

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

КАРТИРОВАНИЕ QTL ИНДЕКСОВ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ
ЛИСТЬЕВ ЯРОВОЙ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.)

© 2019 г. Ю. В. Чесноков^{a,1}, Е. В. Канаш^a, Г. В. Мирская^a, Н. В. Кочерина^a,
Д. В. Русаков^a, У. Ловассер^b, А. Бёрнер^b

^aАгрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия

^bЛейбниц-Институт генетики растений и исследования возделываемых культур,
Гатерслебен, Штатдт Зееланд, Германия

Поступила в редакцию 06.02.2018 г.

После доработки 17.04.2018 г.

Принята к публикации 17.04.2018 г.

В работе впервые проведено картирование QTL (quantitative trait loci) индексов диффузного отражения листовой пластинки, определяющих содержание хлорофилла, отношение каротиноидов к хлорофиллу, фотохимическую активность фотосинтетического аппарата, содержание антоцианов, меру рассеяния света листом, а также площади листовой ассимилирующей поверхности и показателей зерновой продуктивности яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), проявляющихся в контролируемых условиях регулируемой агроэкосистемы биополигона в отсутствии и при внесении азотного удобрения. В общей сложности картирован 31 QTL. Для пяти из шести исследованных оптических характеристик активности фотосинтетического аппарата яровой мягкой пшеницы в контролируемых условиях агроэкобиополигона установлена достоверная корреляционная зависимость от внесения азотного удобрения. Исключение составил индекс отражения ближней инфракрасной радиации длиной волны 800 нм, зависящий от структурных особенностей тканей листа. Статистически значимая взаимосвязь между спектральными характеристиками диффузного отражения листовой пластинки, измеренными на стадии “выход в трубку”, и массой 1000 семян отсутствовала. Однако обнаружена достоверная корреляционная связь между числом семян, сформированных в колосе главного побега, и признаками активности фотосинтетического аппарата (индексы отражения, площадь листьев). Результаты дисперсионного, корреляционного и QTL анализов подкрепляют друг друга, что указывает на достоверность влияния уровня азотного питания на проявление изучаемых показателей отражения листовой пластинки у яровой мягкой пшеницы в строго контролируемых условиях агроэкобиополигона. Применение неинвазивных оптических методов позволяет с высокой пропускной способностью оценивать интенсивность фотосинтетического аппарата растений и может быть использовано для эффективного отбора перспективных генотипов пшеницы при селекции по признаку зерновой продуктивности не только в контролируемых условиях агроэкобиополигона, но в перспективе и в полевых условиях.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* — картирование локусов количественных признаков — индексы отражения — площадь листьев — зерновая продуктивность — контролируемые условия регулируемой агроэкосистемы

DOI: 10.1134/S0015330319010044

ВВЕДЕНИЕ

Картирование локусов количественных признаков (QTL, quantitative trait loci) на сегодняшний день стало одним из основных подходов, активно

используемых для установления физиолого-генетического взаимодействия “генотип — среда”. Наследуемость, являющаяся частью общей фенотипической изменчивости, обусловленной генетиче-

Сокращения: ВOU — вегетационные облучательные установки; РИЛ — рекомбинантные инбредные линии; сМ — сантиморганнада; ГТМІ — Международная инициатива картирования Triticeae (от International Triticeae Mapping Initiative); LOD — логарифм шансов (от logarithm of odds); QTL — локус количественных признаков (от Quantitative Trait Loci); ChlRI — индекс отражения хлорофилла (от Chlorophyll Reflection Index); SІPI — независимый от структуры листа индекс пигментов, характеризующий отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов (от Structure Insensitive Pigment Index); PRI — индекс фотохимической активности фотосинтетического аппарата (от Photochemical Activity Index); ARI — индекс отражения, характеризующий содержание антоцианов в листе (от Anthocyanins Reflection Index); R₈₀₀ — показатель интенсивности рассеяния света листом, зависящий от структуры листа; ALAS — площадь ассимилирующей листовой поверхности (от Area of Leaf Assimilating Surface); NSeSp — число зерен в колосе (от Number of Seeds in Spike); TGW — масса 1000 зерен (от Thousand Grain Weight).

¹ Адрес для корреспонденции: Чесноков Юрий Валентинович, 195220 Санкт-Петербург, Гражданский просп., 14, Агрофизический научно-исследовательский институт. Электронная почта: yuv_chesnokov@agrophys.ru

скими различиями, используется в этом подходе для определения того, может ли признак применяться для картирования детерминирующих его генов или локусов хромосом. При этом, если исследователи имеют дело со сложными или количественными признаками, они учитывают тот факт, что несколько локусов могут определять один признак. Первоначальные попытки локализовать QTL основных агрономических свойств позволили установить, что позиции QTL не оставались стабильными от одного эксперимента или выявленного локуса к другому, что указывало на значительный эффект воздействия окружающей среды на проявление признака. В этой связи влияние физиологических компонентов (стрессоров) на генотип играет основную роль при возникновении подобного рода изменчивости [1].

Ранее в ряде работ было описано картирование QTL в полевых, полуконтролируемых и в строго контролируемых (агроэкобиополигон) условиях выращивания растений [2, 3], что позволило показать степень воздействия окружающей среды на физиолого-генетическую реализацию того или иного признака и вычленив лимитирующую направленность действия отдельных ее составляющих. Следует отметить, что агроэкобиополигон, помимо оснащения системами строгого контроля и регуляции микроклимата, а также соответствующим вегетационно-облучательным оборудованием различного типа для круглогодичного интенсивного выращивания растений различной высоты (последнее особенно важно для работы с сельскохозяйственными культурами), позволяет исключить влияние перепадов температуры, неравномерного выпадения осадков и варьирования влажности почвы на локализацию QTL признаков, связанных с морфофизиологическими особенностями, темпами роста и продуктивностью растений. В таких условиях были осуществлены исследования влияния различных режимов температуры, освещенности и уровней азотного питания при строгом контроле и неизменности остальных параметров выращивания [2, 3]. Кроме того, строго контролируемые условия агроэкобиополигона, в отличие от полевых и полуконтролируемых условий выращивания, позволяют эффективно применять специализированную аппаратуру для дистанционной и контактной диагностики морфофизиологического состояния вегетирующих растений. Количественная оценка хозяйственно ценных признаков, таких как продуктивность, качество урожая и толерантность к действию биотических и абиотических стрессоров, проявление которых обусловлено, прежде всего, реализацией физиологических процессов, является наиболее трудоемкой и технически сложной задачей, поскольку требует испытания во многих условиях среды в течение нескольких сезонов. Обычно результаты подобного рода фенотипирования по целевым показателям регистрируются

визуально или вручную, а их получение отнимает много времени и требует существенных материальных затрат.

Современные полуавтоматические методы фенотипирования с повышенной пропускной способностью, такие как неинвазивная визуализация, спектроскопия, анализ фотографических образов и высокопроизводительных вычислений, основаны на получении и обработке изображений объектов исследований. Цветные изображения позволяют оценить биомассу и структуру растений, предоставляют данные о фенологии и состоянии листьев (хлороз, некроз). Изображения, полученные в ближнем инфракрасном диапазоне, предназначены для определения содержания воды в тканях растений и в почве, температуры растительного покрова или листьев растений. Флуоресцентные изображения позволяют оценить физиологическое состояние фотосинтетического аппарата. Все эти современные методы и оборудование для фенотипирования в деталях были описаны и обсуждены ранее в ряде обзоров [4, 5].

Эффективность оценки физиологического статуса растений контактными и дистанционными оптическими методами зависит от их разрешающей способности и возможности в реальном времени не только выявить ухудшение физиологического состояния растений, но и распознать тип стрессора, вызвавшего изменения оптических свойств листьев. При этом следует отметить, что в ответ на действие различных стрессоров (дефицит воды, минерального питания, действие УФ-В радиации и др.) спектральные характеристики радиации, отраженной от поверхности листьев, меняются до появления внешних симптомов угнетения и/или повреждения растений. Уменьшение содержания хлорофилла, накопление антоцианов и флавоноидов, усиление тепловой диссипации и рассеяния радиации внутри тканей листа, а также некоторые другие изменения оптических характеристик листьев являются неспецифической ответной реакцией на стресс, которая свидетельствует об усилении активности процессов "down regulation" фотосистемы II и, как правило, угнетении растений и торможении роста [6]. Вместе с тем проявление различных симптомов угнетения растений в зависимости от типа стрессора может отличаться, т.е. имеют место специфические проявления стрессовой реакции растений в зависимости от типа стрессора [7, 8].

Ранее для разработки и реализации технологий точного земледелия, в частности количественной оценки потребности растений в основных элементах минерального питания (азот, фосфор, калий) и воде, основанных на фенотипировании растений яровой пшеницы, были использованы контактные и дистанционные оптические методы [6, 8, 9]. Было показано, что при действии стрессора, сильно

лимитирующего рост, заключение об угнетении растений и ухудшении их физиологического состояния можно сделать, зарегистрировав уменьшение индекса хлорофилла, заранее определенного для каждой культуры и сорта в оптимальных условиях. Сигналом угнетения растений при неглубоком или мало выраженном стрессовом воздействии, а также на ранних этапах возникновения стресса, когда концентрация хлорофилла не меняется или меняется незначительно, служит увеличение отношения каротиноиды/хлорофилл, усиление тепловой диссипации и рассеяния радиации внутри тканей листа, накопление антоцианов и флавонолов, что свидетельствует о снижении эффективности превращения фотосинтетически активной радиации в фотохимических процессах фотосинтеза и угнетения роста растений [8, 9].

Хотя связь различных индексов отражения с характеризующими активность фотосинтетического аппарата другими физиологическими показателями и обсуждается в ряде публикаций, сведений об их использовании для высокоскоростного фенотипирования и выявления перспективных генотипов с желательными хозяйственно ценными признаками имеется очень мало. До настоящего времени было идентифицировано относительно небольшое количество QTL физиологических признаков [10], еще меньше их было использовано в селекции, и ни один не был клонирован. До сих пор не было осуществлено ни одного исследования, в котором проводились бы одновременная оценка оптических показателей активности фотосинтетического аппарата листьев высших растений и выявление генетических детерминант, взаимосвязанных с эффективностью использования азотных удобрений в контролируемых условиях агроэкобиополигона.

Цель работы — идентификация и картирование QTL индексов оптического отражения листовых пластинок для характеристики физиологического состояния растений линий яровой гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.), проявляющих себя в контролируемых условиях регулируемой агроэкобиополигона при различных уровнях азотного питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве материалов исследований служили рекомбинантные инбредные линии (РИЛ) картирующей популяции ITMI (International Triticeae Mapping Initiative) яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Картирующая популяция ITMI была создана путем опыления яровой мягкой пшеницы сорта Opata 85 пылью синтетического гексаплоида W7984 [2, 3].

Условия выращивания. Выращивание и оценку рекомбинантных инбредных линий ITMI прово-

дили в условиях регулируемой агроэкобиополигона биополигона ФГБНУ “Агрофизический научно-исследовательский институт” (АФИ), как было описано ранее [3]. Изучение 114 линий картирующей популяции ITMI и их родительских форм Opata 85 и синтетического гексаплоида W7984 осуществляли в вегетационных облучательных установках (ВОУ), оснащенных лампами ДНАТ-400. При культивировании растений основные параметры жизнеобеспечения были постоянными. Температурный режим поддерживался на уровне 25–26°C день/20–21°C ночь. Фотопериодический режим включал 16-часовое ежесуточное освещение. Температурный и фотопериодический режимы выращивания растений подбирали по принципу создания условий, нивелирующих различия исследуемых образцов по генетическим системам, определяющим реакцию на данные факторы. Облученность на уровне верхних листьев составляла 50 ± 0.5 Вт/м² ФАР. По мере роста растений облученность ФАР корректировали, изменяя расстояние между светильниками и растениями. Растения выращивали в вегетационных сосудах объемом 2 л. В каждый сосуд высаживали по два растения, из расчета 100 растений на 1 м². Повторность для каждой линии и каждой родительской формы — 2-кратная.

В качестве корнеобитаемой среды использовали дерново-подзолистую легко суглинистую почву с содержанием подвижного фосфора 198 мг/кг (ГОСТ Р 54650-2011), подвижного калия 112 мг/кг (ГОСТ Р 546650-2011), нитратного азота 18.2 мг/кг (ГОСТ 26951-86), аммонийного азота 34.6 мг/кг (ГОСТ 26489-85). В связи с повышенным содержанием в почве подвижного фосфора и калия дополнительного внесения этих макроэлементов не проводили. Опыт включал два варианта, отличающихся по уровню азотного питания. В первом (эксперимент 1, низкий уровень азота) — азотные удобрения во время вегетации растений не вносили, во втором (эксперимент 2, высокий уровень азота) — выполнена 2-кратная подкормка мочевиной (ГОСТ 2081-2010) перед посевом и в фазу онтогенеза “выход в трубку”. Всего в два приема при удобрении вносили 0.321 мг мочевины на 1 кг почвы. На протяжении всего периода вегетации растений влажность почвы поддерживали на оптимальном для пшеницы уровне 70–80% от полной влагоемкости при ежедневном поливе водой. Фенологические наблюдения проводили один раз в двое суток, а во время основных онтогенетических фаз — ежедневно. При завершении вегетационных опытов для каждого индивидуального растения определяли основные показатели продуктивности.

Определение индексов отражения. Спектральные характеристики диффузного отражения листовых пластинок определяли в начале стадии “вы-

Таблица 1. Основные индексы отражения для характеристики физиологического состояния линий пшеницы популяции ITMI и их связь с нетто продуктивностью

Индекс отражения*	Расчетная формула**	Разработчики индексов
ChlRI	$(R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705} - 2R_{445})$	[11]
SIPI	$(R_{800} - R_{445}) / (R_{800} - R_{680})$	[12]
PRI	$(R_{570} - R_{531}) / (R_{570} + R_{531})$	[12]
ARI	$R_{750} (1/R_{550} - 1/R_{700})$	[13]
R_{800}	R_{800}	[11]

Примечание. * Индексы отражения: ChlRI – хлорофилла, SIPI – отношения суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов, PRI – фотохимической активности фотосинтетического аппарата, ARI – антоцианов, интенсивности рассеяния света, обусловленной структурными особенностями листьев – R_{800} . Индексы PRI и ARI были модифицированы: $PRI_{mod} = C_1 - PRI$ и $ARI_{mod} = C_2 - ARI$. Константы $C_1 = 0.5$ и $C_2 = 0.7$ подобраны экспериментально.

** В расчетных формулах индексов: R – диффузное отражение листа, цифры – длина волны, отраженной от листовых пластинок радиации.

ход в трубку”. Спектры отраженной от поверхности листьев радиации регистрировали *in situ* с помощью миниатюрной оптоволоконной спектрометрической системы фирмы “Ocean Optics” (США), которая обеспечивает оптическое разрешение 0.065 нм в диапазоне от 400 до 1100 нм с шагом 0.3 нм. Данная система включает 4 основных элемента: спектрометр HR2000, специальное программное обеспечение SpectraSuite, эталонный вольфрам-галогеновый источник света (LS-1) и оптические аксессуары для проведения измерений. Перед измерениями листьев записывали спектр отражения эталона (WS-1), изготовленного из материала “spectralon”, отражающего более 99% падающей радиации в измеряемом диапазоне длин волн. На экран компьютера выводится спектр диффузного отражения листа в процентах к отражению эталона, который может быть сохранен в виде цифрового файла.

Для регистрации спектров использовали полностью закончившие рост листья, располагая датчик в средней части листовой пластинки, избегая попадания на центральную жилку. В среднем для каждого варианта и каждой линии регистрировали не менее 15 спектров. Записанные спектры в цифровой форме переносили в программу Excel 2007, где рассчитывали средние значения коэффициентов отражения для каждой длины и индексы отражения, характеризующие физиологическое состояние растений. В таблице 1 приведены расчетные формулы индексов отражения [11–13], которые были использованы для оценки физиологического состояния растений.

Для удобства интерпретации полученных данных и получения положительных значений индексов отражения во всех вариантах опыта в расчетные формулы PRI [12] и ARI [13] была введена константная величина C, из которой вычитались

значения перечисленных индексов. Получали модифицированные индексы отражения:

$$PRI_{mod} = C_1 - PRI, \quad (1)$$

$$ARI_{mod} = C_2 - ARI. \quad (2)$$

Величину $C_1 - C_2$ подбирали экспериментально. В данном опыте $C_1 = 0.5$, $C_2 = 0.7$. Описание связи использованных для оценки физиологического состояния растений индексов отражения с нетто продуктивностью и их изменение при действии различных абиотических стрессоров на растения пшеницы [9] и ячменя [6] рассмотрено ранее.

Для определения площади листовой ассимилирующей поверхности (ALAS) с помощью цифровой камеры “Canon G7X” (США) получали фотографии листьев на эталонной пластине белого цвета с известной площадью. По полученным цифровым изображениям в программе Photoshop CS4 Portable определяли долю зеленого листа, экранирующего поверхность эталонной пластины, от площади данной пластины и в дальнейшем переводили полученную величину в cm^2 . Измерения были выполнены на стадии “выход в трубку”.

Статистический анализ. Идентификацию и локализацию QTL на группах сцепления выполняли с помощью программы QGENE, как это было описано ранее [3]. Вычисления проводили, используя математическую формулу, предложенную Haldane [14], с пересчетом расстояний и интеграцией данных в существующую базовую карту для популяции ITMI [15, 16]. При этом использовали только те маркеры, которые соответствовали функции картирования по Kosambi [17], учитывающей интерференцию.

Достоверность взаимосвязи между выявленными локусами и полиморфизмом по тому или иному признаку оценивали на основе порогового

значения отношения правдоподобия логарифма шансов – LOD оценка (logarithm of odds) [18]. Для каждого признака в каждом эксперименте проводился отдельный QTL-анализ и устанавливались степени варьирования признаков (R^2), которые объясняются данным QTL. Значимость каждого LOD была установлена тестом пермутации (1000 повторений). Во внимание принимались только локусы с $\text{LOD} \geq 3.0$ ($p < 0.001$), $2 \leq \text{LOD} < 3$ ($p < 0.01$) и $1.5 \leq \text{LOD} < 2$ ($p < 0.1$) [3].

Для определения характера сопряженности между каждым из признаков и внесением азотного удобрения производили расчет коэффициентов корреляции r [19]. Для комплексной оценки сравниваемых средних значений признаков, определявшихся по разным условиям произрастания, применяли однофакторный дисперсионный анализ с расчетом показателей варьирования и статистической значимости полученных результатов (p). Значение $p < 0.05$ считали приемлемой границей статистической значимости. Результаты, значимые на уровне $p < 0.01$, рассматривали как статистически значимые, а результаты с уровнем $p < 0.001$ – как высокосignификантные. Все значения рассчитывали с использованием компьютерной программы STATISTICA v.12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ результатов оценки характеристик фотосинтетического аппарата: площади листовой ассимилирующей поверхности (ALAS), содержания хлорофилла и антоцианов (индексы ChlRI и ARI_{mod}), отношения суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов (SIPI), фотохимической активности (PRI_{mod}), показателя рассеяния света листом, не зависящего от его структурных особенностей (R_{800}), показал их существенное разнообразие у линий популяции ITMI. Например, различия между минимальным и максимальным значениями ALAS, ChlRI, ARI_{mod} и PRI_{mod} отличались в 5.3, 2.0, 2.1 и 1.4 раза, соответственно. Достоверные отличия между средними значениями индексов отражения (ChlRI, SIPI, PRI_{mod} , ARI_{mod}), площади листовой ассимилирующей поверхности (ALAS) и числа семян, сформированном в колосе у линий популяции ITMI в экспериментах 1 и 2 также отличались существенно ($p = 0.000$). Отличия в экспериментах 1 и 2 между R_{800} и массой 1000 семян были недостоверными ($p > 0.05$). В эксперименте 1, когда растения выращивали при более низком уровне азота, чем в эксперименте 2, не выявлено достоверной взаимосвязи между числом семян в колосе главного побега, массой 1000 семян и всеми индексами отражения, которые были использованы в этой работе. Однако обнаружено, что число семян, сформированных в колосе главного побега, и их абсолютная масса

тесно связаны с площадью листовой ассимилирующей поверхности, которая была сформирована к началу стадии “выход в трубку” (табл. 2). В эксперименте 2 статистически значимая взаимосвязь между спектральными характеристиками диффузного отражения листовой пластинки, измеренными на стадии “выход в трубку”, и массой 1000 семян также отсутствовала. Однако была обнаружена достоверная корреляционная связь между числом семян, сформированных в колосе главного побега, и признаками активности фотосинтетического аппарата (табл. 2).

В результате проведенных исследований было установлено, что все шесть физиологических показателей отражения листовой пластинки, оцененные в двух одновременно проведенных экспериментах (табл. 3), проявляли нестабильность локализации на группах сцепления при идентификации QTL, определяющих их проявление. Так, например, индекс отражения хлорофилла (показатель содержания хлорофилла) в случае эксперимента без внесения азотного удобрения определялся QTL, идентифицированными на хромосомах 6A и 2A. При этом процент фенотипической изменчивости, определяемый выявленными QTL, составлял 21.89 и 8.52, соответственно. В случае же эксперимента с внесением азотного удобрения QTL были идентифицированы на хромосомах 3A и 2B. Процент фенотипической изменчивости при этом составил 12.07 и 14.88, соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что больший процент фенотипической изменчивости во втором эксперименте был выявлен у QTL с меньшим показателем LOD оценки, хотя в обоих экспериментах все аллели идентифицированных QTL были привнесены материнской формой.

Независимый от структуры листа индекс пигментов, характеризующий отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов, при идентификации определяющих его QTL в случае эксперимента без внесения азотного удобрения позволил выявить три локуса хромосом, расположенных на 6A, 4D и 5D, отвечающих за проявление этого физиологического признака. Процент фенотипической изменчивости при этом составил 20.21, 16.45 и 23.38, соответственно. В эксперименте с внесением азотного удобрения данный показатель определялся QTL, расположенными на 4D, 3A, 1A и 5D группах сцепления. Процент фенотипической изменчивости при этом составил 22.65, 22.09, 23.94 и 10.29, соответственно. Во всех случаях в обоих экспериментах аллели, выявленных QTL, были привнесены отцовской формой. Характерно то, что данный показатель определялся QTL, выявленными в обоих экспериментах на хромосомах 4D и 5D. Но если для группы сцепления 5D это был один и тот же локус, то для 4D выявленные локусы располагались на разных участках данной группы сцепления.

Таблица 2. Корреляционный анализ связи между числом семян (NSeSp), сформированных в колосе главного побега, оптическими характеристиками листьев и их площадью

Признак*	Уравнение связи между NSeSp и другими признаками	<i>r</i>	<i>p</i>
Эксперимент 1			
ALAS**	$5.42 + (0.106 \times \text{ALAS})$	0.51	0.001
ChlRI	$29.51 - (14.9 \times \text{ChlRI})$	-0.13	0.219
SIPI	$-64.37 + (75.5 \times \text{SIPI})$	0.09	0.430
PRI _{mod}	$47.79 - (25.9 \times \text{PRI}_{\text{mod}})$	-0.12	0.272
ARI _{mod}	$34.59 - (9.2 \times \text{ARI}_{\text{mod}})$	-0.19	0.077
R ₈₀₀	$20.34 + (0.049 \times \text{R}_{800})$	0.008	0.923
Эксперимент 2			
ALAS**	$27.15 + (0.027 \times \text{ALAS})$	0.31	0.005
ChlRI**	$5.91 + (50.67 \times \text{ChlRI})$	0.35	0.047
SIPI**	$207.19 - (171.7 \times \text{SIPI})$	-0.27	0.044
ARI _{mod} **	$12.03 + (15.47 \times \text{ARI}_{\text{mod}})$	0.31	0.004
PRI _{mod} **	$104.8 - (74.9 \times \text{PRI}_{\text{mod}})$	-0.33	0.002
R ₈₀₀ **	$-2.81 + (0.96 \times \text{R}_{800})$	0.31	0.047

Примечание. * ChlRI – индекс отражения хлорофилла; SIPI – независимый от структуры листа индекс пигментов, характеризующий отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов; PRI_{mod} – индекс фотохимической активности фотосинтетического аппарата; ARI_{mod} – индекс отражения, характеризующий содержание антоцианов в листе; R₈₀₀ – показатель интенсивности рассеяния света листом, зависящий от структуры листа; ALAS – площадь ассимилирующей листовой поверхности; *r* – коэффициент корреляции; *p* – значимость.

** Признаки, статистически значимо связанные с числом семян, формирующихся в колосе главного побега ($P < 0.05$), в отличающихся уровнем азотного питания экспериментах 1 и 2.

QTL индекса фотохимической активности фотосинтетического аппарата в случае эксперимента без внесения азотного удобрения также располагался на хромосоме 5D, а в случае эксперимента с внесением азотного удобрения – на хромосоме 3A. Процент фенотипической изменчивости для QTL на хромосоме 5D составил 24.26, а на хромосоме 3A – 10.61. Следует отметить, что QTL на хромосоме 5D был выявлен в том же локусе, что и один из QTL независимого от структуры листа индекса пигментов, характеризующий отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов, установленный в эксперименте без внесения азотного удобрения. QTL на хромосоме 3A локализован недалеко от QTL, выявленных на хромосоме 3A для показателя индекса отражения хлорофилла и независимого от структуры листа индекса пигментов, характеризующего отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов. Вероятно, эти три QTL составляют единый блок на хромосоме 3A, отвечающий за фотосинтетическую активность.

Для индекса отражения, характеризующего содержание антоцианов в листе, в случае эксперимента без внесения азотного удобрения было

выявлено два QTL – по одному на группах сцепления 4D и 1B, а в случае эксперимента с внесением азотного удобрения – на группах сцепления 3A и 4B. Процент фенотипической изменчивости при этом составил 23.60 и 11.81, а также 10.04 и 9.10, соответственно. Характерно, что QTL на хромосоме 4D по своей локализации совпадал с QTL, выявленным на той же группе сцепления для независимого от структуры листа индекса пигментов, характеризующего отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов, а для QTL на 3A – для индекса фотохимической активности фотосинтетического аппарата.

QTL показателя интенсивности рассеяния света листом, зависящего от структуры листа, в случае эксперимента без внесения азотного удобрения были выявлены на группе сцепления 2A. Процент фенотипической изменчивости при этом составил 21.24. А в случае эксперимента с внесением азотного удобрения QTL были установлены на хромосоме 7B. Процент фенотипической изменчивости составил 22.81. Аллель QTL в первом эксперименте был привнесён материнской формой, а во втором – отцовской.

Таблица 3. Признаки и QTL, выявленные у картирующей популяции ITMI в контролируемых условиях агробио-полигона, без внесения (Эксперимент 1) и при внесении (Эксперимент 2) азотного удобрения

Признак	Символ	Эксперимент** 1			Эксперимент** 2			Всего*
		лока- лизация	LOD	R ²	лока- лизация	LOD	R ²	
Индекс отражения хлорофилла (содержание хлорофилла)	ChlRI	6A (85.7)	3.38	21.89	3A (30.9)	3.15	12.07	2 + 2 + 0
		2A (131.2)	2.05	8.52	2B (222.5)	2.34	14.88	
Независимый от структуры листа индекс пигментов, характеризующий отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов	SIPI	6A (97.9)	3.04	20.21	4D (103.5)	3.85	22.65	4 + 2 + 1
		4D (26.4)	2.07	16.45	3A (52.5)	3.20	22.09	
		5D (129.5)	1.91	23.38	1A (205.7) 5D (130.8)	3.03 2.64	23.94 10.29	
Индекс фотохимической активности фотосинтетического аппарата	PRI _{mod}	5D (129.5)	1.99	24.26	3A (20.9)	2.75	10.61	0 + 1 + 1
Индекс отражения, характеризующий содержание антоцианов в листе	ARI _{mod}	4D (26.4)	3.10	23.60	3A (20.9)	2.60	10.04	1 + 3 + 0
		1B (176.0)	2.81	11.81	4B (79.8)	2.30	9.10	
Показатель интенсивности рассеяния света листом, зависящий от структуры листа	R ₈₀₀	2A (67.2)	3.32	21.24	7B (263.0)	3.09	22.81	2 + 0 + 0
Площадь ассимилирующей листовой поверхности	ALAS	4D (26.4)	2.26	17.79	5A (63.8)	4.39	25.40	1 + 3 + 0
		2B (111.9)	2.26	15.51	2B (167.7)	2.39	9.27	
Число зерен в колосе	NSeSp	2D (300.0)	3.34	18.40	7D (60.6)	3.82	26.86	2 + 2 + 0
		7B (377.0)	2.55	17.35	3A (70.0)	2.24	13.11	
Масса 1000 зерен	TGW	3B (146.5)	3.34	16.27	5D (240.7)	2.68	12.17	1 + 1 + 2
		5D (130.8)	1.83	9.22	3B (245.6)	1.74	9.64	
Всего*			6 + 6 + 3			7 + 8 + 1	13 + 14 + 4 = 31	

Примечание. * Полужирный шрифт – основные QTL (LOD ≥ 3), с подчеркиванием – сильные QTL (3 > LOD ≥ 2); нормальный шрифт – минорные QTL (2 > LOD ≥ 1.5).

** В круглых скобках под номером хромосом, приведенных с соответствующим буквенным обозначением, указано месторасположение QTL на данной хромосоме (*курсивом* – QTL привнесены материнской формой Opata 85, обычным шрифтом – QTL привнесены отцовской формой Synthetic).

R² – процент фенотипической изменчивости, определяемый данным QTL.

Таблица 4. Корреляционная зависимость индексов диффузного отражения листовых пластинок, площади ассимилирующей поверхности и продуктивности растений от уровня азотного питания и сила его влияния на признаки линий пшеницы популяции ITMI

Признаки*	r	t_r	p_r	*** η^2 , %	p_{η^2}
ChlRI**	0.47	7.81	0.000	21.3	0.000
SIPI**	-0.38	-6.01	0.000	17.9	0.000
PRI _{mod} **	-0.45	-7.46	0.000	23.8	0.000
ARI _{mod} **	0.29	4.40	0.000	8.0	0.000
R ₈₀₀	-0.09	-1.34	0.182	0.03	0.841
ALAS**	0.56	9.91	0.000	30.7	0.000
NSeSp**	0.52	8.50	0.000	22.9	0.000
TGW	0.09	1.26	0.210	0.2	0.589

Примечание. * ChlRI – индекс отражения хлорофилла; SIPI – независимый от структуры листа индекс пигментов, характеризующий отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов; PRI_{mod} – индекс фотохимической активности фотосинтетического аппарата; ARI_{mod} – индекс отражения, характеризующий содержание антоцианов в листе; R₈₀₀ – показатель интенсивности рассеяния света листом, зависящий от структуры листа; ALAS – площадь ассимилирующей листовой поверхности; NSeSp – число зерен в колосе; TGW – масса 1000 зерен; r – коэффициент корреляции; t_r – критерий оценки значимости r ; p_r – значимость r ; p_{η^2} – значимость η^2 .

** Признаки с достоверными результатами ($p < 0.05$), т.е. признаки, проявляющие статистически значимое варьирование в зависимости от условий выращивания в эксперименте (без внесения и при внесении азотного удобрения).

*** η^2 – сила факторного влияния (повышенный уровень азотного питания) на анализируемые признаки определена в процентах как отношение соответствующей суммы квадратов отклонений изучаемых оптических и биометрических показателей от их средних значений к общей сумме квадратов.

Показатель площади ассимилирующей листовой поверхности в случае эксперимента без внесения азотного удобрения определялся QTL, локализованными на хромосомах 4D и 2B, а в случае эксперимента с внесением азотного удобрения – на 5A и также 2B. Процент фенотипической изменчивости составил 17.79, 15.51, 25.40 и 9.27, соответственно. Следует заметить, что аллели QTL, идентифицированные на хромосомах 5A и 2B, были привнесены материнской формой, а на хромосоме 4D – отцовской.

Проведенный корреляционный анализ позволил установить, что внесение азотного удобрения значимо влияет на проявление пяти из шести исследованных оптических характеристик активности фотосинтетического аппарата яровой мягкой пшеницы в контролируемых условиях агроэкобиополигона (табл. 4). Исключение составляет R₈₀₀ – показатель интенсивности рассеяния света листом, коэффициент корреляции которого с дозой азота в почве ($r = 0.18$) выходит за границу статистической значимости ($p \geq 0.05$), свидетельствуя о недостоверном влиянии различий в режимах азотного питания в экспериментах 1 и 2 на данный показатель. Поскольку при подсчете корреляционной зависимости данные были расположены в следующем порядке: без азота, с азотом, то если коэффициент корреляции положительный, то это означает, что средние значения признака в опыте с азотом выше, чем без азота. В случае с отрицательной корреляцией – наоборот (табл. 4).

Для признаков индекс отражения хлорофилла (ChlRI), индекс отражения, характеризующий содержание антоцианов в листе (ARI_{mod}), и площадь ассимилирующей листовой поверхности (ALAS) коэффициенты корреляции были средними положительными (0.47, 0.29 и 0.56, соответственно). Для несвязанных со структурой листа признаков SIPI (индекс отношения суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов) и PRI_{mod} (индекс фотохимической активности фотосинтетического аппарата) – средними отрицательными (-0.38 и -0.45, соответственно). Полученные результаты корреляционного анализа практически совпадают с результатами QTL анализа. Исключение составляет R₈₀₀ – изменение этого признака в зависимости от уровня азотного питания не является достоверным по результатам корреляционного анализа. В целом, результаты корреляционного и QTL анализов подтверждают друг друга, что указывает на достоверность эффектов влияния внесения азотного удобрения на проявление изучаемых показателей отражения листовой пластинки у яровой мягкой пшеницы в строго контролируемых условиях агроэкобиополигона.

ОБСУЖДЕНИЕ

Качественные и количественные изменения физиолого-биохимического внутриклеточного состава и внутренней морфофизиологической структуры листьев в неблагоприятных условиях

среды, а также при адаптации растений к условиям произрастания сопровождаются изменением их оптических характеристик. Направленность и степень таких изменений характеризуют физиолого-генетическую устойчивость растений и позволяют изучить механизм ответной реакции на действие стрессора. Регистрация оптических характеристик, в данном случае спектров диффузного отражения листовых пластинок, не требует разрушения тканей листа и может быть выполнена как контактно, так и дистанционно.

В данной работе впервые предпринята попытка оценки влияния внесения азотного удобрения на проявление физиологических индексов отражения листовой пластинки у яровой гексаплоидной пшеницы. В условиях агробиополигона на примере 114 рекомбинантных инбредных линий пшеницы картирующей популяции ITMI *in situ* с помощью неразрушающих тканей листьев оптических контактных и дистанционных методов получены экспериментальные данные об изменчивости признаков, связанных с интенсивностью работы фотосинтетического аппарата: площади листовой ассимилирующей поверхности, индексов хлорофилла и антоцианов, отношения суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов, фотохимической активности, рассеяния света, обусловленного структурными особенностями тканей листа, и признаками семенной продуктивности растений (число семян в колосе и масса 1000 семян). Показано существенное варьирование всех изучаемых признаков в пределах популяции исследуемых линий пшеницы. Отличительной чертой осуществленных экспериментов было то, что они проводились одновременно в строго контролируемых условиях агроэкобиополигона, что позволило исключить влияние каких-либо неконтролируемых факторов внешнего воздействия, например, неравномерности солнечного освещения, выпадения осадков, перепада температуры и ряда других, непосредственно влияющих на проявление изучаемых нами показателей.

Растения пшеницы линий картирующей популяции ITMI существенно отличались как по продуктивности, так и по оптическим характеристикам листьев и площади листовой ассимилирующей поверхности. Обнаружена статистически достоверная ($p < 0.05$) корреляционная связь между числом семян в колосе главного побега и измеряемыми контактно или дистанционно характеристиками листьев. Коэффициенты корреляции между показателями 0.31–0.51 (табл. 2) свидетельствуют о средней степени связи между ними. Следует учитывать, что измерения оптических характеристик листьев и площади листовой ассимилирующей поверхности были выполнены в начале стадии “выход в трубку” сразу по завершении стадии “кущение”, число зерен в конце вегетации после завершения налива зерна (продолжи-

тельность периода “выход в трубку – созревание” у линий популяции ITMI в эксперименте 1 варьировала от 30 до 56 дней). Можно сделать вывод, что применение неинвазивных оптических методов на ранних этапах онтогенеза позволяет сделать предварительный прогноз продуктивности без уничтожения или повреждения растений. Чтобы увеличить точность прогноза продуктивности, по-видимому, необходимо выполнить измерения также и в более поздние сроки вегетации, например, на стадии колошения растений.

Ранее мы установили, что возникновение окислительного стресса под влиянием различных неблагоприятных факторов внешней среды, сопровождающееся снижением эффективности фотохимических процессов фотосинтеза и, как следствие, торможением роста, может быть обнаружено до появления внешних симптомов угнетения растений по изменению ряда индексов отражения (хлорофилла, каротиноидов, антоцианов, флавоноидов) и других оптических показателей, характеризующих активность процессов “down regulation” фотосистемы II [6, 9]. Данные изменения регулируют спектральный состав, количество проникающей в лист солнечной радиации и эффективность фотохимических процессов фотосинтеза, запуская процесс адаптации растений к изменившимся условиям среды обитания. Дефицит минерального питания сопровождается увеличением количества отраженной от листьев радиации, наиболее заметным в зеленом и ближнем ИК диапазоне.

Основным симптомом азотного голодания растений известен очень хорошо. Это хлороз листьев, в первую очередь нижних ярусов, обусловленный потерей хлорофилла. При проведении данного исследования регистрировали спектры отраженной радиации у полностью закончивших рост листьев верхних ярусов, сформированных к началу стадии “выход в трубку”, и, тем не менее, при более низком уровне азотного питания ChlRI был достоверно меньшим, о чем свидетельствует также наличие положительной корреляционной зависимости между ChlRI и уровнем азотного питания (табл. 4). Индекс, использованный в этой работе, разработанный и апробированный при определении содержания хлорофилла у растений различных видов, отличающихся структурными особенностями листьев [11], не требует утомительной калибровки для каждого вида и в настоящее время широко применяется в качестве критерия содержания хлорофилла как при контактной, так и дистанционной диагностике состояния растений и посевов, в особенности для раннего выявления дефицита азота, с целью принятия решений о необходимости внесения удобрений [20].

Как и следовало ожидать, низкий уровень азотного питания стал причиной существенной потери

урожая зерна, главным образом из-за формирования меньшего числа зерен в колосе. Мы наблюдали наличие высоко статистически значимой связи между интенсивностью фотосинтетического аппарата, сформированного к началу стадии “выход в трубку”, которую оценивали по величине площади сформированный ассимилирующей поверхности листьев и содержанием в них хлорофилла, и числом семян в колосе главного побега (табл. 2). В отличие от этого, статистически значимой взаимосвязи между массой 1000 семян и оптическими характеристиками листьев, измеренными на стадии “выход в трубку”, в экспериментах 1 и 2 не обнаружено.

Помимо хлорофиллов к универсальным и основным пигментам ассимиляционных тканей относятся каротиноиды, которые так же, как хлорофилл, поставляют энергию фотосинтетической системе, являясь неотъемлемой частью светособирающих комплексов пластид. Перекрытие спектров поглощения каротиноидов и хлорофилла в синей области затрудняет их количественную оценку по спектральным характеристикам отраженной от листа радиации в данном диапазоне. В связи с этим мы пользовались индексом, характеризующим отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов — SIPI. Как правило, SIPI при стрессе возрастает вследствие потери хлорофилла и/или накопления каротиноидов [12]. Полученные результаты — уменьшение SIPI при увеличении ChlRI (отрицательный и положительный коэффициенты корреляции с уровнем азотного питания, табл. 4), которое мы наблюдали в эксперименте 2, — не позволяют сделать однозначный вывод об изменении суммы каротиноидов в листьях в ответ на внесение дополнительного азота в почву, поскольку наблюдаемое существенное возрастание концентрации хлорофилла должно неизбежно привести к уменьшению SIPI.

Фотохимический индекс отражения (PRI) был разработан для оценки скорости изменения относительного уровня пигментов ксантофиллового цикла, который является активным регулятором светового потока в пигмент-белковых комплексах [12]. PRI обеспечивает быструю, не требующую разрушения тканей листа, диагностику связанных с фотосинтезом физиологических свойств листьев и растительного покрова многих видов [21, 22]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи между PRI и показателем фотохимической активности фотосистемы II — $\Delta F/F_m'$, определяемым с помощью флуоресцентного анализа [22]. На примере растений *Vitis vinifera* L., при сравнении изменений параметров флуоресценции и PRI было показано, что PRI связан в большей степени с нефотохимическим, чем с фотохимическим тушением [23].

Изменение PRI во время вегетации растений может быть результатом сочетания работы ксантофиллового цикла и изменения общего пула хлорофиллов и каротиноидов, который формируется в ответ на долговременную акклиматизацию растений к условиям их обитания [24]. Результаты исследования линий яровой пшеницы популяции ITMI выявили наличие тесной отрицательной связи между числом сформированных в колосе семян и величиной PRI_{mod} листьев верхних ярусов, измеренных на стадии “выход в трубку” лишь в эксперименте 2, когда уровень азотного питания был наиболее высоким.

Величина индексов отражения SIPI и PRI не зависит от структуры листа, а определяется содержанием каротиноидов и активностью их превращения в ксантофилловом цикле и поэтому может служить мерой эффективности использования энергии фотосинтетического света и превращения ее в химическую в фотосистеме II [12]. В отличие от SIPI и PRI, показатель рассеяния света R₈₀₀ зависит от внутренней структуры листа, границ раздела воздух — вода, размеров клеток и органелл [25] и, прежде всего, от величины межклеточного воздушного пространства и отношения площади поверхности мезофилла к площади листа [26]. Данный показатель при внесении азота менялся незначительно, различия величины этого показателя в экспериментах 1 и 2 были статистически недостоверными. Это свидетельствует, что внесение дополнительного азота не вызвало существенных изменений структуры тканей листа. Однако связь R₈₀₀ с числом семян, сформированном в колосе опытных растений, была статистически значимой ($p \leq 0.047$).

Помимо содержания хлорофиллов и каротиноидов, спектральные характеристики отражения листьев определяются и содержанием фенольных соединений, например, антоцианов, присутствие которых изменяет как качество, так и количество света, попадающего на хлоропласты. Антоцианы накапливаются в листьях растений в ответ на действие субоптимальных температур [27], недостатка элементов минерального питания [28, 29] и других неблагоприятных факторов среды, проявляя свойства антиоксидантов [30].

Картирование локусов хромосом, вовлеченных в проявление изучаемых физиологических признаков отражения листовой пластинки, позволило установить не только группы сцепления, на которых расположены идентифицированные QTL, но и то, какой формой — отцовской или материнской — был привнесен тот или иной аллель, а также процент фенотипической изменчивости, определяемый выявленным и картированным QTL. Необходимо отметить, что все изученные физиологические показатели отражения листовой пластинки, как и следовало ожидать, прояви-

ли нестабильность в их локализации на группах сцепления в зависимости от того вносилось или нет азотное удобрение. По данным QTL анализа проявление всех изученных нами оптических показателей зависело от внесения азотного удобрения, что указывает на физиологическую роль привнесенного минерального азота и его влияние на показатели отражения листовой пластинки яровой гексаплоидной пшеницы.

Полученные результаты свидетельствуют, что примененные неинвазивные оптические методы позволяют оценить интенсивность фотосинтетического аппарата растений и могут быть использованы для отбора перспективных генотипов пшеницы. Данные методы применимы и в полевых условиях, но наиболее эффективно они могут быть использованы в условиях регулируемого агроэкобиополигона, обеспечивая высокую пропускную способность при анализе фенотипических признаков, исследовании взаимосвязи генотипа и фенотипа, а также их изменчивости при реализации эволюционно-адаптивного и физиолого-генетического взаимодействия “генотип – среда”.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00311а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чесноков Ю.В. Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях. СПб: АФИ. 2013. 116 с.
2. Чесноков Ю.В., Мирская Г.В., Канах Е.В., Кочерина Н.В., Ловассер У., Бёрнер А. Картирование QTL у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в контролируемых условиях агроэкобиополигона // Физиология растений. 2017. Т. 64. С. 55–68.
3. Чесноков Ю.В., Мирская Г.В., Канах Е.В., Кочерина Н.В., Русаков Д.В., Ловассер У., Бёрнер А. Идентификация и картирование QTL у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в контролируемых условиях агроэкобиополигона в отсутствии и при внесении азотного удобрения // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 80–93.
4. Furbank R.T., Tester M. Phenomics technologies to relieve the phenotyping bottleneck // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 635–644.
5. Walter A., Studer B., Kolliker R. Advanced phenotyping offers opportunities for improved breeding of forage and turf species // Ann. Bot. 2012. V. 110. P. 1271–1279.
6. Kanash E.V., Panova G.G., Blokhina S.Yu. Optical criteria for assessment of efficiency and adaptogenic characteristics of biologically active preparations // Acta Horticulturae. 2013. V. 1009. P. 37–44.
7. Graeff S., Steffens D., Schubert S. Use of reflectance measurements for the early detection of N, P, Mg, and Fe deficiencies in *Zea mays* L. // Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 2001. V. 164. P. 445–450.
8. Yakushev V., Kanash E., Rusakov D., Blokhina S. Specific and non-specific changes in optical characteristics of spring wheat leaves under nitrogen and water deficiency // Advances in Animal Biosciences. 2017. V. 8. № 2. P. 229–232. doi 10.1017/S204047001700053X
9. Kanash E.V., Osipov Yu.A. Optical signals of oxidative stress in crops physiological state diagnostics // Precision agriculture 2009. Papers presented at the 7th European Conference on Precision Agriculture. Wageningen, the Netherlands 6–8 July 2009. Wageningen Academic Publishers, Netherlands. P. 81–89.
10. Reynolds M., Tuberosa R. Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. Curr. Opin. Plant Biol. 2008. V. 11. P. 171–179.
11. Sims D.A., Gamon J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages // Remote Sensing of Environment. 2002. V. 81. P. 337–354.
12. Peñuelas J., Barret F., Fitella I. Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll *a* ratio from leaf spectral reflectance // Photosynthetica. 1995. V. 31. P. 221–230.
13. Мерзляк М.Н., Гительсон А.А., Чивкунова О.Б., Соловченко А.Е., Погосян С.И. Использование спектроскопии отражения в анализе пигментов высших растений // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 785–792.
14. Haldane J.B.S. The recombination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linkage factors // J. Genet. 1919. V. 8. P. 299–309.
15. Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // Genomics. 1987. V. 1. P. 174–181.
16. Ganai M.W., Roder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // Genomics Assisted Crop Improvement: Genomics Applications in Crops / Eds Varshney R.K., Tuberosa R. Springer, 2007. V. 2. P. 1–24.
17. Kosambi D.D. The estimation of map distances from recombination values // Ann. Eugen. 1944. V. 12. P. 172–175.
18. Kocherina N.V., Artemyeva A.M., Chesnokov Yu.V. Use of LOD-score technology in mapping quantitative trait loci in plants // Russian Agricultural Sciences. 2011. V. 37. P. 201–204.
19. Лакун Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 352 с.
20. Babar M.A., Reynolds M.P., van Ginkel M., Klatt A.R., Raun W.R., Stone M.L. Spectral reflectance to estimate genetic variation for in-season biomass, leaf chlorophyll, and canopy temperature in wheat // Crop Science. 2006. V. 46. P. 1046–1057.
21. Peñuelas J., Munné-Bosch S., Llusià J., Filella I. Leaf reflectance and photo- and antioxidant protection in field-grown summer-stressed *Phillyrea angustifolia*. Optical signals of oxidative stress? // New Phytologist. 2004. V. 162. P. 115–124. doi 10.1111/j.1469-8137.2004.01007.x

22. *Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S.* The photochemical reflectance index: An optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels // *Oecologia*. 1997. V. 112. P. 492–501.
23. *Evain S., Flexas J., Moya I.* A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence // *Remote Sensing of Environment*. 2004. V. 91. P. 175–185. doi 10.1016/j.rse.2004.03.012
24. *Gitelson A.A., Gamon J.A., Solovchenko A.* Multiple drivers of seasonal change in PRI: Implications for photosynthesis 1. Leaf level // *Remote Sensing of Environment*. 2017. V. 191. P. 110–116.
25. *Grant L.* Diffuse and specular characteristics of leaf reflectance // *Remote Sensing of Environment*. 1987. V. 22. P. 309–322.
26. *Slaton M.R., Hunt E.R., Smith W.K.* Estimating near-infrared leaf reflectance from structural characteristics // *American Journal of Botany*. 2001. V. 88. P. 278–284.
27. *Leng P., Itamura H., Yamamura H., Deng X.M.* Anthocyanin accumulation in apple and peach shoots during cold acclimation // *Scientia Horticulture*. 2000. V. 83. P. 43–50.
28. *Cobbina J., Miller M.H.* Purpling in maize hybrids as influenced by temperature and soil phosphorus // *Agronomy Journal*. 1987. V. 79. P. 576–582.
29. *Nozzolillo C., Isabelle P., Das G.* Seasonal changes in the phenolic constituents of jack pine seedling (*Pinus banksiana*) // *Canadian Journal of Botany*. 1990. V. 68. P. 2010–2017.
30. *Gould K.S., Mckelvie J., Markham K.R.* Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury // *Plant, Cell and Environment*. 2002. V. 25. P. 1261–1269.