

С.Б. ДАУЛЕТБАЕВА, К.К. ШУЛЕМБАЕВА

СОЗДАНИЕ ПОЧТИ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) СОРТА КАЗАХСТАНСКАЯ 126. МОРФОЛОГИЯ И ПРОДУКТИВНОСТЬ

*Кафедра генетики и молекулярной биологии
Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби
Алматы, Казахстан. e-mail: dsaniya@mail.ru; Kulzia@kazsu.kz*

На основе 10 изогенных линий сорта Саратовская 29 созданы аналоги сорта Казахстанская 126 по определенным морфологически маркированным (Hg, Rg, C, Pp, Eg1, Hp, B, Rht3, Pc, W, Pan, Bg) признакам. Анализ количественных признаков 9-ти изогенных линий показал увеличение показателей продуктивности у линий с генами Hg; Rg, Bg, Pc. Изучение гомозиготности исследуемых линий электрофоретическим методом, выявило различие спектров запасных белков у линий с генами Pp, Eg1; Hp Hg; Rg, C. При цитологическом изучении изогенных линий с генами Eg1; Hp и Pp наблюдали нарушения процесса мейоза, сопровождающийся пикнозом хромосом, унивалентами и изредка появлением триад и пентад. Подобные нарушения хромосом можно объяснить недостаточной совместимостью чужеродных генов ржи (Hp), канадской линии (Pp) и *T. polonicum* (Eg1) с геномом сорта Казахстанская 126.

Успех исследований по частной генетике растений в значительной степени зависит от правильного выбора исходного материала и от наличия генетических коллекций. Среди них важное место занимают комплекты изогенных линий пшеницы. Изогенные линии являются удобным объектом для генетических и селекционных исследований, которые создаются на основе единого генотипа (сорта), и отличаются от него по одному гену или небольшому числу тесно сцепленных генов. Главным достоинством изогенных линий является высокое генотипическое сходство

их между собой и с линией контрольного генотипа. Генетическое единообразие изогенных линий позволяет определить вклад маркирующего признака в формирование урожая сельскохозяйственных культур [1].

Известно, что некоторые морфологические маркеры пшеницы положительно коррелируют с полезными для селекции признаками. Морфологически маркированные линии могут служить тестом при отборе ценных исходных форм пшеницы для селекции, что намного ускорит создание сортов [2].

Созданные изогенные линии по определенным признакам могут быть потенциально новыми исходными формами для использования их в практической селекции. Так, наличие по сорту-реципиенту анеуплоидных линий позволит провести замещение хромосом морфологически маркированных изогенных линий соответствующими хромосомами моносомных линий, предоставив уникальный генетический материал в виде морфологически маркированных моносомных линий [2].

Проводимая нами программа по созданию маркированных изогенных линий предусматривает введение маркерных генов из вновь созданных изогенных линий в соответствующие моносомные линии сорта Казахстанская 126. При этом цитологический анализ моносомных растений можно свести к минимуму и идентифицировать их по фенотипическим признакам, а замещение хромосом моносомных линий сорта Казахстанская 126 соответствующими маркированными хромосомами почти изогенных аналогов этого же сорта намного ускоряет процесс конструирования нового генотипа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве рекуррентного родителя была использована чистая линия сорта Казахстанская 126 – ярового сорта мягкой пшеницы, серия моносомных линий этого сорта, а также изогенные линии сорта Саратовская 29 любезно переданные нам сотрудниками лаборатории генетики СО РАН ИЦиГ. Первоисточники маркерных генов и их хромосомная локализация приведены в ниже следующей таблице 1.

Для создания изогенных линий использовали метод возвратного скрещивания, а межсортовое замещение хромосом проводили по методу Е. Р. Сирса [3]. Получение изогенных линий по сорту Казахстанская 126 по определенным маркерным признакам представлено в ниже следующей схеме.

а) введение гена-маркера на примере признака безвосковости (W)

	21W	21W
21w	21'' Ww (безвосковость)	21'' Ww (безвосковость)
21w	21'' Ww (безвосковость)	21'' Ww (безвосковость)

б) проведение первого возвратного скрещивания с гибридом F₁

BC2 – BC8

	21W	21W
21w	21'' Ww (безвосковость)	21'' Ww (восковость)
21w	21'' Ww (безвосковость)	21'' Ww (восковость)

Последующее введение гена-маркера проводится с использованием потомства очередных беккроссов для возвратного скрещивания с реципиентным сортом. При этом отбираются растения с сильно выраженным эффектом гена – W.

в) Самоопыление потомства гибридов BC₆ или BC₈ с целью отбора создаваемого аналога с двойной дозой маркерного признака при гетерозиготности.

Таблица 1. Маркерные признаки и хромосомная локализация генов, используемые при создании почти изогенных линий сорта Казахстанская 126

Маркерные гены	Признак	Хромосомная локализация	Доноры гена
Hg	Опушенный колос	1AS	Пиротрикс 28
Bg	Черный колос	1AS	Новосибирская 67
C	Скверхедный колос	2D	АНК-15
Pp	Пурпурное зерно	7B	Н-67 (Л-4290) purple
Egl	Длинная колосковая чешуя	5A	Новосибирская 67
Rht3	Карликовость	4A	Киргизский карлик
Pe	Пурпурный стебель	7BS	CS (Норе 7B)
W	Безвосковость	2B	Новосибирская 67
Rg	Красный колос	1BS	АНК – 10 А
Нр	Опушение у основания колоса	4B	S-6 S 615 11/CS
B1	Короткий килевой зубец	5A	АНК –13 А
Pan	Антоциановая окраска ушек	2D?	cv. Ульяновка

	21W	21W
21w	21'' Ww (отбирается)	21'' Ww (бракуется)
1w	21'' Ww (бракуется)	21'' Ww (бракуется)

Для восстановления генотипа рекуррентного сорта необходимо провести не меньше восьми насыщающих скрещиваний. При создании морфологически маркированных изогенных линий сорта Казахстанская 126 программа беккроссов по некоторым признакам доведена до восьмого беккросса, так как при уровне насыщения BC_8 теоретическая полнота замещения ядерного генома составляет 98%, а при BC_9 – 99,9% [1].

При создании константного генетического материала, возникает необходимость проверки генотипа на полноту насыщения генома рекуррентного сорта. Для этого использовали методы анализирующего скрещивания и биохимический анализ – идентификация спектров запасных белков пшеницы в сравнении с контрольным сортом. Электрофорез проводили по методу Laemmli [4], в модификации К.М. Булатовой [5] в лаборатории биохимии НЦПРиЗ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время на основе проявления генов Hg, Rg, C, Pp, Eg1, Hp, B, Rht3, Pc, W, Pan, Bg созданы десять морфологически маркированных изогенных линий по сорту яровой мягкой пшеницы Казахстанская 126. Все исследуемые линии отчетливо демонстрируют фенотипическое проявление признаков донора в генотипической среде сорта Казахстанской 126.

В ходе выполнения работы особое внимание уделялось анализу количественных признаков изогенных линий. При этом был проведен анализ по четырем показателям элементов продуктивности, характеризующим структуру колоса (длина колоса, плотность колоса, число зерен, масса зерна с колоса), по двум показателям роста (длина стебля, длина верхнего междоузлия), также определение массы 1000 зерен и число продуктивных побегов. Результаты анализа, приведенные в таблице 2, наглядно отображают разницу значений средних величин по элементам продуктивности. Как видно из таблицы 2, средние значения показателей продуктивности у исследуемых линий по некоторым признакам отличались

по сравнению с контрольным сортом. Существенное различие, наблюдали по показателям кустиности между сортом Казахстанской 126 и маркированным линиям, положительно характеризующее созданные изогенные линии. Так, среди изученных девяти изогенных линий возрастание кущения, составляющего в среднем $10,0 \pm 1,6$ в отличие от контроля с показателем $4,0 \pm 0,2$, наблюдалось у аналога сорта с генами Eg1; Hp, по всем другим изогенным линиям этот показатель также был выше уровня контроля. Увеличение густоты стеблестоя соответственно достоверно повышает число продуктивных стеблей, одного из элементов повышения урожайности.

Главными компонентами, определяющими формирование урожая, являются продуктивность и величина главного колоса. По количеству зерен главного колоса достоверно отличились линии с удлинением колосковой чешуи, опущением колосоножки – Eg1; Hp ($61,0 \pm 1,5$) и карликового аналога – Rht ($67,3 \pm 2,5$) по сравнению с контрольным сортом Казахстанская 126 ($49,8 \pm 0,7$). Остальные аналоги по данному параметру были на уровне контроля. Данные, характеризующие длину главного колоса у исследуемых линий также, были на уровне контроля, но наряду с этим отмечено возрастание показателей по массе зерен главного колоса.

Изучая немаловажный для селекции признак модификации фенотипа – длину соломины, определяющей высоту растения, подтвердилось проявление карликовости у линии с донорским геном Rht, отвечающим за низкорослость. По сравнению с контролем, составляющим в среднем 97,77 см. высота растения опытного образца понизилась до 58,6 см., что указывает на эффективное проявление маркерного гена. Введенный в генотип сорта Казахстанская 126 ген Rht3 проявил положительное влияние на признаки кущения, число колосков и зерен в главном колосе, но привел к снижению массы 1000 зерен, что объясняется плейотропным действием этого гена.

Одним из важных показателей продуктивности является масса 1000 зерен. Из полученных данных видно, что у линий с морфологическими маркерами Hg; Rg ($45,70$ г.), Bg ($49,54$ г.) и Pc ($46,02$ г.) масса 1000 зерен значительно выше по сравнению с контролем ($43,51$ г.) и другими образцами. Известно, что вышеупомянутые гены ответственны за проявление пигмента у пшени-

Таблица 2. Характеристика морфологически маркированных изогенных линий пшеницы по элементам структуры урожая

№	Количественные признаки								
	Исследуемые линии	Длина стебля, см.	Длина главного колоса, см.	Кустистость, шт.	Длина последнего междоузлия, см.	Количество колосков главного колоса, шт.	Количество зерен главного колоса, шт.	Масса зерна главного колоса, г.	Масса 1000 зерен, г.
1	К- 126	97,3 ± 0,2	12,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2	49,9 ± 0,2	18,5 ± 0,5	49,8 ± 0,7	2,3 ± 0,1	43,51
2	W	91,0 ± 1,9	12,7 ± 0,2	9,2 ± 2,0	46,4 ± 0,9	18,3 ± 0,4	53,4 ± 1,4	2,5 ± 0,2	41,77
3	Eg 1; Hp	99,5 ± 1,3	16,3 ± 0,02	10,0 ± 1,6	44,3 ± 0,5	18,1 ± 0,2	61,0 ± 1,5	2,6 ± 0,1	37,73
4	Hg; Rg	96,9 ± 1,3	12,7 ± 0,4	9,6 ± 1,1	51,6 ± 1,5	19,4 ± 0,5	61,6 ± 1,6	2,5 ± 0,2	45,70
5	Bg	99,1 ± 2,0	12,5 ± 0,2	6,8 ± 1,2	53,9 ± 1,1	19,1 ± 0,2	58,2 ± 1,9	2,9 ± 0,1	49,54
6	B	97,6 ± 1,3	13,0 ± 0,1	9,0 ± 1,5	50,8 ± 1,4	18,3 ± 0,4	54,5 ± 3,4	2,8 ± 0,1	42,86
7	Pp	94,4 ± 1,5	11,8 ± 0,2	9,8 ± 1,2	55,2 ± 1,4	18 ± 0,2	57,6 ± 2,5	2,7 ± 0,1	43,37
8	Pc	98,2 ± 1,5	11,6 ± 0,3	9,9 ± 1,2	53,2 ± 0,5	19,2 ± 0,4	58,8 ± 1,8	2,7 ± 0,1	46,02
9	C	100,1 ± 2,0	8,8 ± 0,1	9,0 ± 0,6	42,8 ± 0,9	19,9 ± 0,4	58,0 ± 2,1	2,8 ± 0,1	43,41
10	Rht	58,6 ± 4,4	13,0 ± 0,3	8,4 ± 0,2	30,5 ± 2,5	20,7 ± 0,2	67,3 ± 2,5	2,8 ± 0,6	39,32

цы, так, Rg, Vg отвечают за красную и черную окраску колоса, а ген Pc определяет антоциановую окраску соломины. Увеличение показателей элементов продуктивности в данном случае, возможно, отражает вклад данного признака в урожайность и дает основание использовать другие доноры маркерных генов с подобным фенотипическим проявлением.

Из литературных источников известно, что антоцианы – пигменты клеточного сока растительной клетки, класса флавоноидов, представляют собой наиболее важную после хлорофилла группу окрашенных веществ высших растений. Установлено, что у антоцианосодержащих растений процесс фотосинтеза протекает интенсивнее, чем у растений, не образующих данного пигмента, а также, что антоцианы участвуют в предохранении растений от пониженных температур [6]. В этом отношении большой интерес представляет линия с маркерным геном P_{an} – антоциановая окраска ушек.

Самый низкий показатель по массе 1000 зерен (37, 73 г.) отмечен у линии Eg 1; H_p, хотя продуктивность главного колоса была выше показателей контроля. Причиной такого контраста, возможно, явилось шуплозерность маркированной изогенной линии, что может указывать на недостаток метаболитов или их слабый отток из вегетативных органов растения в формирующееся зерно, а также возможным отрицательным действием маркерного гена.

Необходимость изучения гомозиготности морфологически маркированных изогенных линий на селекционном, генетическом и биохимическом уровнях была частично реализована в работе по проверке на идентичность спектров запасных белков пшеницы.

Сорта пшеницы различаются между собой по содержанию белка и качеству клейковины. Клейковина в основном состоит из белков – глиадины и глютеина, а качество клейковины является сортовым признаком [7].

Глиадин специфический запасной белок эндосперма пшеницы, используется в данном случае для определения подлинности сорта, отбора и регистрации гомозигот из гибридных популяций. Глиадиновые компоненты идентифицированы путем измерения относительной подвижности, составления белковых формул по эталонному спектру [8].

Сравнение компонентного состава глиадинов сорта Казахстанская 126 и 9 аналогов показало изменения электрофоретических спектров у линий с генами P_p – фиолетовая окраска зерна, C – скверхедный колос, H_p; Rg – опушенный красный колос. Так у линии с геном P_p, наблюдение спектров глиадины, показало сильное проявление двух полос в зоне 3 ω, характерные геному сорта Саратовская 29, присутствие следов донорского компонента в зоне 3 γ, слабое проявление спектров зоны 5 β также сходное с изогенной линией сорта Саратовской 29. Изогенным линиям с генами H_p; Rg и C характерно проявление одной полосы спектра в зоне 3 ω, соответствующей генотипу донорского сорта.

Изменение спектров запасных белков, возможно, свидетельствует о недостаточном восстановлении генома рекуррентного сорта. Следовательно, для насыщения генотипа реципиента необходимо продолжить очередное поглотительное скрещивание, поскольку по некоторым линиям проведено семь беккроссов.

Глютеин – агрегированный высокомолекулярный проламин может служить дополнительным критерием в идентификации сортов, линий, а также генетическим маркером качества при отборе сортов и биотипов в селекции на хлебопекарные свойства. Для идентификации глютеина и кодирующих их локусов используют номенклатуру Payne и Lawrence [8]. В соответствии с принятой номенклатурой, гены, отвечающие за синтез глютеинов, записывают как Glu-A1, Glu-B1 и Glu-D1. По данным исследования глютеина изогенных линий подтвердился результат гетерогенности линии Eg 1; H_p. Так у линий W, H_g; Rg, Vg, B, P_p, P_c, C, Rht блоки Glu-A1, Glu-B1 и Glu-D1 составляют 2*/7* + 9/ 2+10 соответственно, что характеризует геном сорта Казахстанская 126, а в исследуемой линии с генами Eg 1; H_p – 2*/7 + 9/ 2+10 наблюдали изменение по компонентному составу в локусе Glu-B1, соответствующей геному сорта Саратовская 29.

Дополнительно для установления гомозиготности создаваемых маркерных изогенных линий необходимым условием является цитологический анализ, который служит тестом восстановления создаваемого генотипа [9]. Растения с сильно выраженным маркированным признаком, кроме P_p и Eg 1; H_p имели нормальную 21 бивалентную конфигурацию хромосом менее открытого и

более закрытого типа. Особо следует остановиться на анализе результатов изучения гибридного потомства BC_6 - BC_8 с опущением колосоножки и пурпурным зерном. Во всех МКП у растений с выше названными признаками обнаружили не большое количество унивалентов, явления пикноза, а в тетрадах – изредка образование триад. Нарушения процесса мейоза у изогенных линий, видимо, зависит от недостаточной совместимости чужеродного гена ржи Hr и канадской линии с генами Rr с геномом сорта местной селекции. Поэтому в дальнейшем, в ходе повторных поглотительных скрещиваний необходимо детальное наблюдение протекания процесса мейоза.

Таким образом, изогенные линии гомозиготные по доминантным морфологическим признакам могут быть использованы как исходный материал в целях гибридизации, а также для замещения маркированных хромосом донора на соответствующие хромосомы моносомных линий сорта Казахстанская 126. Использование морфологически маркированных моносомных линий позволит отобрать моносомы по фенотипу в потомстве гибридов, что значительно сократит трудоемкий процесс цитологических исследований и ускорит процесс межсортного замещения хромосом. Для дальнейшего развития исследований связанных с разработкой более точных и простых приемов определения вклада маркерного гена в урожайность и качество зерна, важным является поиск генов, которые могут быть использованы в качестве фенотипических маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваль С. Ф., Коваль В.С., Шаманин В.П. Изогенные линии пшеницы. Омск, 2001. С. 152. Монография.
2. Tsujimoto H. Production of near-isogenic lines and marked monosomic lines in common wheat (*Triticum aestivum*) cv. Chinese Spring. *J Hered.* 2001 May-Jun; 92 (3): 254-9
3. Бриггс Ф., Ноулз П. Научные основы селекции растений // М., Колос, 1972-С. 285-301.
4. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* 1970. Т. 4. V.277. № 4. P.178-189.
5. Булатова К.М. Изучение компонентного состава глютеина пшеницы // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1985. № 5. С.37-39.
6. Богданова Е.Д. Морфогенетическая изменчивость пшеницы, индуцированная никотиновой кислотой. Алма-ата, 1984.
7. Перуанский Ю. В., Абуғалиева А. И., Савин В. Н. Методы биохимической оценки коллекционного и селекционного материала. Алматы. 1996. Стр. 66-80.
8. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. Санкт-Петербург, 2000. Под ред. Академика РАСХИ В.Г. Конарева. С. 21-37.
9. Цитогенетика пшеницы и ее гибридов под редакцией П.М. Жуковского и проф. В.В. Хвостовой. М.: Наука, 1971. С. 278.

Резюме

Қайыра шағылыстыру әдісімен жаздық жұмсақ бидайдың (*Triticum aestivum* L.) Қазақстанская 126 сортынан он маркерлі гендерінен Hg , Bg , C , Rr , $Eg1$, Hr , B , $Rht3$, Pc , W , Pan изогенді линиялар шығарылды. Hg , Rg , Bg , Pc гендерінен изогенді туындылардың басқаларына қарағанда өнімділік элементтері жоғары болды. Морфологиялық маркерленген изогенді линиялардың гомозиготтылығы биохимиялық және цитологиялық әдістер арқылы тексерілді.

Summary

Ten near-isogenic lines carrying marker Hg , Bg , C , Rr , $Eg1$, Hr , B , $Rht3$, Pc , W , Pan genes were obtained by recurrent backcross breeding using common wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Kazakhstanskaya 126 as genetic background. The analysis of quantitative features showed the increase of productivity near-isogenic lines with Hg , Rg , Bg , Pc genes compared with the cv. Kazakhstanskaya 126. Homozygosity of morphologically marked near-isogenic lines was analyzed by biochemical and cytological methods.