

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-18-39

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ К ХЛОРИДНОМУ ЗАСОЛЕНИЮ

Н.В. Кононенко¹, Т.А. Диловарова¹, Р.В. Канавский^{1,2},
С.В. Лебедев^{3,4}, Е.Н. Баранова¹, Л.И. Федорева^{1,5}

¹ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН
Москва, Российская Федерация, 127550

²РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
Москва, Российская Федерация, 127550

³Оренбургский государственный университет
Оренбург, Российская Федерация, 460018

⁴Федеральный научный центр РАН,
Оренбург, Российская Федерация, 460000

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Москва, Российская Федерация, 119192
nilava@mail.ru

Аннотация. Проблема определения потенциала солеустойчивости пшеницы — одна из наиболее актуальных в селекционной практике для районов с первичным и вторичным засолением. Наличие больших площадей засоленных почв является значительным препятствием для роста, развития и стабильности получения высокого урожая сельскохозяйственных растений. В связи с этим существует необходимость всестороннего изучения и усовершенствования методов диагностики на ранних этапах онтогенеза. Для идентификации маркеров солеустойчивости были взяты разные генотипы пшеницы *Triticum aestivum* и *Triticum durum*. В качестве маркеров солеустойчивости были использованы как морфометрические показатели сортов пшеницы, так и некоторые биохимические параметры. На данном этапе было показано, что для оценки устойчивости сортов пшеницы к действию хлоридного засоления необходима всесторонняя характеристика сортов пшеницы.

Ключевые слова: пшеница, NaCl, устойчивость, рулонная культура, фенотипические и биохимические маркеры

ВВЕДЕНИЕ

Избыточное засоление почвы неблагоприятно для большинства культурных растений. Соли влияют на физиологические, биохимические и молекулярные функции растений и, следовательно, приводят к снижению продуктивности и качества сельскохозяйственных культур во всем мире [1]. Площади засоленных сельскохозяйственных угодий имеют тенденцию к постоянному увеличению в результате процессов вторичного засоления, которое ежегодно приносит большой урон многим отраслям растениеводства и ограничивает использование площадей под

сельскохозяйственные культуры в засушливых районах нашей страны [2, 3]. Общая площадь засоленных почв в мире составляет более 950 млн га [4]. Увеличение мирового объема производства зерновых злаков, для России в частности, является крайне актуальным. Потребности увеличения производства могут быть удовлетворены за счет расширения территории культивирования и/или повышения урожайности наиболее распространенной в России злаковой культуры мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* Host.). Основными препятствиями для расширения посевных площадей пшеницы являются абиотические факторы (холод, засуха, затопление, засоление, высокая кислотность и др.), к которым пшеница недостаточно устойчива, вызывающие заметное снижение урожайности. В настоящее время засоление почвы относится к одному из основных лимитирующих факторов, негативно влияющих на рост и развитие пшеницы. В условиях засоления у пшеницы падает урожайность и ухудшается качество зерна (размер, равномерность, выполненность [5—8]).

Проблема определения потенциала солеустойчивости пшеницы — одна из наиболее актуальных в селекционной практике для регионов, для которых характерно как первичное, так и вторичное засоление. Необходимость всестороннего изучения и усовершенствования методов диагностики на ранних этапах онтогенеза определяется наличием во многих странах засоленных почв, занимающих большие площади, представляющих значительное препятствие для роста, развития и стабильности получения высокого урожая сельскохозяйственных растений [9].

Известно о различиях в солеустойчивости отдельных видов пшеницы, а также о возможности использования диких видов для повышения толерантности к соли, что связывают с участием солеустойчивых генотипов и даже галофитов в геноме современных культурных пшениц [10].

Одним из способов, позволяющих преодолеть негативное воздействие фактора засоления, служит использование толерантных к засолению селекционных линий и сортов пшеницы. Эффективная всесторонняя оценка и отбор таких линий должна стать надежным инструментом для адресного подбора сортов в зависимости от климатических, химических и механических условий культивирования в конкретном хозяйстве. Однако для обеспечения оптимального подбора представляется важной надежная оценочная система, позволяющая по простым доступным параметрам оценивать процессы, способные проявляться на поздних этапах при закладке урожая. Для получения полной информации наиболее перспективным является совокупность данных морфологических и современных биохимических исследований, а также исследований, характеризующих изменения на уровне состояния ДНК. Поэтому крайне важным является получить первичные характеристики чувствительности ростовых процессов.

Устойчивость растений к засолению обусловлена наличием специфических или неспецифических механизмов обеспечения стабильного метаболизма, роста и развития в онтогенезе растения, связанных с чувствительностью к одному или нескольким видам стрессовых факторов, а именно к осмотическому, окислительному или токсическому стрессовому воздействию NaCl [11].

Для эффективной оценки различных генотипов очень важны методы ранней диагностики, которые существенно сокращают временные затраты селекционеров [1]. Однако в настоящее время установлено, что устойчивость и чувствительность к осмотическому и ионному воздействию NaCl большинства сельскохозяйственных растений на разных стадиях онтогенеза существенно отличается [12]. Так, растения, которые будут неустойчивыми при анализе прорастания в присутствии соли, могут обладать высокой чувствительностью, и напротив, выдерживать высокие концентрации соли во взрослом состоянии. С другой стороны, отсутствие ингибирования роста не обеспечивает устойчивый урожай и нормальное генеративное развитие, так как растения могут быть нечувствительны к действию соли и не проявлять какой-либо заметной реакции [12].

Показано, что при использовании двух методов диагностики не получено одинаковых результатов в отношении солеустойчивости изученных сортов яровой пшеницы [4]. Следует ожидать, что в ряде случаев в селекционном процессе могут присутствовать генотипы, в которых будет наблюдаться и зависимый от стадии онтогенеза процесс возникновения или потери устойчивости культурных злаков.

Для ускорения селекционного процесса необходимо идентифицировать маркеры, связанные с чувствительностью и устойчивостью пшеницы к засолению. Целью настоящего исследования является ранняя, на стадии проростков, дифференциальная диагностика устойчивости сортов мягкой и твердой пшеницы яровой и озимой форм к хлоридному засолению для выявления фенотипических и молекулярных мишеней чувствительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом изучения послужили 16 сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* Host.) яровых форм (Агата, Варяг, Дарья, Злата, Лиза, Оренбургская 13, Оренбургская 22, Оренбургская 233, Учитель, Эстер) и озимых форм (Жемчужина Поволжья, Калач, Мироновская 808, Московская 39) и твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) яровой формы: Оренбургская 10 и Оренбургская 21 из коллекции ТСХА им. К.А. Тимирязева, ФГБНУ Федерального научного центра РАН, Оренбург, Россия и селекционного центра «Немчиновка».

В стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной дистиллированной водой (контроль) или растворами солей (опытные варианты), проводили определение всхожести семян. Для создания хлоридного засоления использовали 150 мМ раствор NaCl. Объем выборки — 50 семян в трехкратной повторности для каждого варианта. Чашки с семенами помещали в термостат ТСО-1/80 СПУ с температурой 22—24 °С. На шестой день эксперимента определяли всхожесть семян.

Оценку чувствительности к хлоридному засолению проводили методом рулонной культуры [13]. В эксперименте брали 50 семян, в 3 повторностях. Отбирали выполненные семена, не имеющие деформаций, повреждений поверхности или зародыша и признаков повреждений патогенами. Семена обрабатывали в водном растворе гипохлорита натрия в течение 15 мин с последующей 3-кратной промывкой стерильной водой. На 20-ти см полоски фильтровальной бумаги, шириной 2 см, раскладывали семена на расстоянии 1 см от верхнего края. Рулоны

помещали в стаканы, добавляли 150 мл дистиллированной воды (контроль) или 150 мМ раствора NaCl. Стаканы помещали в климокамеру. Выращивание проводили при 24 °С с искусственным освещением, обеспеченным лампами дневного света (5000 лк) день/ночь — 10/14 часов соответственно. Через 6 суток определяли вес сырой и сухой биомассы, длину главного корня, длину побега, общую длину проростка.

Расчет основных статистических параметров проводили по стандартным методикам, а также использовались программы для статистической обработки данных Statistica 6.0 и STATAN.

Окрашивание препаратов трипановым синим. Прижизненное окрашивание колеоптиля трипановым синим — 0,5% водным раствором проводили в течение 5 мин. с 3-кратной промывкой. Визуализация осуществлялась с помощью световой микроскопии (микроскоп Olympus BX51, объектив $\times 10$. Изображения получали с помощью цифровой камеры ColorVien (Германия).

Флуоресцентная микроскопия. Кончик колеоптиля (4—5 мм) проростка пшеницы отделяли и помещали на предметные стекла в каплю воды не менее 5 шт. на стекло. Для прижизненной визуализации в клетках АФК использовали водный раствор Carboxy-H2DFFDA (Thermo Fisher Scientific, США), в концентрации 25—50 нМ, время инкубации составляло 30 мин с последующей 3-кратной промывкой в дистиллированной воде. Затем живые корешки помещали в экспериментальные растворы без красителя.

Прижизненные препараты анализировали с использованием микроскопа Olympus BX51 (Япония), объектив $\times 10$, при длине волны 490 нм. Изображения получали с помощью цифровой камеры ColorVien (Германия).

Статистическую обработку данных проводили с применением программы Excel.

Выделение ДНК. 6-дневные колеоптили из разных сортов пшеницы и выращенные в разных условиях, тщательно растирали в ступке с жидким азотом, к полученному тонкому порошку добавляли лизирующий раствор (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 25 мМ ЭДТА, 1% DS-Na), тщательно размешивали и смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли NaCl до концентрации 1 М и депротеинизировали ее осторожным встряхиванием со смесью хлороформ-изоамиловый спирт (10 : 1, v/v). Полученные образцы ДНК обрабатывали рибонуклеазой А (50 мкг/мл) в течение 20 мин при 37 °С и протеиназой К (10 мкг) в течение 1 час при 37°. ДНК вновь осаждали добавлением трех объемов 96%-го этанола.

Горизонтальный электрофорез в агарозе. С помощью горизонтального электрофореза анализировали препараты ДНК. Выделенные и очищенные препараты ДНК (по 2 мкг) растворяли в Трис-боратном буфере (10 мМ, pH 8,0), содержащем 10 мМ ЭДТА, и подвергали горизонтальному электрофорезу в течение 2 ч в 1,2%-м агарозном геле при электрической напряженности 2—3 В/см в 0,09 М Трис-боратном буфере, pH 8,3, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. После электрофореза продукты гидролиза ДНК визуализировали в УФ-свете.

Определение содержания хлорофилла. Наземную часть пшеницы разных сортов (0,1 г) измельчали и растирали в фарфоровой чашке, добавляли немного

кварцевого чистого песка для лучшего результата. В кашицеобразную массу добавляли ацетон (10 мл), растирали массу до темно-зеленого цвета и центрифугировали в течение 10 мин. Супернатант отделяли и выдерживали в течение 30 минут в темном месте, затем определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре SmartSpecPlus при двух длинах волн 660 нм и 530 нм. Содержание хлорофилла в листьях рассчитывали по формуле:

$$Ca = 12,7 \cdot E_{660} - 2,69 \cdot E_{530}$$

и

$$Cb = 45,8 \cdot E_{530} - 2,34 \cdot E_{660},$$

где Ca и Cб — содержание хлорофилла а и б, 1 мг/л; E_{660} — оптическая плотность хлорофилла а при длине волны 660 нм; E_{530} — оптическая плотность хлорофилла в, при длине волны 530 нм.

Коэффициенты определяли из калибровочных кривых. Содержание хлорофилла в процентах (X) на сухое или сырое вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{P \cdot 100}{H} \%,$$

где P — содержание хлорофилла в полученном объеме вытяжки, мг; H — масса навески (сухой или сырой), мг.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Засоление, индуцированное NaCl, вызывает ряд специфических реакций на прорастающие семена. Нарушения могут сказываться в ингибировании набухания, нарушении наклевывания семян, а также на более поздних этапах вызывать изменение роста первичного корня, боковых корней, колеоптиля или побега. Известно, что максимальная чувствительность сортов яровой пшеницы к воздействию стрессового фактора проявляется на этапах прорастания семян и развития проростков (до 7-х сут.), в дальнейшем (на 10-е сут.) различия между хлоридным и сульфатным засолением менее выражены [4]. Это согласуется с нашими данными (не опубликовано), по этой причине мы исследовали шестисуточные проростки.

Начальные стадии развития пшеницы: на стадии набухания (рис. 1 а—б), наклёвывания (рис.1 в) и формирования проростка (рис. 1 г). На стадии проростка растения можно разделить (по биометрическим показателям) на 4 группы (рис. 1 д—з): 1 — сорта с ингибированием роста корня и незначительным снижением роста побега; 2 — сорта с ингибированием роста побега и незначительным снижением роста корня; 3 — сорта с ингибированием роста побега и корня; 4 — сорта с незначительным снижением роста побега и корня.

Реакция каждого сорта на засоление имеет индивидуальные сортовые особенности. На фотографии (рис. 2) приведены 4 типа реакции, которые демонстрируют ингибирование роста отдельных вегетативных органов пшеницы и соответствуют представленной схеме: к первому типу с мы отнесли сорта Агата, Варяг, Московская 39, Оренбургская 10; Оренбургская 21 и Оренбургская 233; ко второму — сорта Лиза и Калач; к 3 — сорта Оренбургская 22 и Учитель; к 4 — сорта Дарья, Жемчужина Поволжья, Злата, Оренбургская 13 и Эстер.

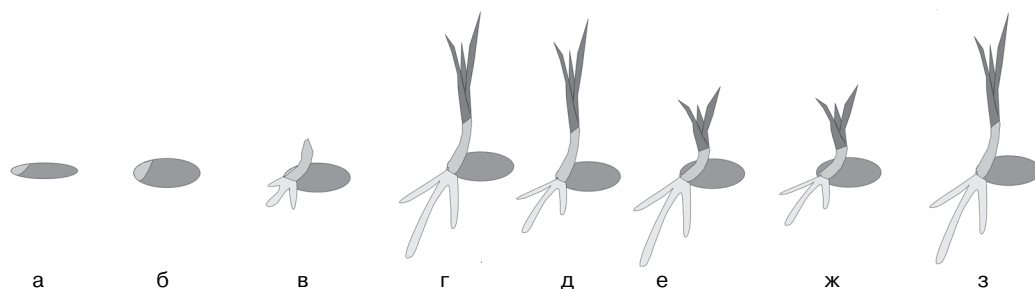


Рис. 1. Начальные стадии развития пшеницы: стадия набухания (а—б), наклёвывания (в) и формирования проростка (г). Типы солеустойчивости проростков пшеницы (д—з).

Fig. 1. The initial stages of wheat development: swelling stage (a, b), seed germination (c) and sprout formation (d). Types of salt tolerance in wheat seedlings (dz).

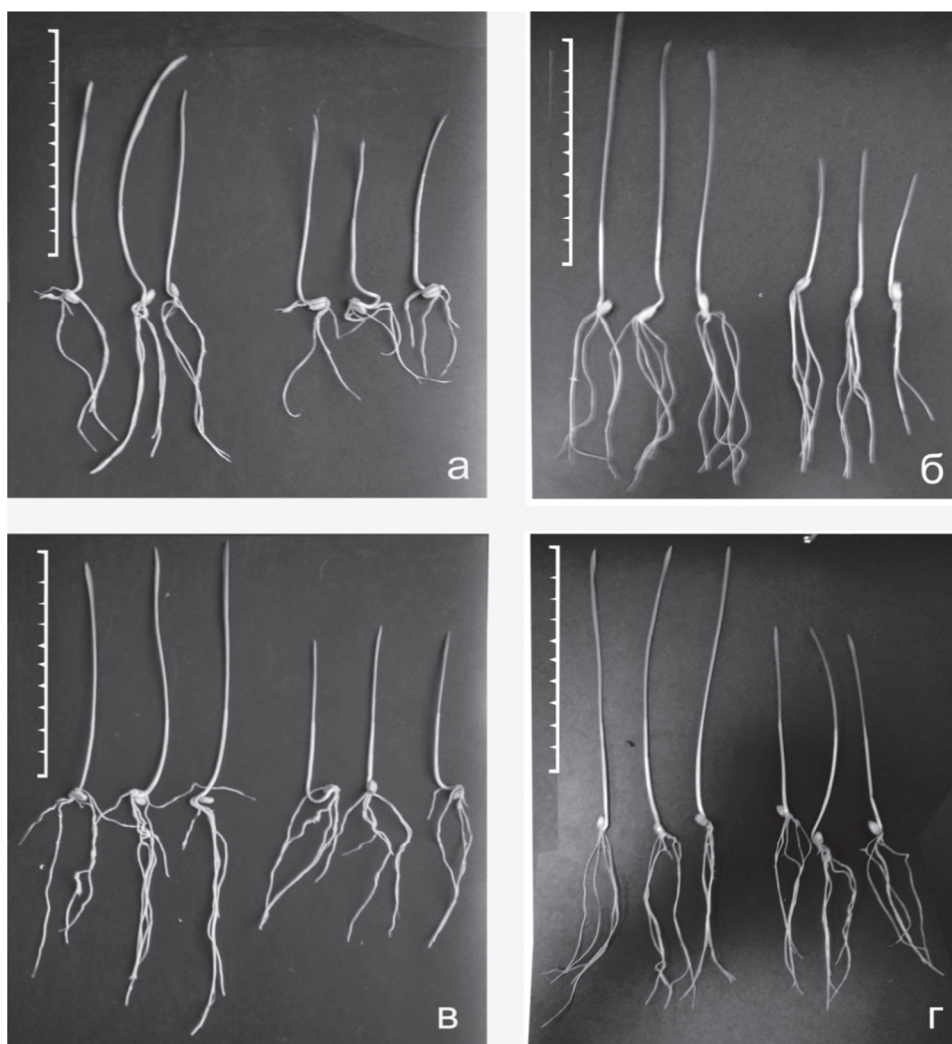


Рис. 2. Типы солеустойчивости проростков пшеницы (а—г).

Fig. 2. Types of salt tolerance in wheat seedlings.

Эксперименты на чашках Петри по определению всхожести разных сортов пшеницы в присутствии соли показали, что всхожесть у всех сортов пшеницы уменьшается на 20—40%. Более того, скорость всхожести замедляется на 10—24 часа. Однако в некоторых случаях скорость роста пшеницы в условиях засоления увеличивается, компенсируя вызванное NaCl отставание роста, и соответствует показателям контрольного варианта. Более подробное описание характеристики влияния соли на рост и развитие 6-дневных проростков пшеницы разных сортов представлены ниже (табл. 1, рис. 3 и 4). В работе [4] также отмечен подобный эффект. Кроме того, было установлено, что засоление субстрата приводит к значительному снижению всхожести семян, длины и массы побегов, длины и массы корней, площади листьев (на 13,8—97,4%).

Таблица 1 / Table 1

**Морфометрические характеристики сортов пшеницы при действии NaCl /
Morphometric characteristics of wheat varieties under NaCl treatment**

№	Вид		Сорт	Вариант	Высота побега, мм	Длина корневой системы, мм	Сырая масса, мг	Сухая масса, мг	Содержание сухого вещества, %
1	Пшеница мягкая	яровая	Агата	контр	109,5 ± 5,5	98,5 ± 4,9	191 ± 9,6	24 ± 1,3	12,6 ± 0,5
				соль	76,6 ± 3,9	91,2 ± 4,6	175 ± 8,4	24 ± 1,2	13,7 ± 0,6
2	<i>Triticum aestivum</i>		Варяг	контр	121,2 ± 6,1	87,4 ± 3,7	596 ± 29,5	45 ± 2,1	7,6 ± 0,4
				соль	74,7 ± 3,7	78,9 ± 4,2	345 ± 17,2	51 ± 1,8	14,8 ± 0,7
3	Host		Дарья	контр	100,2 ± 4,8	105,1 ± 4,4	197 ± 10,4	21 ± 1,4	10,7 ± 0,6
				соль	68,2 ± 3,5	87,7 ± 4,1	137 ± 6,9	19 ± 1,3	13,9 ± 0,7
4			Злата	контр	108,3 ± 5,4	101,2 ± 5,3	198 ± 11,0	22 ± 1,5	11,1 ± 0,5
				соль	67,6 ± 3,3	80,0 ± 4,5	140 ± 7,2	21 ± 2,0	15,0 ± 1,1
5			Лиза	контр	91,3 ± 3,9	111,5 ± 6,0	225 ± 11,4	25 ± 1,4	11,1 ± 0,7
				соль	68,3 ± 3,5	85,2 ± 4,0	203 ± 10,1	28 ± 1,7	13,8 ± 0,9
6			Оренбургская — 13	контр	121,4 ± 5,6	96,6 ± 4,7	393 ± 19,8	46 ± 1,9	11,1 ± 0,7
				соль	90,0 ± 5,0	71,5 ± 3,6	354 ± 17,9	39 ± 1,8	18,7 ± 1,2
7			Оренбургская — 22	контр	91,0 ± 4,3	67,4 ± 3,5	372 ± 18,6	44 ± 2,0	15,0 ± 1,1
				соль	83,8 ± 4,2	53,3 ± 2,7	264 ± 13,2	28 ± 1,7	18,6 ± 0,9
8			Оренбургская — 233	контр	125,7 ± 6,3	92,9 ± 4,6	377 ± 18,6	42 ± 1,9	11,1 ± 0,9
				соль	81,9 ± 3,9	80,0 ± 4,6	361 ± 17,8	44 ± 2,1	12,2 ± 0,6
9			Учитель	контр	107,7 ± 5,3	77,6 ± 4,0	463 ± 22,5	54 ± 2,2	15,8 ± 1,0
				соль	79,0 ± 3,7	67,6 ± 4	420 ± 21,0	45 ± 1,8	18,8 ± 1,3
10			Эстер	контр	118,2 ± 6,0	90,7 ± 4,4	182 ± 9,1	22 ± 1,1	12,1 ± 0,7
				соль	67,8 ± 3,2	70,8 ± 3,1	146 ± 8,2	23 ± 1,4	15,8 ± 0,9
11		озимая	Жемчужина	контр	118,8 ± 5,6	110,5 ± 5,4	663 ± 31,5	81 ± 3,8	12,2 ± 0,5
				соль	70,7 ± 3,6	90,6 ± 4,7	348 ± 18,1	81 ± 3,4	13,3 ± 0,6
12			Калач	контр	87,1 ± 4,4	78,8 ± 3,8	212 ± 10,6	17 ± 0,9	8,0 ± 0,4
				соль	62,7 ± 2,9	62,8 ± 3,2	150 ± 8,0	17 ± 1,2	11,3 ± 0,5
13			Мироновская — 808	контр	85,7 ± 4,3	59,0 ± 3,1	154 ± 7,7	13 ± 0,6	8,4 ± 0,5
				соль	64,1 ± 3,2	48,5 ± 2,5	89 ± 5,4	12 ± 0,8	13,5 ± 0,6
14			Московская — 39	контр	102,1 ± 5,2	86,5 ± 4,7	279 ± 14,3	30 ± 1,8	10,8 ± 0,5
				соль	69,8 ± 3,1	75,5 ± 3,4	210 ± 10,4	27 ± 1,6	12,9 ± 0,8
15	Пшеница твердая	яровая	Оренбургская — 10	контр	117,9 ± 5,2	80,0 ± 4,0	560 ± 28,1	73 ± 3,0	15,4 ± 0,8
				соль	63,3 ± 3,1	72,8 ± 3,7	267 ± 15,3	40 ± 1,5	18,0 ± 0,9
16	<i>Triticum durum</i>	Desf	Оренбургская — 21	контр	110,6 ± 5,0	92,7 ± 4,5	407 ± 20,5	39 ± 1,4	9,6 ± 0,5
				соль	76,6 ± 3,6	80,1 ± 4,2	301 ± 13,9	39 ± 1,6	13,0 ± 0,7

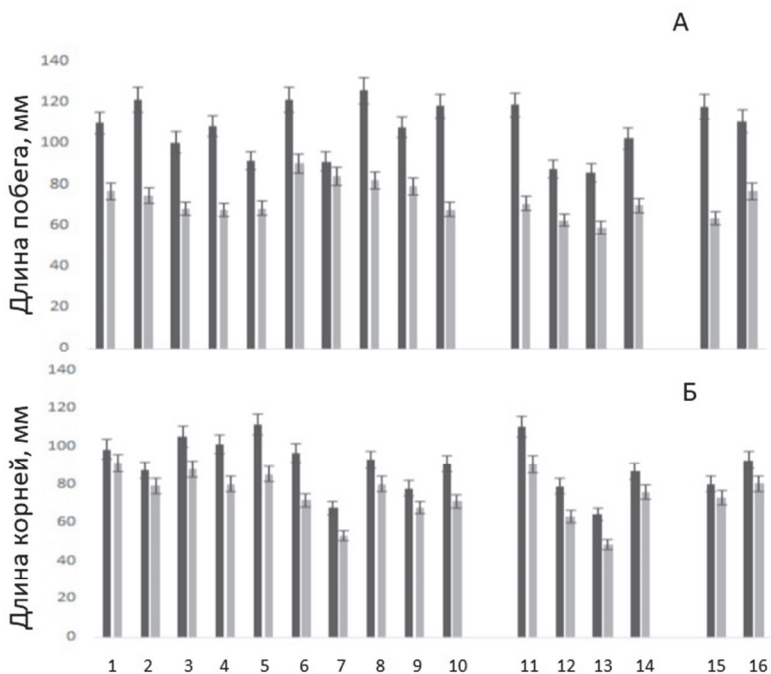


Рис. 3. Биометрические данные длины побега (А) и длины корня (Б) пшеницы.

Черные столбцы — контроль, серые столбцы — 150 мМ NaCl. Сорты пшеницы: 1 — Агата, 2 — Варяг, 3 — Дарья, 4 — Злата, 5 — Лиза, 6 — Оренбургская 13, 7 — Оренбургская 22, 8 — Оренбургская 233, 9 — Учитель, 10 — Эстер, 11 — Жемчужина Поволжья, 12 — Калач, 13 — Мироновская 808, 14 — Московская 39, 15 — Оренбургская 10, 16 — Оренбургская 21

Fig. 3. Shoot (A) and root (B) length of wheat.

Black columns — control, gray columns — 150 mM NaCl. Wheat varieties: 1 — Agata, 2 — Varyag, 3 — Dar'ya, 4 — Zlata, 5 — Liza, 6 — Orenburgskaya 13, 7 — Orenburgskaya 22, 8 — Orenburgskaya 233, 9 — Uchitel', 10 — Ester, 11 — Zhemchuzhina Povolzh'ya, 12 — Kalach, 13 — Mironovskaya 808, 14 — Moskovskaya 39, 15 — Orenburgskaya 10, 16 — Orenburgskaya 21

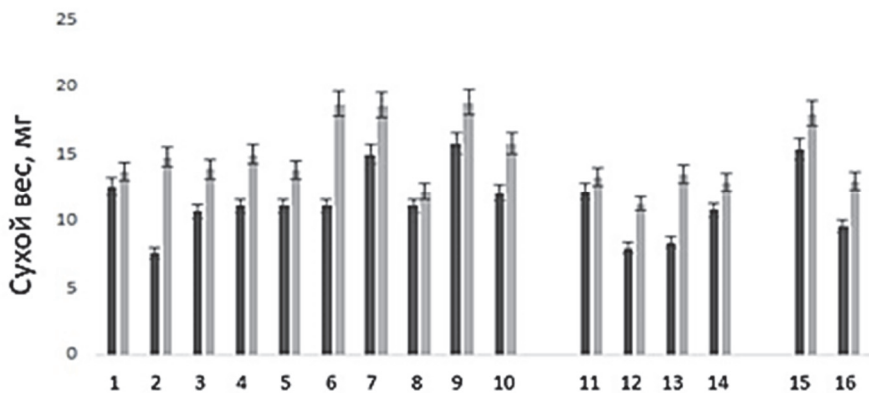


Рис. 4. Изменение сухого веса у разных сортов пшеницы при засолении.

Черные столбцы — контроль, серые столбцы — 150 мМ NaCl.
Номера сортов как на рис. 3.

Fig. 4. Changes in dry weight of different wheat varieties during salinization.

Black columns — control, gray columns — 150 mM NaCl.
Variety numbers are as in Fig. 3.

Одним из видимых симптомов воздействия засоления является нарушение роста проростков. Несмотря на разную степень воздействия на различные процессы роста, результатом во всех случаях будет в конечном счете ингибирование роста корня и побега, по силе проявления этих показателей можно судить о токсичности соли.

Действие засоления у всех изученных образцов вызывало значительное уменьшение роста как корневой системы, так и надземных органов. Как видно из таблицы 1, наибольшей устойчивостью по высоте надземной массы обладал сорт Оренбургская 22, данный показатель снизился всего на 7,9% в варианте с солью по сравнению с контролем. По длине корневой системы наименьший разрыв между вариантами был у сортов Агата и Варяг — 7,4% и 10,0% соответственно.

При рассмотрении отдельно по сухому весу проростков все сорта пшеницы можно разделить на 3 группы — сорта с высокой чувствительностью к ионам натрия и хлора (Варяг, Оренбургская 13), устойчивые сорта (Агата, Жемчужина Поволжья, Лиза, Московская 39, Оренбургская 10, Оренбургская 233) и сорта с промежуточными параметрами чувствительности (Дарья, Злата, Калач, Оренбургская 21, Оренбургская 22, Учитель, Эстер (рис. 4).

Хлорофилл обеспечивает важнейшие реакции преобразования электромагнитного излучения (света) в свободную энергию химических связей, включает поглощение фотонов свето-собирающими комплексами (антеннами), связанными с ФС I и ФС II.

Известно несколько форм хлорофиллов, различающихся по химическому строению.

Спектр поглощения различных форм хлорофиллов охватывает видимую, ближнюю ультрафиолетовую и ближнюю инфракрасную области спектра (у высших растений от 350 до 700 нм) и является важнейшим компонентом фотосинтетического аппарата тилакоидных мембран листьев растений. Содержание хлорофиллов обусловлено генетической природой растения, поэтому их содержание в культуре может быть использовано в качестве физиолого-биохимического маркера. Содержание хлорофилла специфично для листьев каждого вида и сорта растений и существенно изменяется в зависимости от освещения, минерального питания, возраста листьев и других условий. Было показано на обширном фактическом материале с использованием большого числа видов сельскохозяйственных растений (пшеница, рожь, ячмень, просо, гречиха, горох, картофель и др.), что индексы и фотосинтетические потенциалы хлорофилла тесно коррелируют с биологическими параметрами и показателями урожая [14].

Особую важность приобретает определение фотосинтетических потенциалов хлорофиллов и их структуры у растений, подвергающихся действию различных экстремальных факторов. Известно, что эти факторы вызывают, с одной стороны, интенсивную деградацию фотосинтетических пигментов, с другой, — замедляют их синтез, в результате у таких растений может значительно измениться как содержание хлорофиллов, так и его структура (за счет, в первую очередь, листьев, особенно нижних) [15].

Для определения концентрации хлорофилла используют хроматографические и спектрофотометрические методы. При проведении фотометрического определения содержания хлорофилла в листьях растений в качестве стандартного раствора для построения калибровочного графика применяют раствор хлорофилла. Выбор длины волны, при которой проводится спектрофотометрирование, позволяет отдельно определить содержание хлорофиллов разного типа.

Для извлечения хлорофилла из листьев применяют как полярные, так и неполярные органические растворители. Наиболее часто используются этанол и ацетон как в чистом виде, так и в растворах, а также 80%-й раствор ацетона по модификации Вернона и 85%-й раствор по модификации Реббелена, так как небольшое количество воды необходимо для гидролиза хлорофилл-белкового комплекса, что способствует более полному извлечению хлорофилла при экстракции.

Для экспресс-анализа мы использовали экстракцию чистым ацетоном и спектрофотометрическим методом оценки содержания хлорофилла в различных сортах пшеницы, выращенных в условиях засоления.

Согласно данным таблицы 2 и рисунка 5, содержание хлорофилла Ca сильно варьирует в зависимости от сорта пшеницы. Наибольшее содержание хлорофилла Ca/мл наблюдалось в озимых сортах Жемчужина Поволжья и Калач. Наименьшее — в сорте Мироновская 808, которая также является озимым сортом, а также в сорте яровой пшеницы Оренбургская 233. Содержание хлорофилла Ca в пшенице, выращенной в условиях повышенного засоления, может как увеличиваться по сравнению с контролем, так и уменьшаться или оставаться практически без изменения.

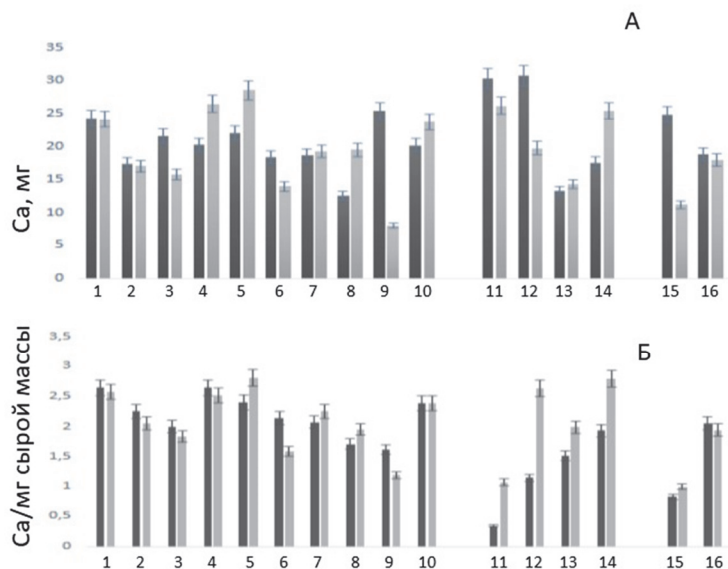


Рис. 5. Содержание хлорофилла А (Ca/мл экстракта) в пшенице (А).
Содержание хлорофилла А (Ca/мг сырой массы побега пшеницы) (Б).

Черные столбцы — контроль, серые столбцы — 150 мМ NaCl. Номера сортов как на рис. 3.

Fig. 5. Chlorophyll A content (Ca/ml extract) in wheat (A).
Chlorophyll A content (Ca/mg wet weight of wheat shoot) (B).

Black columns — control, gray columns — 150 mM NaCl. Variety numbers are as in Fig. 3.

Таблица 2 / Table 2

Содержание хлорофилла Са и Сб в разных сортах пшеницы, выращенных в условиях засоления и без. Процент отклонения составлял 4–5% / Chlorophyll content in different wheat varieties grown under salinization and without salinization. The percentage of deviation was 4–5%

Сорт			Условия выращивания	Са, мг/мл	Сб, мг/мл	Са / Сб	Са / сухой вес	Са / сырой вес	Сб / сухой вес	Сб / сырой вес	
Пшеница мягкая <i>Triticum aestivum</i> Host	яровая	Агата	контр	24,27	2,21	10,98	1,04	0,127	0,092	0,011	
			соль	24,17	1,98	12,21	1,01	0,138	0,082	0,011	
		Варяг	контр	17,39	7,53	2,31	0,39	0,029	0,17	0,012	
			соль	16,98	4,39	3,87	0,33	0,049	0,09	0,012	
		Дарья	контр	21,49	1,88	11,43	1,02	0,109	0,09	0,009	
			соль	15,69	1,78	8,81	0,82	0,114	0,09	0,013	
		Злата	контр	20,17	2,06	9,79	0,92	0,101	0,09	0,104	
			соль	26,47	3,19	8,3	1,26	0,189	0,15	0,023	
		Лиза	контр	22	2,08	10,58	0,88	0,098	0,08	0,009	
			соль	28,53	3,53	8,08	0,98	0,14	0,13	0,017	
		Оребургская 13	контр	18,4	14,86	1,24	0,4	0,047	0,323	0,038	
			соль	13,95	6,9	2,02	0,357	0,039	0,176	0,019	
		Оребургская 22	контр	18,6	11,52	1,61	0,42	0,05	0,261	0,031	
			соль	19,2	11,6	1,65	0,68	0,072	0,41	0,044	
	Оребургская 233	контр	12,58	8,26	1,52	0,3	0,033	0,2	0,022		
		соль	19,46	10,73	1,81	0,32	0,054	0,24	0,03		
	Учитель	контр	25,37	3,21	7,9	0,47	0,055	0,059	0,007		
		соль	8,11	3,76	2,16	0,18	0,019	0,083	0,009		
	Эстер	контр	20,11	2,09	9,62	0,91	0,11	0,095	0,011		
		соль	23,72	2,29	10,36	1,03	0,162	0,1	0,016		
озимая	Жемчужина Поволжья	контр	30,39	1,24	24,51	0,375	0,088	0,015	0,003		
		соль	26,16	5,6	4,67	0,32	0,039	0,069	0,008		
	Калач	контр	30,72	6,57	4,67	1,8	0,145	0,39	0,031		
		соль	19,71	6,38	3,09	1,16	0,131	0,375	0,042		
	Мироновская 808	контр	13,31	8,05	1,65	1,02	0,086	0,62	0,052		
		соль	14,3	7,47	1,91	1,91	0,16	0,62	0,083		
	Московская 39	контр	25,4	16,46	1,54	0,94	0,12	0,61	0,078		
		соль	18,6	11,52	1,61	0,42	0,05	0,261	0,031		
	Пшеница твердая <i>Triticum durum</i> Desf	яровая	Оребургская 10	контр	24,88	2,98	9,35	0,34	0,044	0,041	0,005
				соль	11,22	1,98	5,97	0,28	0,042	0,049	0,007
Оребургская 21		контр	17,89	13,2	1,35	0,39	0,059	0,287	0,036		
		соль	18,4	14,86	1,24	0,4	0,047	0,323	0,038		

На наш взгляд, наиболее достоверными данными являются относительное содержание хлорофилла Са на вес проростков пшеницы (рис. 5, табл. 2). Мы полагаем, что содержание Са в 1 мг сырой массы наиболее точно отражает характеристику сорта и условия выращивания пшеницы. Взятые нами для исследования

яровые сорта пшеницы (твердые и мягкие) оказались устойчивыми к засолению при рассмотрении параметра содержания Са/мг сырой массы, как одного из биохимических показателей сорта, т.е. изменения этого параметра в яровых сортах пшеницы оказались незначительными, отклонения составляли от 5 до 20%. В отличие от яровых сортов пшеницы содержание Са/мг сырой массы сильно зависело от условий выращивания, увеличение соли в среде сопровождалось значительным увеличением хлорофилла Са. По типу изменения хлорофилла выращенных в условиях засоления целесообразно разделить их на три типа. В первом типе не меняется концентрация хлорофилла на миллиграмм сырой массы у следующих сортов: Агата, Варяг, Дарья, Злата, Оренбургская 22, Оренбургская 10, Оренбургская 21. Увеличение количества хлорофилла при действии NaCl наблюдали у следующих сортов: Лиза, Жемчужина Поволжья, Калач, Мироновская 808, Московская 39. Уменьшение показателя отмечали у сортов Оренбургская 13 и Учитель. Такая зависимость содержания Са в 1 мг сырой массы может быть использована как маркер для характеристики сорта пшеницы и условий ее выращивания. Однако хлорофилл Са быстро окисляется и переходит в форму Сб. Скорость окисления зависит не только от сорта и условий выращивания растений, но и от метода его экстракции, температуры, времени и метода определения хлорофилла. Поэтому этот метод необходимо рассматривать как характеристику сорта и условия выращивания только в комплексе с другими биохимическими и биометрическими методами.

Деградация нуклеиновых кислот — составной элемент процесса отмирания растения на завершающих стадиях онтогенеза — имеет массивный характер и сопровождается разрушением основной массы РНК и ДНК [16, 17]. Именно на модели стареющего листа [18] было получено первое доказательство существования активной программы гибели клеток у растений, которое сопровождается деструкцией ядерного материала клеток листа при старении.

Проростки злаков оказались уникальной и очень удобной моделью для изучения ПКГ у растений. Во-первых, их рост и развитие могут быть легко синхронизированы [19], что немаловажно при исследовании динамики многих биохимических процессов, а во-вторых, отдельные их органы подвержены органоптозу [20]. Так, колеоптиль злаков функционирует относительно короткое время и быстро погибает по мере формирования и роста проростка. Несмотря на то, что ПКГ довольно жестко запрограммирован в онтогенезе растения, он может индуцироваться или модулироваться различными факторами или агентами среды, включая различные инфекции и стрессовые воздействия абиогенной природы (гипоксия, кислородный стресс и другие) [21].

Колеоптиль злаков — это первый зародышевый (бесцветный, зеленый или красноватый) лист злаков, не имеющий листовой пластинки и представляющий собой замкнутую трубку. Он обладает защитными свойствами для последующих листьев. Колеоптиль злаков функционирует относительно короткое время и быстро погибает по мере формирования и роста проростка.

В стареющих колеоптилях проростков пшеницы были обнаружены необычные структуры [22].

В вакуолях этих клеток были обнаружены многочисленные, различного размера участки цитоплазмы, окруженные замкнутой мембраной и содержащие одну или несколько митохондрий, фрагменты мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума и полирибосомные комплексы. Эти структурные образования представляют собой изолированные цитоплазматические структуры, не связанные с основной цитоплазмой клетки. Они структурно отличаются от всех известных — цитоплазма в обнаруженных везикулах не имеет никаких признаков деструкции, в отличие от содержимого окружающей их вакуоли.

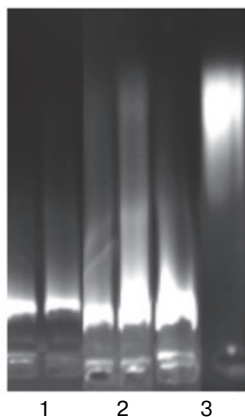


Рис. 6. Электрофорез в агарозе образцов ДНК, отличающиеся по степени деградации.

Слева — контроль, справа — 150 мМ NaCl.

Fig. 6. Electrophoresis in agarose of DNA samples, differing in degradation degree.

On the left — the control, on the right — 150 mM NaCl

Другим характерным маркером отмирающих клеток у животных является межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК. Однако в растениях сложно обнаружить четкую картину фрагментации ядерной ДНК из-за некоторых особенностей клеточной структуры и ядерного хроматина. Обнаружено, что разрушение ДНК в колеоптиле пшеницы на 6-й день происходит в виде набора олигонуклеотидов. Этот набор зависит от устойчивости сорта пшеницы к действию высокой концентрации соли (рис. 6). На рисунке 4 представлены данные электрофореза в агарозе 3-х вариантов ДНК из разных сортов пшеницы и выращенных в разных условиях (контроль, соль). Контрольные образцы всех сортов пшеницы содержат высокомолекулярную ДНК. К первому варианту относятся образцы ДНК, которая не деградирована в условиях засоления, это сорта: Агата, Дарья, Злата, Оренбургская 21, 22 и 233, а также сорта Лиза, Эстер, Московская 39 и Мионовская 808. Далее в некоторых сортах, таких как

Учитель, Варяг и Калач, происходит интенсивная деградация ДНК. И, наконец, в таких сортах, как Жемчужина Поволжья и Оренбургская 10, вся ДНК колеоптиля пшеницы, выращенной в присутствии соли, деградирована до олигонуклеотидов. Таким образом, ДНК колеоптиля может служить хорошим маркером для характеристики чувствительности пшеницы к условиям засоления. Эти данные коррелируют с полученными ранее данными о высокой чувствительности колеоптиля к абиотическим стрессам [23].

Первой проблемой анализа ПКГ в клеточных культурах является количественная оценка жизнеспособности/гибели клеток с течением времени [24]. Для идентификации количества отмерших клеток во всех сортах пшеницы проводили прижизненное окрашивание колеоптиля трипановым синим, проникающим через мембрану мертвых клеток, как тест на выявление степени повреждения тканей при засолении (рис. 7).

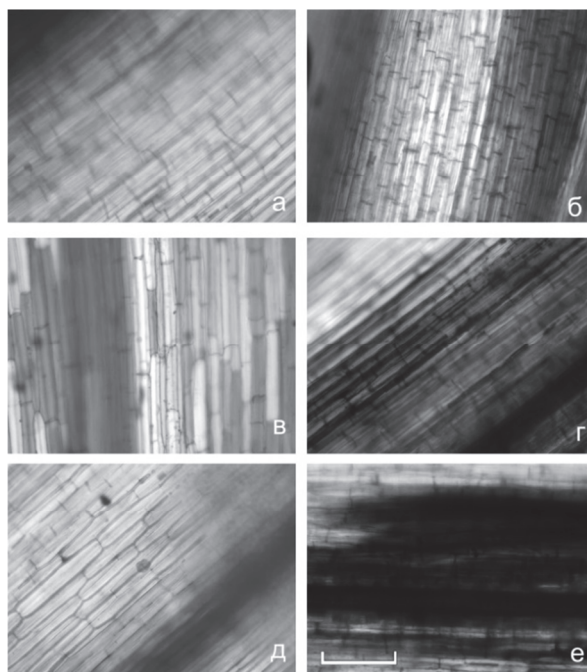


Рис. 7. Окраска трипановым синим образцов гипокотыля, отличающихся по количеству погибших клеток.

Слева — контроль (а, в, д), справа — 150 мМ NaCl (б — до 20% погибших клеток, г — до 50% погибших клеток, е — свыше 50% погибших клеток).
Масштабный отрезок 400 мкм

Fig. 7. Trypan blue staining of hypocotyl samples differing in number of dead cells.

On the left — control (a, b, d), on the right — 150 mM NaCl (b — up to 20% of dead cells, г — up to 50% of dead cells, e — over 50% of dead cells).
Scale cut — 400 microns

В контроле видимых изменений в колеоптиле почти не наблюдалось, в то время как в присутствии хлорида натрия наблюдали, в некоторых случаях, достаточно сильные повреждения ткани.

Согласно полученным данным, по воздействию соли на колеоптиль сорта разделили на три группы: а — устойчивые, в которых окрашивались трипановым синим единичные погибшие клетки; б — промежуточные, в которых количество и распределение гибнущих клеток было от 20 до 50%, в — чувствительные сорта, в которых количество погибших клеток было более 50% (рис. 7). Эти результаты согласуются с данными, полученными при анализе процессов деградации ДНК колеоптиля (рис. 6). Таким образом, NaCl может вызывать замедление гибели клеток и деградации ДНК, в то же время у ряда сортов наблюдается усиление гибели клеток колеоптиля при действии солей относительно контроля, что свидетельствует о наличии разных механизмов чувствительности и устойчивости ПКГ у разных сортов пшеницы, которые в настоящее время остаются неясными.

Одним из критериев оценки окислительного статуса клеток растений, является детекция активных форм кислорода (АФК) с помощью реагента Carboxy-H₂DFFDA. Известно, что АФК выполняют как сигнальную, так и регуляторную

функции в клетках растений при засолении [25]. Они образуются в различных компартментах клетки: в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, плазматической мембране, цитозоле, клеточной мембране [26]. Окрашивание колеоптиля пшеницы флуоресцентным красителем на АФК показало, что при засолении АФК детектируется в клетках колеоптиля (в контроле — единичные окрашенные клетки). После инкубации с маркером АФК Carboxy-H2DFFDA у контрольных растений пшеницы наблюдали незначительную флуоресценцию клеток колеоптиля (рис. 8). NaCl часто считается чрезвычайно токсичным действием для растений. Измененный статус воды, дисбаланс ионов и гиперосмотического стресса, вызванного обработкой NaCl, вызывают дальнейшее ингибирование роста и молекулярное повреждение при образовании реактивных форм кислорода [27—29].

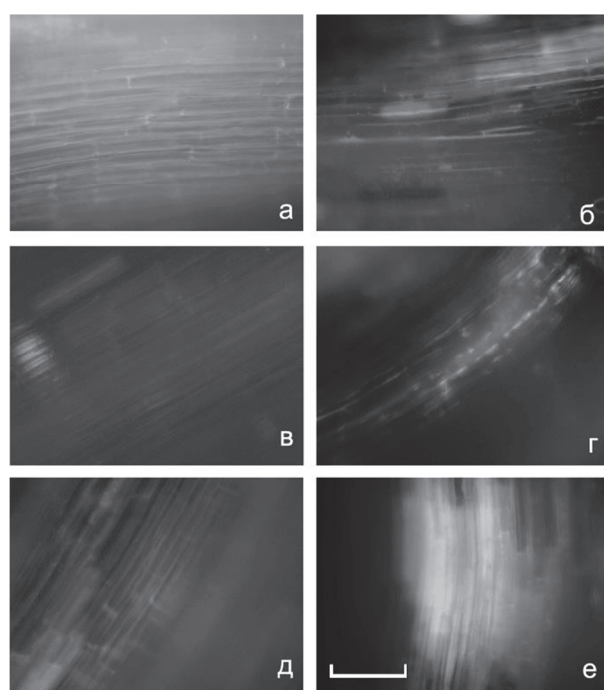


Рис. 8. Окрашивание колеоптиля пшеницы флуоресцентным маркером АФК Carboxy-H2DFFDA.

Слева — контроль (а, в, д), справа — 150 мМ NaCl (б — единичное содержание погибших клеток, г — до 50% погибших клеток, е — максимальное содержание погибших клеток).
Масштабный отрезок 400 мкм

Fig. 8. Staining of wheat coleoptile with AFC Carboxy-H2DFFDA fluorescent marker.

Left — control (a, b, d), right — 150 mM NaCl (b — single content of dead cells, d — up to 50% of dead cells, e — maximum content of dead cells).
Scale cut 400 microns

При воздействии NaCl маркер АФК Carboxy-H2DFFDA наблюдали в колеоптиле гораздо чаще по сравнению с контролем, причем преобладала более интенсивная флуоресценция, что указывает на повышение содержания в этих клетках уровня выработки АФК и активацию окислительного стресса. Накопление флюо-

ресцентного маркера АФК Carboxy-H2DFFDA в клетках колеоптиля при действии абиотических стрессовых факторов (в данном случае — засолении) указывает на то, что в данных клетках нарушается гомеостаз АФК, что может привести к запуску ПКГ. Следовательно, определение функционального состояния клеток с помощью прижизненных маркеров в дальнейшем может быть эффективно использовано для экспресс-оценки окислительного статуса клеток колеоптиля растений, выращиваемых под действием различных стрессовых факторов. Точное фенотипирование является ключом к поиску и внедрению новых генов для солеустойчивости в культурные растения [30, 31].

Таблица 3 / Table 3

**Солеустойчивость разных сортов пшеницы
по морфологическим и биохимическим показателям /
Salt tolerance of different wheat varieties by morphological and biochemical parameters**

			Дли- на побе- га	Дли- на корня	Су- хой вес	Са	Са / сы- рой вес	ДНК	АФК	Коли- че- ство мерт- вых кле- ток	
1	Пшеница мягкая <i>Triticum aestivum</i> Host	яровая	Агата	Б	А	А	А	А	А	А	
2			Варяг	В	А	В	А	А	Б	Б	Б
3			Дарья	В	Б	А	Ум	А	А	Б	Б
4			Злата	В	В	Б	Ув	А	А	Б	Б
5			Лиза	Б	В	Б	Ув	Ув	Б	А	А
6			Оренбург- ская 13	Б	В	В	Ум	Ум	Б	Б	Б
7			Оренбург- ская 22	А	В	Б	А	А	А	А	А
8			Оренбург- ская 233	В	Б	А	Ув	А	А	А	А
9			Учитель	В	Б	А	Ум	Ум	Б	Б	Б
10			Эстер	В	В	Б	Ув	А	Б	Б	Б
11		озимая	Жемчужина Поволжья	В	Б	А	Ум	Ув	В	Б	Б
12			Калач	Б	В	В	Ум	Ув	Б	Б	Б
13			Миронов- ская 808	Б	Б	В	А	Ув	Б	Б	Б
14			Москов- ская 39	В	Б	А	Ум	Ув	Б	А	А
15	Пшеница твердая <i>Triticum durum</i> Desf	яровая	Оренбург- ская 10	В	А	А	Ум	А	В	В	В
16			Оренбург- ская 21	В	Б	Б	А	А	А	Б	Б

В своем исследовании мы столкнулись с проблемой, что один и тот же сорт пшеницы по одним показателям может быть отнесен к солеустойчивому сорту, а по другим — как к чувствительному, к неустойчивому сорту. Для более нагляд-

ного представления полученных результатов мы все характеристики сортов пшеницы представили в таблице 3. В этой таблице все сорта пшеницы разделены на три группы по изменению длины побега, длины корня и сухого веса показателей в результате воздействия хлористого натрия: устойчивые или практически равные контрольным образцам (А), среднеустойчивые (Б) и неустойчивые (В). По содержанию хлорофилла а (Са)/мл экстракта и Са/мг сырой массы все сорта пшеницы также разделены на три группы: концентрация Са практически не изменяется при засолении (А), увеличивается (Ув) и уменьшается (Ум). Согласно данным рис. 4, где представлены данные электрофореза ДНК, все сорта пшеницы были разделены на три группы: ДНК практически не деградирует под действием соли (А), следующая группа, в которой происходит деградация ДНК (Б), и в третьей группе ДНК разрушена до низкомолекулярных олигонуклеотидов (В).

Данные по АФК в разных сортах пшеницы под действием соли также можно представить в виде трех типов: без изменения (А), средние показатели (Б) и высокие значения (В). В последней графе таблицы 3 представлены данные по всем сортам пшеницы, также разделенные на три группы на устойчивость клеток колониализма к действию соли: устойчивые (А), среднеустойчивые (Б) и неустойчивые (В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании совокупности всех данных таблицы 3 можно идентифицировать сорта Агата и Оренбургская 22 как наименее чувствительные к негативному действию NaCl и потенциально более устойчивые. Наиболее чувствительные и потенциально менее устойчивые Жемчужина Поволжья, Учитель.

Таким образом, нами было показано, что для характеристики солеустойчивости разных генотипов пшеницы необходимо всестороннее изучение как морфометрических, так и биохимических показателей солеустойчивости. В дальнейшем мы планируем расширить список биохимических показателей для характеристики солеустойчивости сортов пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-016-00150 А.

© Н.В. Кононенко, Т.А. Диловарова, Р.В. Канавский,
С.В. Лебедев, Е.Н. Баранова, Л.И. Федореева, 2019.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Balandrán-Quintana R.R., Mercado-Ruiz J.N., Mendoza-Wilson A.M.* Wheat bran proteins: a review of their uses and potential // *Food Reviews International*. 2015. Vol. 31. №. 3. P. 279—293.
- [2] *Ковригина Л.В., Заушицкая А.В., Петункина Л.О.* Сравнительная оценка солеустойчивости сортов ячменя в лабораторных условиях // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2006. Т. 162. С. 44—49.
- [3] *Удовенко Г.В., Гончарова Э.А.* Влияние экстремальных условий среды на структуру урожая сельскохозяйственных растений. Л.: Гидрометеиздат, 1982. 215 с.

- [4] Белозерова А.А., Боле Н.А. Изучение реакции яровой пшеницы на засоление по изменчивости морфометрических параметров проростков // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 12—2. С. 300—306.
- [5] Maas E.V., Grieve C.M. Spike and leaf development of sal-stressed wheat // *Crop Science*. 1990. Vol. 30. №. 6. P. 1309—1313.
- [6] Maas E.V., Lesch S.M., Francois L.E., Grieve C.M. Tiller development in salt-stressed wheat // *Crop science*. 1994. Vol. 34. № 6. P. 1594—1603.
- [7] Turki N., Harrabi M., Okuno K. Effect of salinity on grain yield and quality of wheat and genetic relationships among durum and common wheat // *J Arid Land Studies*. 2012. Vol. 22. №. 1. P. 311—314.
- [8] Houshmand S., Arzani A., Mirmohammadi-Maibody S.A.M. Effects of salinity and drought stress on grain quality of durum wheat // *Communications in soil science and plant analysis*. 2014. Vol. 45. №. 3. P. 297—308.
- [9] Бойко Л.А. Физиология корневой системы растений в условиях засоления. Л.: Наука. 1969. 164 с.
- [10] Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat // *Journal of Experimental Botany*. 2006. Vol. 57. №. 5. P. 1059—1078.
- [11] Баранова Е.Н., Гулевич А.А. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2006. Т. 41. № 1. С. 39—56.
- [12] Munns R., James R.A., Gilliham M., Flowers T.J., Colmer T.D. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops // *Functional Plant Biology*. 2016. Vol. 43. № 12. P. 1103—1113.
- [13] Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука. 1968. 226 с.
- [14] Сидько А.Ф., Ботвич И.Ю., Письман Т.И., Шевырнов А.П. Оценка содержания хлорофилла и урожайности зерновых культур по хлорофилльному потенциалу // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 3. С. 565—569.
- [15] Sun Z., Liu S., Fan J., Li Q., Wang K., Guo M., Zhang G., Ren L., Zheng G., Ma T., Pu H., Cai J., Jiang D., Chen F., Li X. Performance index derived from chlorophyll A fluorescence induction curve indicates the salt induced grain yield loss in wheat // *JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018. Vol. 28. № 3. P. 837—844.
- [16] Farkas G.L. Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In: Parthier D., Boulter D. (eds.) *Nucleic Acids and Proteins in Plants II*. Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin, Heidelberg: Springer; 1982. P. 224—262.
- [17] Fukuda H., Komamine A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans* // *Plant Physiology*. 1980. Vol. 65. № 1. P. 57—60.
- [18] van Doorn W.G., Woltering E.J. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? // *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. № 406. P. 2147—2153.
- [19] Кирнос М.Д., Волкова С.А., Ганичева Н.И., Кудряшова И.Б., Ванюшин Б.Ф. Синхронный синтез ДНК в колеоптиле и первом листе развивающихся этиолированных проростков пшеницы. Природа и соотношение синтезов ядерной и митохондриальной ДНК // *Биохимия*. 1983. Т. 48. № 10. 1587—1595.
- [20] Кирнос М.Д., Александрушкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Апоптоз в клетках первого листа и колеоптиля проростков пшеницы: межнуклеосомная фрагментация генома и синтез тяжелых олигонуклеосомного размера фрагментов ДНК // *Биохимия*. 1997. Т. 62. № 8. 1008—1014.
- [21] Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // *Успехи биологической химии*. 2001. Т. 41. № 1. С. 3—38.

- [22] Bakeeva L.E., Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., Kazimirchuk S.B., Shorning B.Yu., Zamyatnina V.A., Yaguzhinsky L.S., Vanyushin B.F. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles // FEBS Letters. 1999. Vol. 457. № 1. P. 122—125.
- [23] Vanyushin B.F., Bakeeva L.E., Zamyatnina V.A., Aleksandrushkina N.I. Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents // Int. Rev. Cytol. 2004. Vol. 233. P. 135—179.
- [24] Cimini S., Ronci M.B., Barizza E., de Pinto M.C., Locato V., Schiavo F.L., De Gara L. Plant Cell Cultures as Model Systems to Study Programmed Cell Death. In: Plant Programmed Cell Death (pp. 173—186). Humana Press, New York, NY, 2018.
- [25] Gibson S.W., Todd C.D. Arabidopsis AIR12 influences root development // Physiol Mol Biol Plants. 2015. Vol. 21. № 4. P. 479—489.
- [26] Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // Antioxid. Redox Signal. 2009. Vol. 11. № 1. P. 861—905.
- [27] Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. Vol. 59. P. 651—681.
- [28] Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // Ukrainian biochemical journal. 2014. Т. 86. № 4. С. 18—35.
- [29] Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 163—178.
- [30] Munns R., James R.A., Läuchli A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals // Journal of experimental botany. 2006. Vol. 57. № 5. P. 1025—1043.
- [31] Луценко Э.К., Марушко Е.А., Кононенко Н.В., Леонова Т.Г. Влияние фузикококцина на ранние этапы роста сорго при высоких концентрациях NaCl // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 3. С. 378—383.

Сведения об авторах:

Кононенко Неонила Васильевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: nilava@mail.ru

Диловарова Татьяна Анатольевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: dilovarova@yandex.ru

Канавский Роман Валерьевич — студент Российского государственного аграрного университета; e-mail: rkanav@yandex.ru

Лебедев Святослав Валерьевич — доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры Оренбургского государственного университета

Баранова Екатерина Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: greenpro2007@ Rambler.ru

Федореева Лариса Ивановна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: fedlara@inbox.ru

Для цитирования:

Кононенко Н.В., Диловарова Т.А., Канавский Р.В., Лебедев С.В., Баранова Е.Н., Федореева Л.И. Оценка морфологических и биохимических параметров устойчивости различных генотипов пшеницы к хлоридному засолению // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 18—39. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-18-39.

EVALUATION OF MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESISTANCE PARAMETERS TO CHLORIDE SALINATION IN DIFFERENT WHEAT GENOTYPES

Neonila V. Kononenko¹, Tat'yana A. Dilovarova¹, Roman V. Kanavsky^{1,2},
Svyatoslav V. Lebedev^{3,4}, Ekaterina N. Baranova¹,
Larisa I. Fedoreeva^{1,5}

¹Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences
Moscow, 127550, Russian Federation

²Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy
Moscow, 127550, Russian Federation

³Orenburg State University
Orenburg, 460018, Russian Federation

⁴Federal Research Center of Russian Academy of Sciences
Orenburg, 460000, Russian Federation

⁵Lomonosov Moscow State University
Moscow, 119192, Russian Federation

Abstract. Determining salt tolerance potential in wheat is one of the most important problems in breeding practice for areas with primary and secondary salinity. Presence of large areas of saline soils results in inhibition of growth, development and stability in obtaining high yields of agricultural plants. Therefore, there is a need for a comprehensive studying and improving of diagnostic methods during early growth stages. Different genotypes of wheat *Triticum aestivum* Host. and *Triticum durum* Desf. were used to identify salt tolerance markers. Both morphometric and some biochemical indicators of wheat varieties were used as salt tolerance markers. At this stage, it was shown that a comprehensive description of wheat varieties is needed to assess resistance of wheat varieties to chloride salinity.

Key words: wheat, NaCl, tolerance, roll crop, phenotypic and biochemical markers

REFERENCES

- [1] Baladrán-Quintana RR, Mercado-Ruiz JN, Mendoza-Wilson AM. Wheat bran proteins: a review of their uses and potential. *Food Reviews International*. 2015; 31(3):279—293. Available from: doi: 10.1080/87559129.2015.1015137.
- [2] Kovrigina LV, Zaushintseva AV, Petunkina LO. Laboratory-based comparative assessment of salt-tolerance in barley cultivars. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2006; 162:44—49. (In Russ).
- [3] Udovenko GV, Goncharova ÉA. *Effect of extreme environmental conditions on yield structure of agricultural plants*. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ.; 1982. (In Russ).
- [4] Belozerova AA, Bome NA. Study of spring wheat reaction to salinity on the variability of sprouts morphometric parameters. *Fundamental research*. 2014; (12—2):300—306. (In Russ).
- [5] Maas EV, Grieve CM. Spike and leaf development of sal-stressed wheat. *Crop Science*. 1990; 30(6):1309—1313. Available from: doi: 10.2135/cropsci1990.0011183X00300060031x.
- [6] Maas EV, Lesch, SM, Francois LE, Grieve CM. Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop science*. 1994; 34(6):1594—1603. Available from: doi: 10.2135/cropsci1994.0011183X00340060032x.

- [7] Turki N, Harrabi M, Okuno K. Effect of salinity on grain yield and quality of wheat and genetic relationships among durum and common wheat. *J Arid Land Studies*. 2012; 22(1):311—314.
- [8] Houshmand S, Arzani A, Mirmohammadi-Maibody SAM. Effects of salinity and drought stress on grain quality of durum wheat. *Communications in soil science and plant analysis*. 2014; 45(3):297—308. Available from: doi: 10.1080/00103624.2013.861911.
- [9] Boiko LA. *Physiology of plant root system under soil salinization condition*. Leningrad: Nauka Publ.; 1969. (In Russ).
- [10] Colmer TD, Flowers TJ, Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57(5):1059—1078. Available from: doi: 10.1093/jxb/erj124.
- [11] Baranova EN, Gulevich AA. Problems and perspectives of genetic engineering approach to the resolving of the tasks of plant resistance to salinity. *Agricultural Biology*. 2006; 41(1):39—56. (In Russ).
- [12] Munns R, James RA, Gilliham M, Flowers TJ, Colmer TD. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*. 2016; 43(12):1103—1113. Available from: doi: 10.1071/FP16187
- [13] Zhurbitskii ZI. *Theory and practice of vegetation method*. Moscow: Nauka Publ.; 1968. (In Russ).
- [14] Sid'ko AF, Botvich IY, Pis'man TI, Shevymogov AP. Estimation of the chlorophyll content and yield of grain crops via their chlorophyll potential. *Biophysics*. 2017; 62(3):565—569. (In Russ). Available from: doi: 10.1134/S0006350917030198.
- [15] Sun Z, Liu S, Fan J, Li Q, Wang K, Guo M, Zhang G, Ren L, Zheng G, Ma T, Pu H, Cai J, Jiang D, Chen F, Li X. Performance index derived from chlorophyll A fluorescence induction curve indicates the salt induced grain yield loss in wheat. *JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018; 28(3):837—844.
- [16] Farkas GL. Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In: Parthier D, Boulter D. (eds.) *Nucleic Acids and Proteins in Plants II. Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1982. p. 224—262. Available from: doi: 10.1007/978-3-642-68347-3_8.
- [17] Fukuda H, Komamine A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant physiology*. 1980; 65(1):57—60. Available from: doi: 10.1104/pp.65.1.57.
- [18] van Doorn WG, Woltering EJ. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *Journal of Experimental Botany*. 2004; 55(406):2147—2153. Available from: doi: 10.1093/jxb/erh264.
- [19] Kirnos MD, Volkova SA, Ganicheva NI, Kudryashova IB, Vanyushin BF. Synchronous DNA synthesis in coleoptile and initial leaf of developing etiolated wheat seedlings: nature and correlation of nuclear and mitochondrial DNA synthesis. *Biochemistry*. 1983; 48(10): 1587—1595. (In Russ).
- [20] Kirnos MD, Alexandrushkina NI, Vanyushin BF. Apoptosis in cells of the initial leaf and coleoptile of wheat seedlings: internucleosomal fragmentation of genome and synthesis of “heavy” oligonucleosome-size DNA fragments. *Biochemistry*. 1997; 62 (8):1008—1014. (In Russ).
- [21] Vanyushin BF. Apoptosis in plants. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2001; 41(1):3—38. (In Russ).
- [22] Bakeeva LE, Kirnos MD, Aleksandrushkina NI, Kazimirchuk SB, Shorning BY, Zamyatnina VA, Yaguzhinsky LS, Vanyushin BF. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles. *FEBS Letters*. 1999; 457(1):122—125. (In Russ).
- [23] Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Aleksandrushkina NI. Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int. Rev. Cytol*. 2004; 233:135—179. (In Russ).
- [24] Cimini S, Ronci MB, Barizza E, de Pinto MC, Locato V, Schiavo FL, De Gara L. Plant cell cultures as model systems to study programmed cell death. In: De Gara L, Locato V. (eds) *Plant Programmed Cell Death. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2018. p. 173—186. Available from: doi: 10.1007/978-1-4939-7668-3_16.

- [25] Gibson SW, Todd CD. Arabidopsis AIR12 influences root development. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015; 21(4):479—489. Available from: doi: 10.1007/s12298-015-0323-1.
- [26] Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2009; 11(4):861—905. Available from: doi: 10.1089/ars.2008.2177.
- [27] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; 59:651—681. Available from: doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- [28] Kolupaev IE, Karpets IV. Reactive oxygen species and stress signaling in plants. *Ukrainian biochemical journal*. 2014; 86(4):18—35. (In Russ).
- [29] Kreslavski VD, Los DA, Allakhverdiev SI, Kuznetsov VV. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012; 59(2):163—178. (In Russ).
- [30] Munns R, James RA, Läuchli A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*. 2006; 57(5):1025—1043. Available from: doi: 10.1093/jxb/erj100.
- [31] Lutsenko EK, Marushko EA, Kononenko NV, Leonova TG. Effects of fusicoccin on the early stages of sorghum growth at high NaCl concentrations. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005; 52(3):378—383. (In Russ).

For citation:

Kononenko N.V., Dilovarova T.A., Kanavsky R.V., Lebedev S.V., Baranova E.N., Fedoreeva L.I. Evaluation of morphological and biochemical resistance parameters to chloride salination in different wheat genotypes. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2019, 14 (1), 18—39. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-18-39.