/ЯП2A) изучали именно эту форму липоксигеназы (табл. 8).

Таблица 8. Активность растворимой ЛОГ листьев у родительских сортов и рекомбинантных замещенных дигаплоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2A при разных режимах водообеспечения

Признаки	Родители		РЗДЛ С29/ЯП2A	
	С29	ЯП	Ср. ± ст. откл	Размах изменчивости
Оптимальный полив	16.4 ± 3.5	11.0 ± 3.4***	15.5 ± 5.6	4.0 – 30.3
Водный дефицит	21.6 ± 3.8	16.9 ± 3.8***	17.1 ± 6.5	4.7 – 33.3

С29 – Саратовская 29, ЯП – Янецкис Пробат; РЗДЛ С29/ЯП2A – рекомбинантные замещенные дигаплоидные линии пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2A. Представлены средние значения восьми биологических повторностей для родителей, двух биологических повторностей для РЗДЛ ± стандартное отклонение. *** – значимость различий между средними значениями С29 и ЯП при P < 0.001.

РЗДЛ С29/ЯП2A созданы в ИЦиГ СО РАН, изучены по признакам развития и зерновой продуктивности и генотипированы SNP-маркерами. Нами было проведено фенотипирование 92 РЗДЛ С29/ЯП2A и родительских генотипов по активности растворимой ЛОГ, биомассе надземной части побега, содержанию фотосинтетических пигментов, параметрам газообмена и флуоресценции хлорофилла в листьях в контрастных условиях водообеспечения и по ИУ% признаков (рис. 9).

У сорта ЯП ферментативная активность была ниже, чем у С29 в обоих условиях водного режима. Оба родителя увеличивали активность ЛОГ под влиянием засухи, однако у ЯП это увеличение было больше. Кроме активности ЛОГ, под воздействием засухи у обоих родителей увеличивалась транспирация и уменьшалась эффективность использования воды (ЭИВ), незначительно увеличивались или оставались на том же

уровне содержание фотосинтетических пигментов и их отношение, а также параметры флуоресценции хлорофилла.

Различия между родителями были обнаружены по индексам устойчивости активности ЛОГ, фоновой флуоресценции хлорофилла в темноте (F_0) и нефотохимическому тушению флуоресценции (NPQ). Под влиянием засухи активность ЛОГ увеличивалась у обоих родителей, но у С29 в меньшей степени. Фоновая флуоресценция у сорта ЯП увеличивалась. Высокий уровень этого параметра свидетельствует о том, что растение испытывает стресс. Нефотохимическое тушение флуоресценции у ЯП снижалось. У С29, напротив, этот параметр увеличивался, а F_0 снижалось, свидетельствуя об отсутствии негативного влияния дефицита воды на поддержание уровня ассимиляции CO_2 в условиях снижения биомассы листа. Эти результаты говорят о различии в стратегии адаптации к засухе у родительских сортов, связанном с различиями в нефотохимическом тушении флуоресценции хлорофилла и уровне активности ЛОГ, но не проявляющиеся в статистически значимом различии по другим признакам при данных условиях эксперимента.

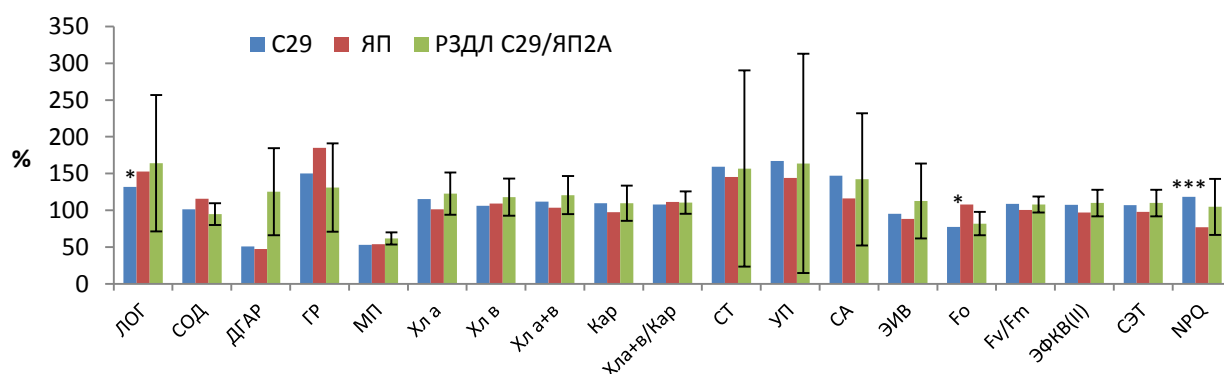


Рис. 9. Индексы устойчивости параметров у родительских сортов среднее и разброс значений в наборе рекомбинантных замещенных дигамплоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2А.

С29 – Саратовская 29, ЯП – Янецкис Пробат, РЗДЛ С29/ЯП2А – рекомбинантные замещенные дигамплоидные линии пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2А, ЛОГ – активность липоксигеназы; СОД – активность супероксиддисмутазы; ДГАР – активность дигидроаскорбатредуктазы; ГР – активность глутатион редуктазы; $Хл_{a+b}$ – содержание общего хлорофилла; $Хл_{a+b}/Кар$ – отношение содержания общего хлорофилла к содержанию каротиноидов; СТ – скорость транспирации; УП – устьичная проводимость; СА – скорость ассимиляции CO_2 или нетто-фотосинтез; ЭИВ – эффективность использования воды ($СА/СТ$); F_0 – фоновая флуоресценция хлорофилла в темноте, измеряемая при низкой интенсивности света, для сохранения открытыми реакционных центров ФС II; F_v/F_m – максимальная (потенциальная) квантовая эффективность ФС II; ЭФКВ(II) – эффективный фотохимический квантовый выход ФС II; СЭТ – скорость электронного транспорта; NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции. Представлены средние значения восьми биологических повторностей для родителей и двух биологических повторностей для 92 РЗДЛ $\pm$ стандартное отклонение. *, *** – значимость различий между средними значениями С29 и ЯП при $P < 0.05$; 0.001.

Корреляционный анализ между физиологическими параметрами среди 92 РЗДЛ С29/ЯП2А выявил статистически значимую ($P < 0.05$ и 0.01) взаимосвязь между ИУ% активности ЛОГ и параметров Масса побега (0.20*), Скорость ассимиляции CO_2 (0.28**), Эффективность использования воды (0.30**), Эффективный фотохимический квантовый выход ФС II (0.20**) и Скорость электронного транспорта (0.27**).

Анализ методом главных компонент (ГлК) показал высокий вклад в разнообразие среди РЗДЛ признака Активность ЛОГ, независимо от условий водообеспечения (от 0.16

до 0.95) во всех четырех ГлК (табл. 9). Доля разнообразия признака Активность ЛОГ в ГлК2 и ГлК3 уменьшалась в условиях засухи. Доля разнообразия активности ЛОГ в ГлК1, которая имела наибольший вклад в общее разнообразие, увеличивалась при водном дефиците, составляя максимальное значение (0.95%).

Таблица 9. Главные компоненты вклада изученных признаков в разнообразие среди рекомбинантных замещённых дигаплоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2А в контрастных условиях полива

Глав-ные ком-понен-ты	Оптимальный полив		Водный дефицит	
	Вклад в общее разнообразие, %	Доля разнообразия определённых признаков в ГлК	Вклад в общее разнообразие, %	Доля разнообразия определённых признаков в ГлК
ГлК1	43,1	УП (-0.92); ЛОГ (0.22) ; ДК (0.22); ЭИВ (0.11)	37,1	ЛОГ (0.95) ; М1000 (-0.17); УП (-0.13); КЗК (-0.12); ДК (-0.11)
ГлК2	17,2	ЛОГ (0.66) ; СЭТ (0.51); F ₀ (-0.34); УП (0.27); ДК (0.26)	22,7	ДК (0.65); УП (0.41); ВЗР (0.33); М1000 (0.25); ЧЗВ (-0.22); ЧЗР (-0.20); КЗК (0.18); ЛОГ (0.16) ; ЭИВ (0.13)
ГлК3	16,1	ДК (0.65); ЧЗВ (-0.35); ЧЗР (-0.31); ЛОГ (-0.28) ; КЗК (-0.20); F ₀ (0.16); СОД (0.14); УП (0.16); ККК (0.13); МП (0.10); ДЦ (0.10)	21,9	УП (-0.60); ВЗР (0.50); ЧЗВ (0.29); ДК (0.22); КЗК (0.14); ЛОГ (0.18) ; ЭИВ (0.10)
ГлК4	10,4	ЛОГ (-0.65) ; СЭТ (0.54); КЗК (0.27); ЧЗВ (0.12); ЧЗР (0.12)	-	-

Приведены признаки, чья доля составила не менее 0.10.

ЛОГ – уровень активности липоксигеназы; СОД – уровень активности супероксиддисмутазы; УП – устьичная проводимость; ЭИВ – эффективность использования воды; СЭТ – скорость электронного транспорта; F₀ – базовый выход флуоресценции хлорофилла; МП – масса побега; ДК – число дней до кущения; ДЦ – число дней до цветения; ККК – количество колосков в главном колосе; КЗК – количество зерен в главном колосе; ВЗВ – вес зерна вторичных колосьев; ЧЗР – число зерен с растения; ВЗР – вес зерна с растения; М1000 – масса 1000 зерен.

4. Влияние интрогрессии диких злаков в геном *T. aestivum* L. на активность липоксигеназы листьев и физиологические параметры, связанные с засухоустойчивостью

Дикие родственники *T. aestivum* L. генетически гораздо более разнообразны, чем культивируемые пшеницы, обладают устойчивостью к разным биотическим и абиотическим стрессам и их сочетанию и поэтому представляют собой полезные генетические ресурсы для повышения разнообразия признаков (Rauf et al., 2010).

Секвенирование генома *Ae. tauschii* показало в сравнении с *T. aestivum* усиленный набор генов для адаптации к неблагоприятным факторам, включая гены белков, которые могут быть связаны с липидным метаболизмом, инициированным ЛОГ (белки, обогащенные лейциновыми повторами, цитохромы P450, ТФ DREB2 и MYB). Анализ экспрессии генов по данным РНК-секвенирования показал, что большинство из них были конститутивно выражены у *Ae. tauschii* (Jia et al., 2013).

Для изучения влияния интрогрессии *Ae. tauschii* в геном мягкой пшеницы на активность нескольких форм ЛОГ и физиологические признаки использовали ИРЛ пшеницы ЧС /Син 6х по хромосомам генома D. В предыдущих главах было показано, что Синтетик 6х, несущий интрогрессии *Ae. tauschii* в сравнении с сортом ЧС имел по две дополнительные молекулярные формы растворимой и мембранной ЛОГ, однако у него

отсутствовали выявляемые у сорта ЧС три хлоропластные изоформы (рис. 7). Родители различались по уровню значений активности отдельных форм фермента и изученных физиологических параметров. Под воздействием засухи Синбх увеличивал активность растворимых ЛОГ, в то время как ЧС увеличивал активность хлоропластных форм (рис. 8). Влияние интрогрессии *Ae. tauschii* на уровень значений изучаемых признаков выявляли, сравнивая отдельные ИРЛ и сорт-реципиент ЧС по уровням значений признаков и по тенденциям их изменений под влиянием засухи (ИУ%). Среди интрогрессированных рекомбинантных линий наблюдался широкий размах значений. Это наглядно видно на примере ИУ% ферментативной активности у 20 линий (рис. 10), каждая из которых несет определенный участок интрогрессии *Ae. tauschii* в хромосоме 2D (Pestsova et al., 2006).

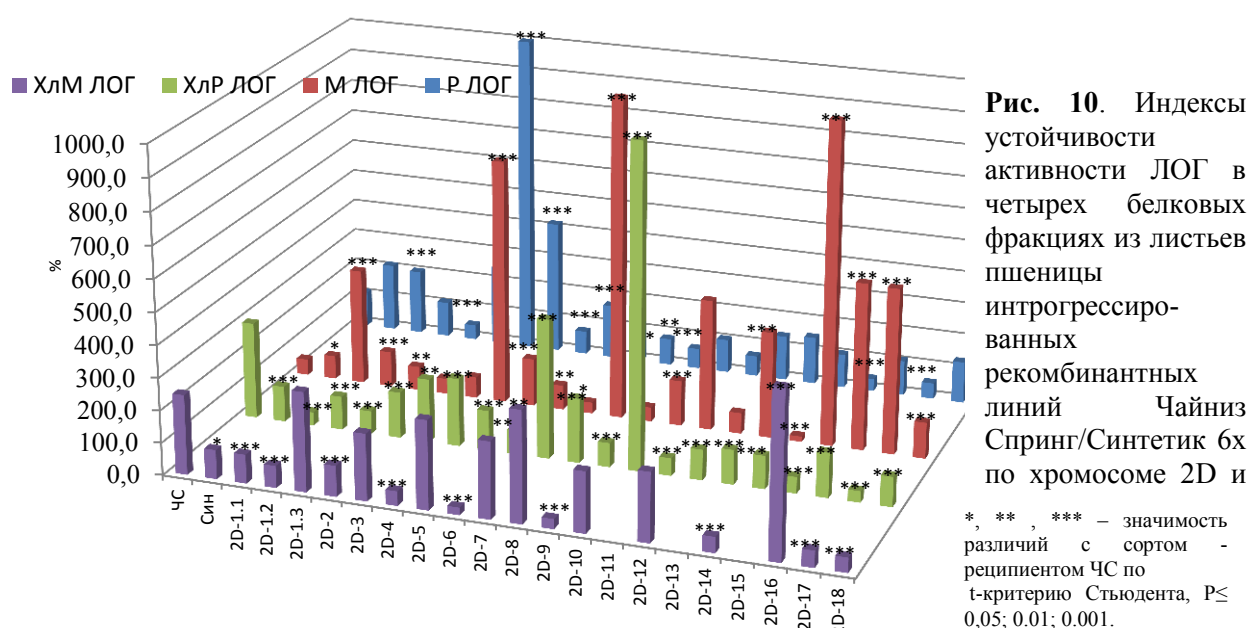


Таблица 10. Средние значения индексов устойчивости параметров в двух выборках интрогрессированных рекомбинантных линий Чайниз Спринг/Синтетик 6х

ИУ%	выборка 1	выборка 2
Скорость транспирации	36.3 ± 6.6	54.1 ± 21.4
Устьичная проводимость	28.4 ± 3.5	48.1 ± 26.5
Эффективность использ. воды	234.1 ± 39.1	181.1 ± 61.5

Выборка 1 включала три линии: 2D-1.1, 2D-4, 2D-18; Выборка 2 включала все 20 ИРЛ по хромосоме 2D. Представлено ср. значение $\pm$ ст. отклонение

Проявление интрогрессии *Ae. tauschii* по активности каждой из четырех форм ЛОГ выявлялось у разных линий, так как ИРЛ имеют разные участки интрогрессии в хромосоме 2D, а, как будет показано далее, несколько генетических факторов, независимо регулирующих активность отдельных форм фермента, находятся в разных областях хромосомы 2D (рис. 13). Только три линии 2D-1.1, 2D-4 и 2D-18 в основном повторяли тенденцию донора по активности всех изученных форм ЛОГ, как при оптимальных, так и водodefицитных условиях, а также по их ИУ% (рис. 10). По сравнению со средними значениями в наборе всех линий, под влиянием водного дефицита они сильнее снижали

устычную проводимость и транспирацию и увеличивали эффективность использования воды (табл. 10).

Такая же адаптивная стратегия проявилась и у линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в хромосомы 2А, 2В и 5А генома сорта Саратовская 29, который отличается очень высокой засухоустойчивостью, но неустойчив к грибным болезням. Линия 821 обладает устойчивостью к листовой ржавчине, имеет высокое содержание клейковины в зерне и отличные хлебопекарные качества (Обухова и др., 2008).

Линия 821 при водном дефиците в 4 раза увеличивала активность ЛОГ, снижала скорость транспирации, устьичную проводимость и нетто фотосинтез, соответственно увеличивая эффективность использования воды (рис. 11). Также слегка снижался уровень фотосинтетических пигментов и нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, но уровень параметров флуоресценции хлорофилла не изменялся. Сорт С29 в условиях ограничения полива напротив снижал активность ЛОГ, увеличивал устьичную проводимость и транспирацию, сохраняя при этом ЭИВ на высоком уровне. Эти данные могут свидетельствовать о конститутивной устойчивости к засухе у сорта С29 и активации адаптации у линии с интрогрессиями от *T. timopheevii*.

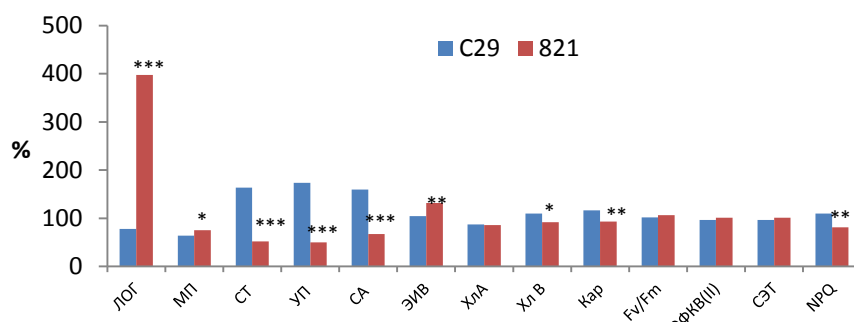


Рис. 11. Индексы устойчивости параметров к засухе у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii*.

СТ – скорость транспирации; УП – устьичная проводимость; СА- скорость ассимиляции CO₂ (неттофотосинтез); ЭИВ – эффективность использования воды; Fv/Fm – максимальная (потенциальная) квантовая эффективность ФС II; ЭФКВ(II)- эффективный фотохимический квантовый выход ФС II; СЭТ – скорость электронного транспорта; NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции. Значимость различий ИУ% параметров с сортом – реципиентом: * – P < 0.05; ** – P < 0.01; *** – P < 0.001.

Есть основание полагать, что адаптация к засухе у обоих диких злаков, *T. timopheevii* и *Ae. tauschii*, включает липидную мобилизацию и сигнализацию, инициируемую увеличением активности растворимой ЛОГ, которая участвует в регуляции устьичных эффектов.

Исследование интрогрессивных линий Родина х *Ae. speltoides* показало, что интрогрессия сегментов генома *Ae. speltoides*, в геноме *T. aestivum* вызывала изменение активности растворимой ЛОГ семян. Уровни ферментативной активности находились в прямо пропорциональной зависимости от степени выраженности интрогрессии, выявленной при помощи субтеломерного повтора Spelt 1 (Salina et al., 2001) (рис. 12).

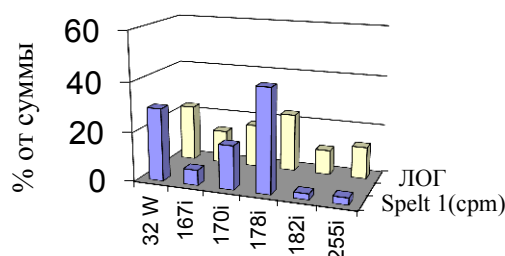


Рис.12. Субтеломерный повтор Spelt1 и активность липоксигеназы в интрогрессированных линиях Родина х Ae. *speltoides* в % от суммы.

Все линии с высоким содержанием Spelt 1 несли замещение 7S/7D, а хромосома 7S эгиплопса гомеологична хромосоме 7В гексаплоидной пшеницы. Именно на хромосоме 7В был картирован ЛКП, ассоциированный с активностью ЛОГ (рис. 13). Вероятно, на хромосоме 7В находится ген для активности ЛОГ, который был привнесен от Ae. *speltoides* – дикого предка генома В гексаплоидной пшеницы.

5. Картирование в геноме пшеницы локусов, ассоциированных с активностью липоксигеназы и физиологическими признаками

Картирование локусов, ассоциированных с активностью растворимой липоксигеназы семян и параметрами качества клейковины при помощи рекомбинантных инбредных линий пшеницы ITMI.

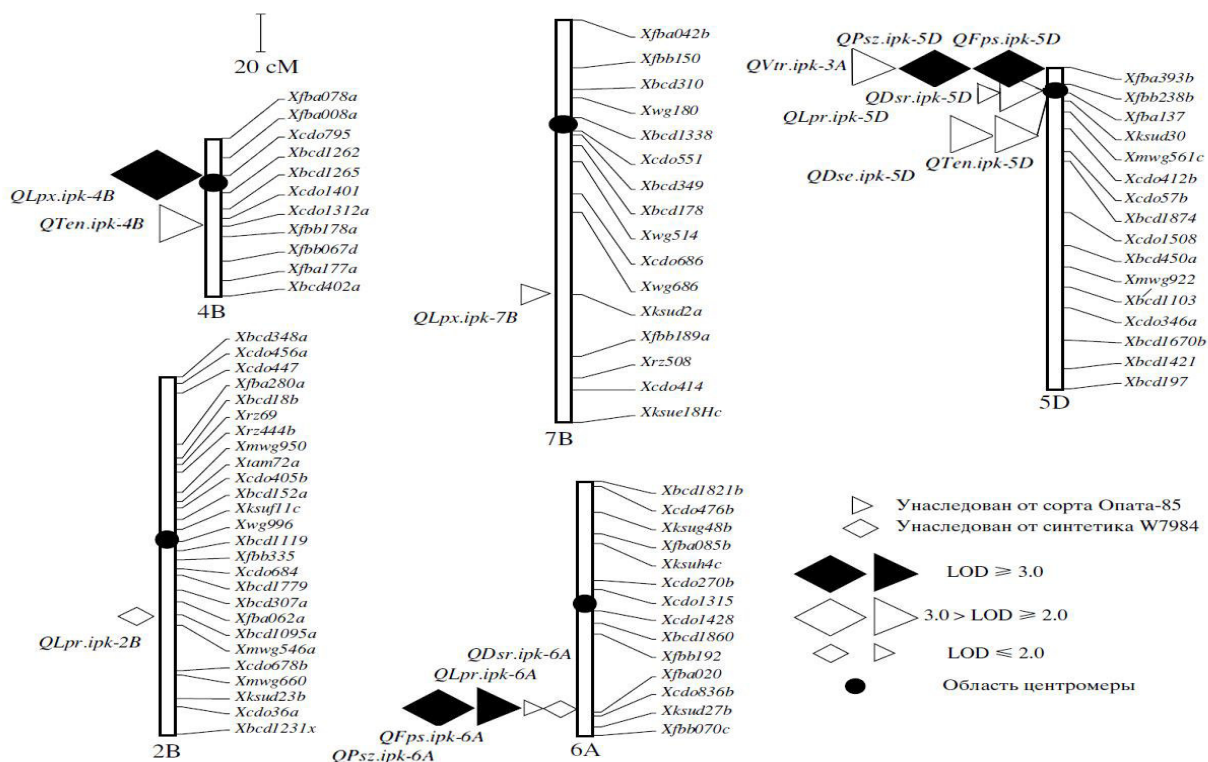


Рис. 13. Локусы, ассоциированные с активностью растворимой липоксигеназы семян, отношением активностей липоксигеназа / тиолпротеиндисульфид оксидоредуктаза и тесно сцепленными признаками при помощи рекомбинантных инбредных линий ITMI.

Обозначения ЛКП: *QLpx.ipk-4B*, *QLpx.ipk-7B* – Активность ЛОГ; *QDsr.ipk-7D*, *QDsr.ipk-5D*, *QDsr.ipk-6A* – Активность ТПДО; *QLpr.ipk-5D*, *QLpr.ipk-6A*, *Lpr.ipk-2B* – Отношение активностей ЛОГ/ТПДО; *QTen.ipk-4B*, *QTen.ipk-5D* – Упругость теста; *QFps.ipk-5D*, *QFps.ipk-6A* – Размер частиц муки; *QPsz.ipk-6A*, *QPsz.ipk-5D* – Удельная поверхность частиц муки; *QVtr.ipk-2D* – Стекловидность; *QDse.ipk-5D* – Сила муки.

С использованием популяции ITMI нами был идентифицирован высоко достоверный локус *QLpx.ipk-4B* на коротком плече хромосомы 4B, ответственный за полиморфизм по активности растворимой ЛОГ семян (рис. 13). Второй минорный локус для активности ЛОГ *QLpx.ipk-7B* был обнаружен на хромосоме 7B. Он достоверно проявился только в благоприятных условиях выращивания 2000 года.

Отношение активности ЛОГ, способной окислять SH-группы белков с образованием SS-связей к активности тиолпротеиндисульфид оксидоредуктазы (ТПДО), катализирующей противоположный процесс разрыва SS-связей, может влиять на ред/окс состояние клетки. Для отношения активностей ЛОГ/ТПДО было выявлено три ЛКП на хромосомах 5D, 6A и 2B.

Картинирование локусов, ассоциированных с активностью разных форм липоксигеназы и физиологическими параметрами при помощи интрогрессированных рекомбинантных линий пшеницы Чайниз Спринг/Синтентик 6х по хромосомам генома D. На основании данных по вариабельности активности ЛОГ в нескольких белковых фракциях семян, проростков и листьев у ИРЛ ЧС/Син6х в условиях разного водообеспечения нами было обнаружено семь ЛКП с LOD-баллом от 1.9 до 2.9 ($P < 0.01$) и три ЛКП с LOD-баллом 1.6 и 1.7 ($P < 0.05$) (рис. 13). Все локусы проявились при неблагоприятных условиях. Исключение составляет локус, ассоциированный с активностью растворимой ЛОГ семян на коротком плече хромосомы 4D, который выявился независимо от условий водообеспечения. Этот локус может быть связан с присутствием в данном регионе трех известных структурных генов биосинтеза изоферментов 9-ЛОГ (Feng et al., 2010); он ко-локализован с ЛКП для параметра ЭИВ при нормальном водообеспечении и, вероятно, не имеет прямого отношения к засухоустойчивости.

У проростков в условиях, имитирующих засуху, активности растворимой и микросомальной форм ЛОГ были картированы в разные области хромосомы 5D. Оба локуса находятся в положении сходном с двумя известными локусами (*Fpl-1* и *Fpl-2*), ответственными за уровень свободных полярных липидов эндосперма (Morrison et al., 1989), что свидетельствует о причастности обеих форм фермента к метаболизму полярных липидов при водном дефиците. Локус активности растворимой ЛОГ проростков на длинном плече хромосомы 5D был ко-локализован с параметрами Масса побега, Содержание каротиноидов и Скорость электронного транспорта. ЛКП, ассоциированный с активностью мембраносвязанной ЛОГ на коротком плече в районе маркера *Xgwm 190* оказался ко-локализованным с тремя параметрами газообмена и Эффективным фотохимическим квантовым выходом ФС II при нормальном водном режиме, Длиной стебля в условиях засухи и индексами устойчивости Массы побега, двух параметров электронного транспорта и нескольких параметров зерновой продуктивности.

ЛКП, связанный с активностью растворимой ЛОГ на 5DL, может совпадать с идентифицированными другими авторами структурным геном 13-ЛОГ (Feng et al., 2010) и ЛКП различных параметров развития растений пшеницы (Pestsova et al., 2006). Локус прМЛОГ на коротком плече хромосомы 5D может играть роль в регулировании текстуры эндосперма, его мягкости или твердости. В настоящее время молекулярными маркерами мягкозерности считают расположенные на поверхности крахмальных гранул эндосперма

липид-трансферные белки пуроиндолины *Pina* и *Pinb*, которые, как и ЛОГ, обладают сильными антигрибными и антимикробными свойствами (Pauly et al., 2013). Результаты известных геномных исследований показывают ко-локализацию генов *Pina-D1*, *Pinb-D1* и *Fpl-2* в главном локусе, контролирующем твердозерность (*Ha*) в дистальном конце хромосомы 5D (Turnbull, Rahman, 2002). В этой же области находится кластер ЛКП параметров текстуры эндосперма и качества клейковины, сцепленный с маркером *Xgwm190* (Nelson et al., 2006). Найденный нами локус для активности прМЛОГ находится в той же позиции и сцеплен с тем же маркером *Xgwm190*. Это может свидетельствовать об участии этой формы фермента в определении текстуры эндосперма.

Рис. 14. Хромосомные области, ассоциированные с активностью липоксигеназы и физиологическими параметрами в геноме *D. T. aestivum* L. при водном дефиците.

НВО – нормальное водообеспечение; ВД – водный дефицит; ИУ – индекс устойчивости.

Локус, ассоциированный с активностью листРЛОГ, был картирован в центромерной области хромосомы 7D и был ко-локализован с локусами, регулирующим активность мембранной формы ЛОГ, содержание фотосинтетических пигментов, ЭИВ, нетто-фотосинтез и активность двух ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Эта область на хромосоме 7D, вероятно, тоже имеет отношение к текстуре эндосперма: ЛКП для мукомольного выхода муки, зависящего от степени твердозерности, был найден в аналогичном положении, сцепленный с маркером *Xgwm 111* (Parker et al., 1999), как и активность листРЛОГ в нашем исследовании, а гомеоаллели вариантных форм *Pin b* были обнаружены на всех хромосомах седьмой гомеологической группы (Chen et al., 2011).

Кроме того, этот хромосомный регион, ассоциированный с активностью листРЛОГ и листМЛОГ, может быть ответственен и за устойчивость к биотическому стрессу, так как ЛКП устойчивости к *Septoria tritici blotch* был сцеплен с теми же маркерами *Xgwm1002* и *Xgwm 44* (Simon et al., 2007). Все вышеперечисленные сведения свидетельствуют о важности центромерной области хромосомы 7D в определении устойчивости и адаптации к разным видам стресса.

Активность мембранной ЛОГ листьев была картирована в дистальной области короткого плеча хромосомы 7D, где была ко-локализована с активностью мембранной ЛОГ хлоропластов при водном дефиците, а также с пигментами фотосинтеза и ЭИВ.

На хромосоме 2D было найдено пять областей, связанных с вариабельностью физиологических параметров, включая активность листРЛОГ и ее ИУ%, а также активность растворимой и мембранной хлоропластных форм ЛОГ. Хлоропластные формы ЛОГ были связаны с отдельными маркерами *Xgwm 261*, *Xgwm539*, *Xgdm93*. Другие авторы обнаружили на хромосоме 2D локусы параметров Масса 1000 зерен (Groos et al., 2003) и Устойчивость к желтой ржавчине пшеницы (Lu et al., 2009), ассоциированные с маркером *Xgwm 261*. В нашей работе (Osipova et al., 2015) в области *Xgwm539* был обнаружен самый большой кластер, включающий ЛКП для разных физиологических параметров, а с *Xgdm93* были связаны параметры газообмена и активность фермента глутатион редуктаза. Интересно, что второй ЛКП для активности этого фермента на хромосоме 2D, сцепленный с маркером *Xgwm102*, совпадает с локусом, ассоциированным с активностью другой формы ЛОГ – листРЛОГ. Ко-локализация уровней активности ЛОГ и ферментов антиоксидантной защиты на хромосомах 2D и 7D, может подтверждать существующие единичные сведения об их совместной регуляции (Bañuelos et al., 2008).

В настоящее время общепринято, что в ответ на засуху через АБК–зависимые и АБК–независимые сигнальные пути вовлекается большое число транскрипционных факторов (ТФ), в том числе ТФ МЫС2 семейства bHLH, который является главным регулятором в большинстве жасмонат-зависимых сигнальных путей. Усиливающие его регуляторный эффект ТФ МЫС3 и МЫС4 вовлечены в генную экспрессию, регулируемую взаимодействием сигнальных путей ЖАК и абсцизовой кислоты в условиях засухи (Abe et al., 2003). У пшеницы гены этих ТФ локализованы на хромосомах 2 гомеологической группы, а на хромосоме 2D МЫС4 был найден ассоциированным с маркером *Xgwm 539* (Shoeva et al., 2014b). С этим маркером в нашей работе был сцеплен ЛКП для активности растворимой ЛОГ хлоропластов и многих других параметров в условиях засухи.

Анализ ко-локализации ЛКП показал, что при водном дефиците с проявлением изученных нами физиологических признаков были связаны определенные районы хромосом генома D. Все выявленные в нашей работе ЛКП, ассоциированные с вариабельностью параметров фотосинтеза, газообмена, биомассы, биометрических показателей или зерновой продуктивности в условиях засухи, в то же время были связаны с вариабельностью активности какой-то из форм ЛОГ. Вероятно, эти хромосомные области несут гены метаболических путей липидов или регуляторов транскрипции, инициированных изоферментами ЛОГ, которые крайне важны для устойчивости и адаптации растений пшеницы к стрессу.

Картирование активности растворимой липоксигеназы листьев при помощи рекомбинантных замещенных диаллоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат 2А. Для тонкого картирования локусов количественных признаков, связанных с устойчивостью к водodefициту, были изучены 92 РЗДЛ Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2А, с небольшими участками рекомбинации генов, генотипированные с помощью 15К чипа. В хромосомном регионе 2А 149.5 – 151.3 сМ был картирован ЛКП для активности ЛОГ при оптимальном водоснабжении, а также три ЛКП, ассоциированных с разными физиологическими признаками при оптимальном водоснабжении и десять ЛКП в условиях засухи (табл. 11). Хромосомный регион 2А 108.5 – 109.5 сМ включал 16 ЛКП при оптимальных условиях и 23 ЛКП при водном дефиците, включая ЛКП, ассоциированный с активностью ЛОГ в условиях засухи. В регионе 2А 102 сМ, близко прилегающем к региону 2А 108.5 – 109.5 сМ, были картированы 9 ЛКП для различных признаков при нормальном водообеспечении растений и 15 ЛКП при недостаточном водообеспечении.

Таблица 11. Ко-локализация локусов, ассоциированных с активностью ЛОГ, физиологическими признаками и компонентами урожая на хромосоме 2А пшеницы при разном водообеспечении

Положение на хромосоме 2А, сМ	Картированные признаки	
	Нормальное водообеспечение	Водный дефицит
149.5 – 151.3	ЛОГ; ВЗВ; ВЗР; М1000з.	ГР; Хл _б ; ДС; ВЗВ; ИУ% - ДлК; ИУ% - МЗК; ИУ%- ВЗВ; ИУ% - ЧЗВ; ИУ% ЧЗР; ИУ% - ВЗР.
108.5 – 109.2	МП; СА; СЭТ; ЭФКВ(II); Кар; Хл _а ; Хл _{а+б} ; ДнК; ДнЦ; ДС; ДлК; ДК; МЗК; ЧЗВ; М1000з; ЧЗР.	ЛОГ; ДГАР; СОД; Кар; ИУ% - СА; ИУ% - СТ; ИУ% - СЭТ; ИУ% - ЭФКВ(II); ИУ% - F ₀ ; ДнЦ; ДнВС; ДС; КKK; Оз; ЧЗР; ВЗР; М1000з; ИУ% - М1000з; ИУ% - КKK; ИУ% - МЗК; ИУ% - КЗК; ИУ% - ЧЗВ; ИУ% - ВЗР.
102.0	МП; СА; СЭТ; ЭФКВ(II); ДнК; ДлК; ЧЗВ; М1000; ЧЗР.	ИУ% - СА; ИУ% - СТ; ИУ% - УП; ИУ% - СЭТ; ЭФКВ(II); ДнЦ; ДнВС; ДС; КKK; МЗК; М1000з; ЧЗР; ИУ% - ЧЗР; ИУ% - ВЗВ; ИУ% - ВЗР.

ЛОГ, ДГАР; СОД, ГР – уровень активности липоксигеназы; дигидроаскорбатредуктазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, соответственно; СА – скорость ассимиляции CO₂ или нетто-фотосинтез; СТ – Скорость транспирации; УП – Устьичная проводимость; СЭТ – Скорость электронного транспорта; Кар – Содержание каротиноидов; Хл_а – Содержание хлорофилла а; Хл_{а+б} – Содержание общего хлорофилла; F₀ – Базовый выход флюоресценции хлорофилла; ЭФКВ(II) – Эффективный фотохимический квантовый выход ФС II; МП – Масса побега; ДнК – Число дней до кущения; ДнЦ – Число дней до цветения; ДнВС – Число дней до восковой спелости; ДС – Длина стебля; ДлК – Длина колосоножки; ДК – Длина колоса; КKK – Количество колосков главного колоса; КЗК – Число зёрен главного колоса; МЗК – Масса зерна главного колоса; Оз – Озернённость главного колоса; ЧЗВ – Число зёрен вторичных колосьев; ВЗВ – Вес зерна вторичных колосьев; ЧЗР – Число зёрен с растения; ВЗР – Вес зерна с растения; М1000з – Масса 1000 зёрен; ИУ% – индекс устойчивости.

Все три хромосомных региона были связаны с отдельными параметрами фенологии, фотосинтеза и компонентов урожая, как при оптимальных водных условиях, так и в стрессовых условиях недостатка влаги. Картированные в этих регионах ИУ% многих признаков, свидетельствует о том, что эти регионы несут генетические факторы, которые влияют на изменение уровня значений изученных физиологических и технологических параметров пшеницы под влиянием засухи.

Выявление генов-кандидатов для ЛКП, ассоциированных с активностью растворимой липоксигеназы в двух регионах хромосомы 2А. Для выявленных геномных регионов был проведен биоинформационный анализ референсного генома *T. aestivum*. Хромосомный регион 2А 149.5 – 151.3 сМ включал 263 гена. Большинство генов не изучено у пшеницы, они являются аннотированными гомологами генов *A. thaliana*. В результате поиска по 14 терминам генной онтологии (GO) было выявлено 35 белок-кодирующих генов, связанных с ответом на водный дефицит. Выполненный нами анализ функций этих генов определил, что они четко разделяются на три группы. Первую группу составляют гены 11 факторов регуляции транскрипции разного типа. Для семи из этих генов или белков, ими кодируемых, имеются сведения об участии в АБК-ЖАК-зависимых путях адаптации растений к засухе, поэтому они были выбраны нами в качестве кандидатов для ЛКП, ассоциированного с активностью растворимой ЛОГ:

- TraesCS2A01G495400, TraesCS2A01G534200 – ТФ, которые связываются с АБК-отзывчивым мотивом ABRE (ABA RESPONSIVE ELEMENT) в АБК-ответных генах и регулируют их экспрессию для сигнализации АБК-ЖАК в условиях водного стресса (de Ollas, Dodd, 2016);
- TraesCS2A01G534300 и TraesCS2A01G554200 – ABI5 и ABI3, центральные регуляторы в сигнализации АБК, участвуют во взаимодействии сигнализации АБК и ЖАК (Skubacz et al. 2016);
- TraesCS2A01G554200.1 – MYB1, MYB-подобный R2R3 фактор транскрипции активирует экспрессию гена биосинтеза АБК *NCED3/STO1* и генов двух ТФ – интеграторов ответных реакций на засуху *RD26* и *ANAC019*, участвуя в сигнальных путях, связанных с взаимодействием АБК-ЖАК в ответе на засуху (Wang et al., 2015);
- TraesCS2A01G538500.1 – ТФ HLH112, содержащий основной спираль-петля-спираль-домен регулирует экспрессию генов биосинтеза пролина и антиоксидантных ферментов пероксидаза и супероксиддисмутаза. ТФ HLH участвуют в сигнальных путях АБК-ЖАК в ответе на засуху (Liu, 2015).
- TraesCS2A01G547800 – фактор ответа ауксина 8 (ARF8) индуцирует экспрессию генов биосинтеза ЖАК (Wasternack, Hause, 2013).

Вторая группа генов связана с протеолизом (7 генов: ген субъединицы экзоцитарного комплекса EXO70, 4 гена цистеин протеаз RD21, 2 гена субстратных адаптеров к E3-лигазам MATH-BTB). E3-лигазы работают как позитивные или негативные факторы в Этилен-ЖАК-зависимых защитных механизмах против засухи (Weber, 2009), поэтому два гена MATH-BTB (TraesCS2A01G543300, TraesCS2A01G543600) были причислены нами к кандидатам для ЛКП, ассоциированного с активностью ЛОГ.

Третья группа генов региона 2A 149.5 – 151.3 сМ – это 15 генов, кодирующих ферменты липидного метаболизма, среди них семь генов выбраны нами в качестве кандидатов для регуляции активности ЛОГ в этом хромосомном регионе:

- TraesCS2A01G546900.1 – фитолкиназа 1 VTE5, фермент биосинтеза токоферола – известного ингибитора ЛОГ (Spicher et al., 2017);
- TraesCS2A01G543000, TraesCS2A01G543100, TraesCS2A01G543400 – 3 гена фосфолипазы A2 (ФЛА₂) опосредующей сигнальные каскады во время развития растений и стресса и дающей начало липоксигеназным путям метаболизма липидов (Verlotta et al., 2013);
- TraesCS2A01G534000 – липид-переносящий белок (LTP), относится к семейству nsLTP, члены которого участвуют в АБК-сигналинге (Yubero-Serrano et al., 2003), могут образовывать биоактивные комплексы с оксипипинами (Osman et al., 2001b) и быть задействованы в транспорте мономеров кутина для формирования кутикулы (Sterk et al., 1991);
- TraesCS2A01G537400 – сульфотрансфераза 2A, участвует в посттрансляционной модификации ЖАК, катализируя сульфонирование гидроксидов ЖАК (Wasternack, Hause, 2013);
- TraesCS2A01G557100 – ацил активирующий фермент 5 пероксисомальный (AMP-binding protein 5, AAE5), связан с β-окислением ЖК и биосинтезом ЖАК и индол-3-уксусной кислоты в пероксисоме (Cassin-Ross, Hu, 2014).

Кроме того в данном регионе локализован ген белка, содержащего домен NB-ARC и обогащенные лейцином повторы (TraesCS2A01G545300). Он тоже отнесен нами к кандидатам для активности ЛОГ, так как известно, что белки этого семейства участвуют в путях взаимодействия ЖАК с другими гормонами (Wasternack, Hause, 2013).

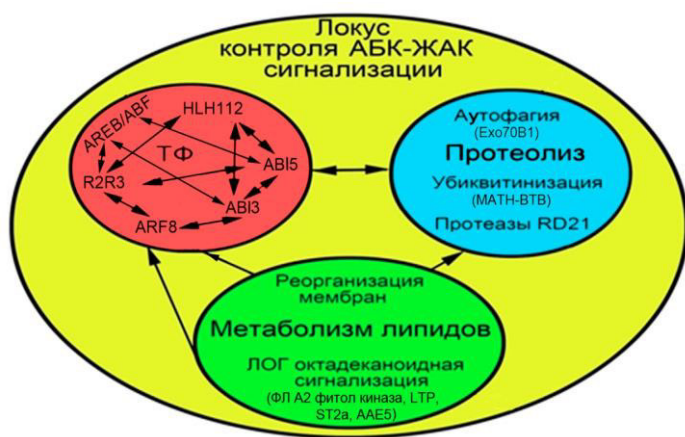


Рис. 15. Гипотетическая схема функционального взаимодействия генов региона 2AL 149.5 – 151.3 сМ, регулирующего АБК-ЖАК сигнальные пути при адаптации растений пшеницы к засухе. АБК – абсцизовая кислота, AAE5 – ацил-активирующий фермент 5, ЖАК – жасмоновая кислота, ЛОГ – липоксигеназа, LTP – липид-трансферный белок, ST2a – сульфотрансфераза2, ТФ – транскрипционные факторы, ФЛ A₂ – фосфолипаза A₂.

Таким образом, регион 2A 149.5 – 151.3 сМ включает:

- гены ТФ, известных своим участием и взаимодействием в АБК-зависимых сигнальных путях при засухе, тесно переплетенных с сигнализацией ЖАК;
- гены ферментов липидного метаболизма участвующие в реорганизации клеточных мембран и АБК-ЖАК сигнализации;
- гены, которые могут быть связаны с деградацией белков, кодируемых генами этого региона путем убиквитинирования и аутофагии. На этом основании мы предполагаем, что

35 связанных с адаптацией к водному дефициту генов этого хромосомного региона представляют функциональный модуль для регуляции АБК-ЖАК сигнальных путей (рис. 15). Среди них 17 генов могут быть связаны с оксипиноновым сигналингом и влиять на регуляцию активности ЛОГ.

В хромосомном регионе 2A 102 – 109.5 сМ и близлежащих областях, охватывающих интервал 99.3 – 115.1 сМ биоинформационным анализом было обнаружено 2272 гена. По 46 терминам GO было выявлено 130 аннотированных гомологов генов, связанных с ответом на засуху.

На сегодняшний день в качестве наиболее общих и консервативных реакций клеток растений на абиотические стрессы, в том числе на засуху выделяют десатурацию мембранных липидов, активацию акцепторов реактивных электрофилов, индукцию молекулярных шаперонов, накопление совместимых растворенных веществ и укрепление кутикулы (He et al., 2018; Bechtold, Field, 2018). Кроме того, отмечена незаменимая роль клеточной стенки в восприятии абиотического стресса и сложная взаимосвязь между восприятием ее целостности и тургора и сигнальными путями ответа на стресс (Novaković et al., 2018). Было показано, что в стрессовых условиях эти защитные механизмы контролируются сложной регуляторной сетью, включающей в себя различные сигнальные молекулы, гормоны и транскрипционные факторы (He et al., 2018; Bechtold, Field, 2018). Важную роль в защитных реакциях растений играют эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов (Pandey et al., 2016).

Анализ функций выявленных в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ генов показал, что они тесно взаимосвязаны и представляют собой функциональную сеть для транскрипционной перестройки регуляции метаболизма растений пшеницы при адаптации к водному дефициту. Многие гены-кандидаты для адаптации к засухе, выявленные нами в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ отмечены другими авторами в исследованиях последних лет как участники консервативной генной регуляторной сети при стрессе.

Среди генов – кандидатов для адаптации к засухе в этом хромосомном регионе 2 гена были связаны с биосинтезом ЛОГ и, по меньшей мере, 33 гена могут быть связаны с регуляцией активности растворимой ЛОГ листьев в разных условиях выращивания. Главными кандидатами для активности ЛОГ являются:

- TraesCS2A01G315100 и TraesCS2A01G342100 – впервые выявленные нами гены биосинтеза двух изоферментов липоксигеназы ЛОГ3 и ЛОГ семейства PLAT/LH2, представляющие два разных ее пути метаболизма липидов;
- TraesCS2A01G159600 ген фосфолипазы А – фермента, продукты которого дают начало липоксигеназным путям метаболизма липидов (Wasternack, Hause, 2013);
- TraesCS2A01G367200, TraesCS2A01G367700, TraesCS2A01G368000 – три гена калеозин-связанной пероксигеназы 2 – фермента пероксигеназного пути ЛОГ (Hanano et al., 2006; 2017);
- TraesCS2A01G375800 – ген сульфотрансферазы 2A, специфически сульфонирующей продукты жасмонатного пути ЛОГ гидропероксида ЖАК (Gidda et al., 2016).

По меньшей мере, еще для 26 генов, локализованных в данном регионе или белков, кодируемых ими, имеются литературные сведения о связи с оксипиноновым сигналингом,

что позволяет отнести их к кандидатным генам для регуляции активности фермента. Среди них гены метаболических путей полифосфатов инозита (TraesCS2A01G130800, TraesCS2A01G184400); факторов ответа этилена ERF1 (TraesCS2A01G393500, TraesCS2A01G417300); ТФ TCP (TraesCS2A01G376000); ТФ комплекса WD-повтор / bHLH / MYB (TraesCS2A01G409400, TraesCS2A01G409600, TraesCS2A01G412800, TraesCS2A01G164600, TraesCS2A01G415400); субъединиц хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF (TraesCS2A01G140400, TraesCS2A01G182200); диацетилазы 9 (TraesCS2A01G293200); зеаксантин эпоксидазы (TraesCS2A01G317000); альдо-кето редуктазы (TraesCS2A01G370900, TraesCS2A01G371400); MAP киназа киназы киназы (TraesCS2A01G407600), а также 9 генов белков, содержащих повторы LRR (TraesCS2A01G179700, TraesCS2A01G184600, TraesCS2A01G361000, TraesCS2A01G361700, TraesCS2A01G384000, TraesCS2A01G384100, TraesCS2A01G416600, TraesCS2A01G421000, TraesCS2A01G357100) и ТФ, связанных с регуляцией цветения AGAMOUS-like 16 (TraesCS2A01G337900) и NFYA5 (TRIAE_CS42_2AL_TGACv1_093509_AA0281460).

Среди генов-кандидатов для регуляции активности ЛОГ особое внимание следует уделить двум генам метаболических путей полифосфатов инозита. Высоко фосфорилированные, растворимые инозиты представляют собой группу вторичных мессенджеров с фундаментальным значением во многих клеточных процессах. Известна важная функция инозитол-пирофосфатов и в регулировании зависимых от жасмоната ответов. Было показано, что F-box-белки, участвующие в восприятии ЖАК (COI1) и ауксина (TIR1), включают инозитол полифосфаты в качестве корецепторов (Laha et al., 2016), и считается, что восприимчивость многих гормонов регулируется молекулами, образованными инозитолом (Sheard et al., 2010).

Одним из важнейших кандидатов для регуляции активности ЛОГ являются два гена ТФ ERF1, с которыми может быть связана параллельная ветви MYC2 ветвь сигнального пути ЖАК и взаимодействие с сигналингом этилена (Pieterse et al., 2012).

В регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ нами было выявлено пять генов, которые могут входить в комплекс WD- повтор / bHLH / MYB, участвующий в жасмонатной регуляции формирования трихом и образования антоцианов (Qi et al., 2011). Накопление флавоноидных пигментов является важным фактором для адаптации к стрессу и, вероятно, данный регион связан с регуляцией их биосинтеза, что подтверждается также присутствием в этом регионе трех генов биосинтеза антоцианов UDP-Glc: флавоноид-3-глюкозилтрансферазы и фенилаланин-аммоний-лиазы (ФАЛ).

ФАЛ также участвует в первом этапе биосинтеза лигнина и ремодулировании клеточной стенки в условиях стресса, а ЖАК и продукт гидропероксидазного пути ЛОГ транс-2-гексенал инициируют экспрессию генов ФАЛ (Moore et al., 2003; Koshio et al., 1995). Одним хорошо документированным ответом растений во время абиотического и биотического стресса является эктопическое отложение лигнина. Совместная активность ФАЛ и апопластических пероксидаз (гены семи пероксидаз также локализованы в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ) важна как для образования, так и для сшивания фенольных соединений, в клеточной стенке. Сигнальные пути ЖАК и брассиностероидов (в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ выявлено несколько генов метаболизма БР), пересекаемые с путями

сенсоров целостности клеточной стенки и путями, связанными с АФК непосредственно участвуют в ремоделировании клеточных стенок, вызванных абиотическим стрессом (Novaković et al., 2018).

В качестве основного интерфейса между растением и окружающей средой служит кутикула, которая играет решающую роль в ограничении потоков жидкости и газа, защите от патогенных и насекомых и сопротивлении различным абиотическим стрессам. Было показано, что сверхэкспрессия 3-кетоацил-КоА-синтазы CER6 и ацил-КоА-редуктазы (FAR), связанных с образованием кутикулярных восков, является неспецифической реакцией при стрессе, а метилжасмонат является одним из регуляторов экспрессии этих белков (He et al., 2018). Гены обоих белков присутствуют в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ. Известно также, что гидрокси- и эпокси-производные ЖК пероксигеназного пути ЛОГ участвуют в синтезе мономерных субстратов гетерополимера кутина (Тарчевский, 2001). Вероятно, оба липоксигеназных метаболических пути, жасмонатный и пероксигеназный, принимают участие в формировании кутикулы растений.

Известно, что интенсивное взаимодействие между сигнальными путями, индуцированными разными фитогормонами, стало важным механизмом регулирования в динамических экологических условиях, благодаря которому растение может адаптировать свой ответ к типу испытываемого стресса или их сочетанию для достижения баланса между ростом и защитой (Huot et al., 2014; Li et al., 2017). Функциональная взаимосвязь генов, локализованных в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ, выявленная нами в результате анализа известных литературных сведений, свидетельствует о взаимодействии гормонов ЖАК, АБК, ауксин, этилен, салициловая кислота, гиббереллин и брассиностероид.

Восприятие и сигналинг гормонов регулируются системой убиквитин-протеасомной деградации белков. Два гена MATH-VTV, связанные с убиквинированием, локализованные в исследуемом хромосомном регионе могут быть вовлечены в регуляцию перцепции и сигнализации ЖАК.

Скоординированные эпигенетические регуляторные события, такие как модификации гистонов и ремоделирование хроматина, являются неотъемлемой частью сигнализации ЖАК. У арабидопсиса хроматиновые модификации, выполненные гистондеацетилазами HDA6 и HDA19 лежат в основе подавления экспрессии ЖАК-отзывчивых генов (Wasternack, Hause, 2013). Вероятно гены субъединицы хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF и деацетилазы 9, локализованные в регионе 2AL 99.3 – 115.1 сМ, осуществляют тонкую связь между восприятием ЖАК-Иле и перепрограммированием транскрипции в пшеничном геноме.

Недавно было выяснено, что точкой взаимодействия нескольких гормональных сигнальных путей на транскрипционном уровне является многосубъединичный комплекс Медиатор. Известные в литературе функции MED25 – одной из его субъединиц позволяют предположить, что она связана с транскрипционной регуляцией большинства генов-кандидатов для адаптации к засухе, локализованных в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ. Известно также, что MED25 напрямую связывает рецептор ЖАК с транскрипционно активным хроматином во время активации ТФ MYC2, инициированной АБК и ЖАК. Однако ген MED25 не был выявлен в данном хромосомном регионе по использованным

нами терминам генных онтологий. Возможно, для его выявления необходим более широкий набор терминов GO, или он относится к числу не идентифицированных генов, или находится за рамками изученного нами региона генома *T. aestivum* L.

Таким образом, результаты анализа многочисленных функциональных взаимосвязей генов, локализованных в регионе 2A 99.3 – 115.1 сМ, свидетельствуют о том, этот регион содержит генную сеть для перестройки метаболизма растений при адаптации к стрессу, в которую тесно вплетена генная сеть для регуляции оксипириновой сигнализации.

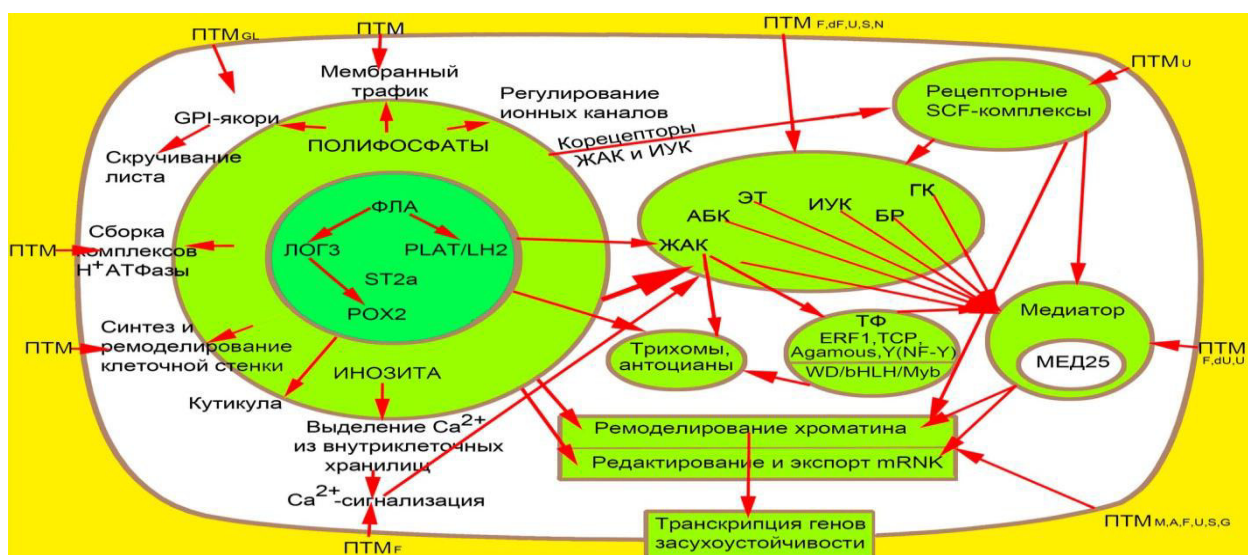


Рис. 16. Гипотетическая схема функционального взаимодействия генов региона 2AL 99.3 – 115.1 сМ для перестройки метаболизма при адаптации растений пшеницы к засухе

АБК – абсцизовая кислота; БР – брассиностероиды; ГК – гибберелловая кислота; GPI – гликозилфосфатидилинозитол; ЖАК – жасмоновая кислота; ЛОГ3 – липоксигеназа 3, ИУК – индолилуксусная кислота; SCF – комплекс: белок, связанный с S-фаза-киназой1, куллин и F-box-белок; PLAT/LH2 – липаза/ЛОГ с доменом PLAT (Полицистин-1, Липоксигеназа, Альфа-токсин и Триацилглицерол липаза), POX – калеозин-связанная пероксигеназа 2, ST2a – сульфотрансфераза2, ФЛА – фосфолипаза А; ЭТ – этилен.

PTM – посттрансляционные модификации белков: А – ацетилирование, G – гликолизирование, GL – гликолипирование, F – фосфорилирование, dF – дефосфорилирование, M – метилирование, N – S-нитролизирование, S – сумоилирование, U – убиквитинирование, dU – деубиквитинирование.

На рис. 16 представлена основанная на наших данных и литературных источниках схема, показывающая как внеклеточные стимулы, связанные с водным дефицитом, могут активировать транскрипционное перепрограммирование, а также определены место и роль в этом процессе инициированного липоксигеназой оксипиринового сигналинга:

В качестве решающего сигнала при определенных физиологических условиях клетка может использовать изменение количества или отношения полифосфатов инозита (Alcazar-Roman, Wentе, 2008). Полифосфаты инозита влияют на многие клеточные процессы, в том числе способствуют выделению Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ и Ca^{2+} -сигналингу, который является ключевым в ответах на экологические стимулы и частью сигнальных путей разных фитогормонов (Pauwels et al., 2009). Для адаптации своего ответа к типу испытываемого стресса и достижения баланса между ростом и защитой используется механизм «Cross talk» – перекрестного взаимодействия сигналинга гормонов ЖАК, АБК, ауксин, этилен, салициловая кислота и брассиностероид. (Verma et al., 2017). Конечной точкой взаимодействия нескольких гормональных сигнальных путей

на уровне транскрипции является многосубъединичный комплекс Медиатор, который изменяет архитектуру хроматина и связывает ТФ с РНК Pol II во время транскрипции, являясь важным регулятором экспрессии генов (Allen, Taatjes, 2015). Быстрая и тонкая перестройка метаболизма растений в условиях стресса происходит за счет многочисленных посттрансляционных модификаций белков, в том числе гистонов, ТФ и других регуляторов транскрипции (Hashiguchi, Komatsu, 2016).

Необходимо отметить, что изученные хромосомные регионы содержат значительное число генов – кандидатов для активности ЛОГ; их взаимосвязь, выявленная нами, свидетельствует о сети регуляции оксипинового сигналинга. Такие ее компоненты, как гены ФЛА₂, сульфотрансферазы 2А, МУВ-ТФ R2R3 и белков, содержащих обогащенные лейцином повторы, присутствуют в обоих хромосомных регионах, где были обнаружены ЛКП, ассоциированные с активностью ЛОГ.

Все это свидетельствует о том, что гены, связанные с биосинтезом и регуляцией активности ЛОГ, занимают ключевые места в генной сети гормональной регуляции адаптации пшеницы к засухе. Это определяет важную роль этого фермента, главным образом его жасмонатного и пероксигеназного путей метаболизма липидов в адаптации *T. aestivum* L. к засухе и значительном влиянии на экспрессию отвечающих за устойчивость к засухе генов. Можно полагать, что активность ЛОГ, инициирующая сигнальные пути, связанные с липидным катаболизмом, является важнейшим фактором в функционировании механизма для перестройки метаболизма растений при адаптации к водному дефициту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липоксигеназа, катализирующая окисление полиненасыщенных жирных кислот с образованием гидроперекисей жирных кислот и реагирующая как со свободными жирными кислотами, так и их этерифицированными производными, является одним из ключевых ферментов липидного метаболизма (Grechkin, 1998). Известно, что у растений присутствуют растворимая, цитозольная, вакуолярная и мембранные формы фермента, однако об изоферментах ЛОГ у пшеницы – одной из основных сельскохозяйственных культур мира, было очень мало сведений. В данной работе впервые у *T. aestivum* в разных условиях водоснабжения были изучены изоферментный состав и активность ЛОГ в нескольких белковых фракциях, обогащенных растворимой ЛОГ семян, растворимой и микросомальной ЛОГ проростков и листьев, а также растворимой и мембранной хлоропластными ЛОГ. Мы обнаружили не менее 14 молекулярных форм фермента и показали, что изоферментный состав ЛОГ различается среди генотипов пшеницы при оптимальных и стрессовых условиях выращивания.

Основное применение гексаплоидной пшеницы связано с хлебом, а ЛОГ уже долгое время применяется в качестве его улучшителя (Dunnewind et al., 2002). Однако не было ясного представления о механизме, посредством которого она действует, а роль фермента в определении хлебопекарного качества пшеницы оставалась недостаточно изученной и противоречивой. В нашей работе была объяснена противоречивость влияния ЛОГ семян на качество клейковины гексаплоидной пшеницы. Мы показали, что характер взаимосвязи активности ЛОГ с хлебопекарными признаками (положительный или отрицательный)

зависел от уровня ферментативной активности. Наши данные дают основание полагать, что ЛОГ семян необходима для формирования клейковины, определяющей хлебопекарные свойства пшеницы, однако высокий уровень ферментативной активности отрицательно влияет на качество клейковины.

По результатам исследования нами была выдвинута гипотеза о совместном действии ЛОГ и липид-переносящих белков пуроиндолинов при мобилизации липидов поверхности крахмальных гранул эндосперма, влияющем на формирование мягкой текстуры эндосперма, прорастание семян и адаптацию к стрессу. Ее дальнейшее подтверждение представляется весьма актуальным для улучшения хлебопекарного качества пшеницы и ее устойчивости к неблагоприятным факторам.

Мобилизация запасных и мембранных липидов и оксипиновая сигнализация, инициированные липоксигеназой в большой степени определяют выживание растений в условиях действия различных стрессоров (Mosblech et al., 2009). В нашей работе впервые было изучено влияние водного дефицита на активность разных форм ЛОГ и ее взаимосвязь с биомассой побега, транспирацией, устьичной проводимостью, эффективностью фотосинтеза, зерновой продуктивностью, и было выявлено дифференцированное участие липоксигеназ *T. aestivum* в адаптации к засухе.

В процессе длительной селекции, ориентированной на высокую продуктивность и качество клейковины, произошло сильное, по сравнению с дикорастущими сорочидками, обеднение генофонда культурных растений по генам, контролирующим признаки устойчивости к вредителям и возбудителям болезней и разным абиотическим факторам. В нашей работе было выявлено, что интрогрессия сегментов генома *Ae. tauschii* и *T. timopheevii* в геном *T. aestivum* L. изменяла изоферментный состав ЛОГ, уровень ее активности и других физиологических параметров, а также стратегию адаптации пшеницы к водному дефициту за счет снижения транспирации и увеличения эффективности использования воды. Это показывает перспективность интрогрессии генов ЛОГ диких злаков для улучшения адаптации пшеницы к засухе.

Область генетической регуляции активности ЛОГ у пшеницы ранее была крайне мало исследована, и это касалось только ЛОГ семян. С использованием нескольких пшеничных популяций нами было показано, что генетический контроль активности ЛОГ связан с регуляторными генами на хромосомах разных гомеологических групп, которые модулируют функциональную активность ЛОГ в разных условиях среды. Было показано, что генетическая регуляция ферментативной активности при стрессе более сложная, чем при оптимальных условиях. В нашей работе впервые было проведено генетическое картирование в геноме *T. aestivum* L. локусов количественных признаков, ассоциированных с активностью нескольких форм липоксигеназы при разном водном режиме. Нами была показана как независимая, так и совместная генетическая регуляция активности отдельных форм фермента.

Корреляционная взаимосвязь между активностью нескольких форм ЛОГ и интенсивностью фотосинтеза и газообмена и зерновой продуктивностью в разных условиях выращивания была подтверждена ко-локализацией ЛКП этих признаков в геноме гексаплоидной пшеницы. На основании совокупности полученных данных впервые была выявлена физиологическая роль для нескольких форм липоксигеназы

проростков и листьев. Нами было показано, что активность отдельных форм этого фермента у *T. aestivum* связана с выполнением важнейших физиологических функций, таких как мобилизация липидов при прорастании семян и защитная сигнализация при адаптации растений пшеницы к абиотическому стрессу.

Не изученность генетического контроля липоксигеназы у *T. aestivum* L. была связана с ее сложным полиплоидным геномом и отсутствием данных его секвенирования. В 2018 году Международный консорциум завершил работу по секвенированию генома *T. aestivum*. Воспользовавшись этим ресурсом, мы провели биоинформационный анализ референсного генома *T. aestivum* и идентифицировали гены, составляющие основу ЛКП, обнаруженных нами в трех регионах хромосомы 2AL. Большинство этих генов еще не изучены у пшеницы и являются аннотированными гомологами генов *A. thaliana*. По результатам анализа литературных данных о функциях этих генов или белков, ими кодируемых, мы выявили генную сеть гормональной регуляции АБК-ЖАК-зависимых путей для перестройки метаболизма при адаптации растений пшеницы к водному дефициту. Были обнаружены аннотированные гомологи двух неизвестных ранее для пшеницы генов биосинтеза ЛОГ, и 50-ти *a priori* кандидатных генов для регуляции ферментативной активности, которые занимают важное место в выявленной нами генной сети. В нашей работе впервые показано вовлечение двух путей липидного метаболизма, инициированных ЛОГ, жасмонатного и пероксигеназного, в адаптацию растений пшеницы к засухе.

Результаты генетического картирования локусов, ассоциированных с активностью ЛОГ, их ко-локализации со всеми изученными физиологическими признаками в нескольких хромосомных регионах и выявление кандидатных генов для регуляции активности ЛОГ привело к пониманию молекулярно-генетического механизма, применяемого *T. aestivum* L. для адаптации к водному дефициту. Было показано, что регуляция перестройки метаболизма липидов и оксипиновый сигналинг являются важнейшей частью этого механизма. Наши результаты открывают перспективу для дальнейшего исследования выявленных геномных областей, в том числе методом РНК-секвенирования, с целью их использования в селекции на устойчивость к засухе.

Примененная в нашей работе стратегия выявления физиологических механизмов адаптации к засухе пшеницы путем определения кандидатных генов в хромосомных регионах, где расположены кластеры ЛКП параметров, связанных с засухоустойчивостью, оправдала себя и может быть применима для познания физиологических механизмов сложных полигенных признаков.

В данной работе были представлены результаты комплексного изучения активности липоксигеназы у гексаплоидной пшеницы. На рис. 17 показаны выявленные нами функции ЛОГ в разных органах растений гексаплоидной пшеницы. В целом полученные результаты позволяют высоко оценить роль липоксигеназы, ее многофункциональность и участие в широком спектре физиологических процессов у *T. aestivum* L.



Рис. 17. Выявленные функции липоксигеназ разных органов пшеницы.

ВЫВОДЫ

1. Изоферментный состав и уровень активности растворимых и мембраносвязанных липоксигеназ в проростках и листьях *T. aestivum* L. различается в зависимости от генотипа и условий выращивания. Изоферментный состав растворимых липоксигеназ семян одинаков у всех исследованных генотипов.

2. Предполагается, что ЛОГ участвует в формировании мягкой текстуры эндосперма пшеничного зерна посредством утилизации поверхностно-крахмальных липидов и синергичного действия с пуриноидолинами. Характер влияния ЛОГ на хлебопекарное качество пшеницы (положительный или отрицательный) определяется уровнем ее активности и связан с уменьшением растяжимости клейковины.

3. Интрогрессия сегментов генома *T. timopheevii* и *Ae. tauschii* в геном *T. aestivum* привносит гены изоферментов ЛОГ диких злаков; при этом меняется стратегия адаптации пшеницы к засухе путем снижения транспирации, устьичной проводимости и увеличения эффективности использования воды.

4. На хромосомах 2-ой, 4-ой, 5-ой и 7-ой гомеологических групп гексаплоидной пшеницы картированы 18 ЛКП, ассоциированных с активностью растворимой ЛОГ семян, растворимой и мембранной форм ЛОГ проростков и листьев и двух хлоропластных форм фермента. 67 % локусов были выявлены в условиях водного дефицита. На хромосоме 2D обнаружены два ЛКП, связанные с изменением под влиянием засухи уровня активности растворимой ЛОГ листьев и хлоропластной мембранной ЛОГ.

5. Кластеры ЛКП для параметров газообмена, флуоресценции хлорофилла, биомассы побега, биометрических показателей или зерновой продуктивности, выявленные на хромосомах 2D, 4D, 5D, 7D мягкой пшеницы в условиях водного дефицита ко-локализованы с ЛКП, ассоциированными с вариабельностью активности разных форм ЛОГ.

6. Два кластера ЛКП для параметров газообмена, флуоресценции хлорофилла, биомассы побега, фенологических характеристик и компонентов урожая, выявленные на хромосоме 2A гексаплоидной пшеницы ко-локализованы с ЛКП для активности растворимой ЛОГ листьев. Показано, что регион 2AL 149.5 – 151.3 сМ регулирует взаимодействие сигнальных путей АБК-ЖАК, а регион 2AL 99.3 – 115.1 сМ связан с транскрипционной перестройкой регуляции метаболизма при стрессе.

7. В регионах 2AL 149.5 – 151.3 сМ и 2AL 99.3 – 115.1 сМ генома *T. aestivum* L. отобраны 52 кандидатных гена для регуляции активности ЛОГ. Они связаны с жасмонатным и пероксигеназным направлениями липоксигеназного пути метаболизма липидов, и занимают ключевые места в генной сети гормональной регуляции адаптации пшеницы к засухе.

8. Установлены физиологические функции для нескольких форм липоксигеназы пшеницы. Растворимая ЛОГ семян участвует в формировании клейковины и мягкой текстуры эндосперма. Растворимая и микросомальная формы ЛОГ проростков участвуют в катаболизме липидов поверхности крахмальных гранул эндосперма. Растворимая и микросомальная формы ЛОГ листьев играют положительные роли при адаптации пшеницы к засухе. Хлоропластные ЛОГ не влияют на устойчивость пшеницы к засухе; растворимая форма фермента причастна к нефотохимическому тушению хлорофилла, а мембранная форма связана с пигментами фотосинтеза.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в печатных изданиях, рекомендованным Перечнем ВАК РФ

1. Труфанов В.А. Агрегирующая способность запасных белков злаков с различным качеством клейковины / В.А.Труфанов, **М.Д. Пермякова**, Е.В. Березовская // Прикл. биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39, № 4. – С. 473–777.
2. Труфанов В.А. Действие межсортового замещения хромосом пшеницы *Triticum aestivum* L. на активность липоксигеназы и ее связь с технологическими свойствами муки / В.А. Труфанов, **М.Д. Пермякова**, Т.А. Пшеничникова, М.Ф. Ермакова, В.А. Давыдов, А.В. Пермяков, Е.В. Березовская // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т.43, № 1. – С.102–108.
3. Пшеничникова Т.А. Картирование локусов количественных признаков (QTL), ассоциированных с активностью дисульфидредуктазы и липоксигеназы в зерне мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. / Т.А. Пшеничникова, С.В. Осипова, **М.Д. Пермякова**, Т.Н. Митрофанова, У. Лохвассер, М. Рёдер, А. Бёрнер // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 654–662.
4. **Пермякова М.Д.** Роль липоксигеназы в определении качества зерна пшеницы / М.Д. Пермякова, В.А. Труфанов, Т.А. Пшеничникова, М.Ф. Ермакова // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 96–102.
5. **Пермякова М.Д.** Влияние липоксигеназы семян сои на хлебопекарные свойства пшеничной муки / М.Д. Пермякова, В.А.Труфанов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 1–6.
6. Osipova S.V. Tolerance of prolonged drought among a set of bread wheat chromosome substitution lines / S.V. Osipova, A.V. Permyakov, **M.D. Permyakova**, V.A. Davydov, T.A. Pshenichnikova, A. Börner // Cereal Res Com. – 2011. – V. 39 (3). – P. 343–351.

7. Osipova S., Leaf dehydroascorbate reductase and catalase activity is associated with soil drought tolerance in bread wheat / S. Osipova, A. Permyakov, **M. Permyakova**, T. Pshenichnikova, A. Börner // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2011. – V. 3. – P. 1–9.
8. Осипова С.В. Активность липоксигеназы и глутатион-зависимой протеиндисульфид оксидоредуктазы в зерновках межсортных замещенных линий пшеницы *T. aestivum* L. с различным качеством клейковины / С.В. Осипова, **М.Д. Пермякова**, Т.А. Пшеничникова, М.Ф. Ермакова // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2011. – Т.43, № 5. – С. 446–452.
9. **Пермякова М.Д.** Липоксигеназы листьев пшеницы, выращенной в условиях разного водообеспечения / М.Д. Пермякова, Пермяков А.В., Осипова С.В., Пшеничникова Т.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 1–6.
10. Osipova S.V. The role of non-prolamine proteins and LMW redox agents in protein folding and polymerization in wheat grains and the influence in baking quality parameters / S.V. Osipova, **M.D. Permyakova**, A.V. Permyakov // *J Agric Food Chem*. – 2012. – V. 60 (49). – P. 12065–12073.
11. Osipova S.V. The antioxidant enzymes activity in leaves of inter – varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit / S.V. Osipova, A.V. Permyakov, **M.D. Permyakova**, T.A. Pshenichnikova, M.A. Genaev, A. Börner // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2013. – V. 5 (8). – P. 2455–2465.
12. Осипова С.В. Хромосомная инженерия и селекция с применением ДНК маркеров – перспективные биотехнологические подходы к улучшению пшеницы / С.В. Осипова, Т.А. Пшеничникова, **М.Д. Пермякова**, А.В. Пермяков, А. Бернер, В.В. Верхотуров // *Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2014, № 3. – С. 39–52.
13. Пшеничникова Т.А. Влияние ограниченных интрогрессий от *Triticum timopheevii* Tausch. в геном мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на физиологические и биохимические признаки в различных условиях водообеспечения / Т.А. Пшеничникова, А.В. Пермяков, С.В. Осипова, **М.Д. Пермякова**, Е.Г. Рудиковская, В.В. Верхотуров // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – № 19 (5). – С. 74–82.
14. Osipova S. 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 / S. Osipova, A. Permyakov, **M. Permyakova**, T. Pshenichnikova, V. Verkhouturov, A. Rudikovskiy, E. Rudikovskaya, A. Shishparenok, A. Doroshkov, A. Börner // *J Appl Gen*. – 2016. – V. 57 (2). – P. 151–163.
15. Pshenichnikova T.A. Effects of limited introgressions from *Triticum timopheevii* Tausch. into the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on physiological and biochemical traits under normal watering and drought / T.A. Pshenichnikova, A.V. Permyakov, S.V. Osipova, **M.D. Permyakova**, E.G. Rudikovskaya, V.V. Verkhouturov // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2016. – V. 6 (5). – P. 553–559.
16. **Пермякова М.Д.** Хромосомные области, ассоциированные с активностью липоксигеназы в геноме D *Triticum aestivum* L. при водном дефиците / М.Д. Пермякова, А.В. Пермяков, С.В. Осипова, Т.А. Пшеничникова, А.А. Шишпарёнок, Е.Г. Рудиковская, А.В. Рудиковский, В.В. Верхотуров, А. Бёрнер // *Физиология растений*. – 2017. – Т. 64, № 1. – С. 33–46.
17. Хлесткина Е.К. Реализация генетического потенциала сортов мягкой пшеницы под влиянием условий внешней среды: современные возможности улучшения качеств зерна и хлебопекарной продукции (обзор) / Е.К. Хлесткина, Е.В. Журавлева, Т.А. Пшеничникова, Н.И. Усенко, Е.В. Морозова, С.В. Осипова, **М.Д. Пермякова**, Д.А. Афонников, Ю.С. Отмахова // *Сельскохозяйственная биология* – 2017. – Т.52, Вып. 3. – С. 501–514.
18. **Пермякова М.Д.** Связь между активностью липоксигеназы и текстурой эндосперма гексаплоидной пшеницы / М.Д. Пермякова, С.В. Осипова, А.В. Пермяков // *Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2018. – Т. 8, №3. – С. 70–78.
19. Osipova S. Tolerance of the photosynthetic apparatus in recombinant lines of wheat, adapting to water stress of varying intensity / S. Osipova, A. Permyakov, **M. Permyakova**, E. Rudikovskaya, V. Verkhouturov, A. Rudikovskiy // *Photosynthetica*. – 2019. – V. 57 (1). – P. 160–169.
20. Pshenichnikova T.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 / T.A. Pshenichnikova, A.V. Doroshkov, S.V. Osipova, A.V. Permyakov, **M.D. Permyakova**, V.M. Efimov, D.A. Afonnikov // *Planta*. – 2019. – V. 249 (3). – P. 839–847.

Статьи в сборниках научных трудов

21. **Permyakova M.D.** The relationship between lipoxygenase activity and technological characteristics of gluten in hexaploid wheat / **M.D. Permyakova**, V.A. Trufanov, A.V. Permyakov, T.A. Pchenichnikova, M.F. Ermakova, A.K. Chistyakova, L.V. Shchukina // *Ann Wheat Newslett.* – 2004. – V. 50. – P.147–149.
22. **Permyakova M.D.** Specific lipoxygenase activity in intervarietal substitution lines of hexaploid wheat / M.D. Permyakova, V.A. Trufanov, A.V. Permyakov, T.A. Pchenichnikova // *Ann Wheat Newslett.* – 2005. – V. 51. – P. 127–128.
23. **Permyakova M.D.** Specific lipoxygenase activity in *Triticum aestivum subsp. aestivum* / *Aegilops Speltoides* introgression lines / M.D. Permyakova, V.A. Trufanov, A.V. Permyakov, T.A. Pchenichnikova // *Ann Wheat Newslett.* – 2005. – V. 51. – P. 147–148.
24. **Permyakova M.D.** Lipoxygenase activity in the intervarietal substitution lines on chromosomes of 4 and 5 homoeological groups in EWAC key substitution sets / M.D. Permyakova, V.A. Trufanov, A.V. Permyakov, T.A. Pshenichnikova // *EWAC Newslett. Proc. 13th Intern. EWAC Conf. 27 June - 1 July 2005, Prague, Czech Republic*; eds. A. Börner, K. Pankova, J.W. Snape. – 2006. – P. 111–113.
25. **Permyakova M.D.** Relationship between specific lipoxygenase activity and technological characteristics of gluten in the recombinant inbred lines of ITMI mapping population / M.D. Permyakova, V.A. Trufanov, A.V. Permyakov, T.A. Pshenichnikova, M.F. Ermakova, A.K. Chistyakova, L.V. Shchukina, A. Börner // *EWAC Newslett. Proc. 13th Intern. EWAC Conf., 27 June - 1 July 2005, Prague, Czech Republic*; eds. A. Börner, K. Pankova, J.W. Snape. – 2006. – P. 113–117.
26. **Пермякова М.Д.** Сравнительное картирование генов липоксигеназы и других генов защитного ответа у пшеницы и ячменя / М.Д. Пермякова, В.А. Труфанов, Т.А. Пшеничникова, А. Бернер // Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды: Материалы Всеросс. научн. конф. 16–19 сент. 2007 г., Иркутск. С. 191–195.
27. **Permyakova M.D.**, Trufanov V.A., Pshenichnikova T.A., Börner A. Comparative mapping of lipoxygenase loci in wheat and barley // *EWAC Newsletter. Proc. 14th Intern. EWAC Conf., 6 – 10 May 2007, Istanbul, Turkey*; eds. A. Börner, J.W. Snape. – 2008. – P. 142 – 145.
28. **Пермякова М.Д.** Роль липоксигеназы в определении качества клейковины пшеницы / М.Д. Пермякова, Т.А. Пшеничникова, М.Ф. Ермакова // Материалы IV съезда российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11–15 мая 2008 г., Новосибирск. С. 503.
29. **Permyakova M.D.** Genetic control of biosynthesis of soluble isoforms of lipoxygenase in bread wheat grain / M.D. Permyakova, T.A. Pshenichnikova, A. Börner // *Proc. 11th Intern Wheat Genetics Symp. 24-29 August 2008, Brisbane*; eds. R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. Mackay, L. McIntyre, P. Sharp, Sydney, Sydney University Press, 2008. P038.
30. **Пермякова М.Д.** Генетический контроль биосинтеза растворимых липоксигеназ в семенах пшеницы / М.Д. Пермякова, Т.А. Пшеничникова, А.Бернер // Липиды и оксипирины растений. Материалы междунар. симп., 25–27 сентября 2008 г, Казань. С. 40.
31. **Пермякова М.Д.** Липоксигеназы листьев пшеницы и их участие в адаптации к почвенной засухе / М.Д. Пермякова, А.В. Пермяков, С.В. Осипова, В.А. Давыдов, Т.А. Пшеничникова // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: Материалы Всеросс. научн. конф., 24–28 авг. 2009 г. Иркутск, С. 363–366.
32. **Permyakova M.D.** Lipoxygenase isozymes activity in bread wheat: inheritance and relationship to drought tolerance / M.D. Permyakova, E.Z. Voronina, A.V. Permyakov, S.V. Osipova, T.A. Pshenichnikova // *EWAC Newslett. Proc. 15th Intern. EWAC Conf, 7-11 Nov. 2011, Novi Sad, Serbia*; eds. A. Börner, B. Kobiljski. – 2012. – P. 174–177.
33. **Permyakova M.D.** Chromosomal regions in genome D of *Triticum aestivum* L. associated with the activity of different lipoxygenase forms under drought / M.D. Permyakova, A.V. Permyakov, S.V. Osipova, A.A. Shishparenok, E.G. Rudikovskaya, V.V. Verkhuturov, T.A. Pshenichnikova, A. Börner, U. Lohwasser / *Eur. Cereals Genet. Coop. Newslett. Proc. 16th Intern. EWAC Conf., 24 – 29 May 2015, Lublin, Poland*; eds. A. Börner, Kowalczyk. – 2016. – P. 140–144.
34. Afonnikov D.A. Wheat leaf pubescence phenotyping and analysis / D.A. Afonnikov, M.A. Genaev, A.V. Doroshkov, E.G. Komyshev, A.V. Simonov, A.V. Permyakov, S.V. Osipova, **M.D. Permyakova**, T.A.

Pshenichnikova // Plant Genetics and Genomics for Food Security: Abstract Book of the 1st Intern. Workshop, 26–28 Aug 2016, Novosibirsk, Russia. – P. 3.

35. Pshenichnikova T.A. The use of cytogenetic collections of bread wheat and their molecular-marked derivatives for the search of a new genetic variability for drought tolerance and grain quality / T.A. Pshenichnikova, S.V. Osipova, **M.D. Permyakova**, A.V. Permyakov, L.V. Shchukina, A.K. Chistyakova, A.V. Simonov, E.V. Morozova, A. Börner // Plant Genetics and Genomics for Food Security: Abstract Book of the 1st Intern. Worksho, 26–28 Aug 2016, Novosibirsk, Russia. – P. 43.

36. **Пермякова М.Д.** Генетическая регуляция активности разных форм липоксигеназы пшеницы при водном дефиците / М.Д. Пермякова, А.В. Пермяков, С.В. Осипова, Т.А. Пшеничникова, А.А. Шишпаренок, Е.В. Рудиковская, А.В. Рудиковский, В.В. Верхотуров, А. Бернер // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всеросс. научн. конф. с междунар. участием и школы молодых ученых, 12–15 сент 2016 г., Иркутск. – С. 248–249.

37. Осипова С.В. Кластеры генов, регулирующие ответные реакции на водный стресс в ядерном геноме *Triticum aestivum* L./ С.В. Осипова, Т.А. Пшеничникова, А.В. Пермяков, **М.Д. Пермякова**, Е.Г. Рудиковская, А.А. Дорошков, В.В. Верхотуров, И.Н. Леонова, У. Лохвасер, А. Бернер // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки. Материалы докладов II Всеросс. Научн. Конф. с междунар. участием, 22-24 мая 2018 г., Иркутск, С.80 – 82.

38. **Пермякова М.Д.** Кандидатные гены для регуляции активности липоксигеназы / М.Д. Пермякова, С.В. Осипова, А.В. Пермяков, Т.А. Пшеничникова, Е.Г. Рудиковская, А.В. Дорошков, И.Н. Леонова, В.В. Верхотуров, U. Lohwasser, A. Börner // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. Материалы докладов Всеросс. Конф. с междунар. участием 10-15 июля 2018 г., Иркутск, С. 970 – 974.

39. Pshenichnikova T. A. Leaf hairiness in wheat: genetic, evolutionary and physiological aspects / T. A. Pshenichnikova, A.V. Doroshkov, A V. Simonov, M. A. Yudina, D.A. Afonnikov, **M.D. Permyakova**, A.V. Permyakov, S.V. Osipova, A. Börner // European Cereals Genetics Co-operative Newslett. Proc. of the 17th Intern EWAC Conf., 3 – 8 June 2018, Bucharest, Romania; eds. A. Börner, M. Ciucă. – 2019. – С. 32–38.

40. Pshenichnikova T. A. Genetic dissection of drought tolerance by analysis of a recombinant chromosome substitution double haploid mapping population of bread wheat for 2A chromosome / T.A. Pshenichnikova, S.V. Osipova, **M.D. Permyakova**, A.V. Permyakov, A.A. Shishparenok, E.G. Rudikovskaya, A.V. Doroshkov, V.V. Verchoturov, N.M. Kovaleva, A.K. Chistyakova, I.N. Leonova, U. Lohwasser, A. Börner // European Cereals Genetics Co-operative Newslett. Proc. 17th Intern EWAC Conf. 3 – 8 June 2018, Bucharest, Romania; eds. A. Börner, M. Ciucă. – 2019. – С. 50–55.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

ВЗВ – вес зерна вторичных колосьев

ВЗР – вес зерна с растения

ВПС – водопоглотительная способность теста

ГР – глутатион редуктаза

ДГАР – дегидроаскорбат редуктаза

ДК – число дней до кушения

Дм2 – сорт пшеницы Диамант 2

ДЦ – число дней до цветения

ЖАК – жасмоновая кислота

ЖАК-Иле – конъюгат жасмоновой кислоты с изолейцином

ИРЛ – интрогрессированные рекомбинантные линии

ИУ% – индекс устойчивости

КЗ – крупность зерна

КЗК – количество зерен в главном колосе

ККК – количество колосков в главном колосе
 ЛКП, QTL – локус количественного признака
 листМЛОГ – активность мембраносвязанной липоксигеназы листьев
 листРЛОГ – активность растворимой липоксигеназы листьев
 ЛОГ, LOX, Lpx – липоксигеназа
 М1000з – масса 1000 зерен
 МЗК – масса зерна в колосе
 МП – масса побега
 Н67 – сорт пшеницы Новосибирская 67
 НАДФН –никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
 ПЭГ6000 –полиэтиленгликоль 6000
 РЗДЛ – рекомбинантные замещенные дигаплоидные линии
 РИЛ – рекомбинантные инбредные линии
 РЧ – размер частиц муки
 С29 – сорт пшеницы Саратовская 29
 СА – скорость ассимиляции CO₂ или нетто-фотосинтез
 САБ – скорость агрегации клейковинных белков
 Син6х – синтетический гексплоид Synthetic 6х
 СОД – супероксиддисмутаза
 СТ – скорость транспирации
 СЭТ – скорость электронного транспорта в фотосистеме II
 ТПДО – тиолпротеиндисульфид оксидоредуктаза
 ТХУ – трихлоруксусная кислота
 ТФ – транскрипционный фактор
 УП – устьичная проводимость
 УПЧМ – удельная поверхность частиц муки
 хлМЛОГ – активность липоксигеназы, связанной с мембранами хлоропластов
 хлРЛОГ – активность растворимой липоксигеназы хлоропластов
 ЧЗР – число зерен с растения
 ЧС – сорт пшеницы Чайниз Спринг
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
 ЭИВ – эффективность использования воды
 ЭФКВ(II) – эффективный фотохимический квантовый выход ФС II
 ITMI – популяция пшеницы International Mapping Triticiceae Initiative
 LOD – LOD-балл (lodlikelihood ratio), десятичный логарифм вероятности
 MED25 – субъединица 25 комплекса Медиатор
 NPQ – нефотохимическое тушение хлорофилла
 POX – пероксидаза