

## АННОТАЦИЯ

к диссертации Доктырбай Гулины на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D070100-Биотехнология»  
на тему: «Создание новых продуктивных мутантных линий пшеницы и их молекулярно-биохимическое изучение»

### **Общая характеристика диссертационного исследования.**

Диссертационная работа посвящена созданию биофортифицированных микронутриентами генетически стабильных (M<sub>5</sub>) мутантных линий с улучшенными компонентами продуктивности, на основе трех различных сортов яровой пшеницы казахстанской селекции с использованием различных доз гамма-излучения <sup>60</sup>Co (100 и 200 Гр), изучению биодоступности микроэлементов, характеристике морфологических параметров зерна, корреляционной связи между изученными признаками, выявлению специфичности экспрессии генов, участвующих в гомеостазе Fe в корнях и листьях у созданных биофортифицированных мутантных линий Fe и Zn.

**Актуальность диссертационной работы.** Недостаток микронутриентов повсеместно распространен в рационе питания населения. Особенно остро проявляется дефицит Fe и Zn, затрагивающий более половины населения мира. Недостаток микроэлементов называют «скрытым голодом». Решение проблемы дефицита железа является одним из приоритетов министерства здравоохранения Центральной Азии и Казахстана, а также государств в целом.

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) - основная зерновая культура питания человека и животных, обеспечивая 28% съедобного сухого вещества и до 60 % ежедневного потребления каллории в странах. Она также основной источник микронутриентов в ежедневном рационе. Однако зерно пшеницы имеет низкое содержание микронутриентов, необходимых для сбалансированного питания, особенно у сортов казахстанской селекции. В связи в этом необходимо генетическое обогащение (биофортификация) зерна пшеницы микронутриентами. В течение многих лет интенсивные программы селекции пшеницы на создание современных высокоурожайных сортов привели к снижению ее генетического разнообразия, сопровождающейся одновременно снижением питательной ценности зерна.

Дикая пшеница эммер с более высоким содержанием микроэлементов имеет преимущества по сравнению с культивируемой пшеницей. Однако проведение дополнительных экспериментов, необходимых для снижения влияния нежелательных генов, снижает ее селекционную ценность.

Важным свойством, определяющим качество и пищевую ценность пшеницы, является содержание белка в зерне, оказывающее влияние на качество конечной продукции. У современных сортов пшеницы содержание белка в зерне незначительно. При этом селекция на увеличение содержания белка в зерне затруднена ввиду отрицательной корреляции между продуктивностью и этим показателем качества зерна.

Мутагенез - мощный инструмент, используемый для генетического улучшения пшеницы и индуцирования нового аллеля гена, ранее отсутствующего в пуле гермоплазмы. Основанная на мутагенезе, мутационная селекция, широко использовалась для повышения продуктивности, однако не получила широкого распространения для улучшения качества зерна, особенно содержания важнейших микроэлементов, так Fe и Zn и морфологических параметров зерен.

Наряду с биофортификацией микронутриентами важным в генетическом улучшении качества зерна пшеницы является повышение их биодоступности путем снижения содержания фитиновой кислоты (ФК), антинутриента, мощного хелатора металлов. В связи с этим в работе проведен скрининг созданных генетически стабильных мутантных линий яровой пшеницы для идентификации низкофитиновых генотипов, сопряженных с высокой биодоступностью микроэлементов.

Для понимания процессов накопления металлов, Fe и Zn, в зерне, изучены особенности экспрессии ключевых генов, участвующих в гомеостазе Fe, в корнях и листьях созданных мутантных линий яровой пшеницы с высоким их содержанием. Установлено, что среди генов, обеспечивающих регуляцию поглощения Fe, его скорости транслокации и накопления, наибольший уровень экспрессии был выявлен у транскрипционного фактора *TabHLH* (13,1 и 30,2 раза в корнях биофортифицированных мутантных линий).

**Цель исследования:** Создание новых генетически стабильных ( $M_5$ ) мутантных линий яровой пшеницы для расширения генетической изменчивости и молекулярно-биохимическое изучение характеристик, связанных с питательной ценностью зерна.

**Задачи исследования:**

1. Для расширения генетической изменчивости яровой пшеницы создать новые генетически стабильные  $M_5$  мутантные линии на генетических основах казахстанских сортов Женис, Алмакен, Эритроспеперум-35 с помощью 100 Гр и 200 Гр доз гамма-облучения от источника  $^{60}\text{Co}$ .
2. Определить компоненты продуктивности у мутантных линий и их исходных сортов и установить корреляционную зависимость между ними.
3. Характеризовать исходные сорта яровой пшеницы и мутантные линии по морфометрическим параметрам зерна.
4. Определить содержание белка, Fe и Zn в зерне исходных сортов яровой пшеницы и мутантных линий и идентифицировать биофортифицированные микронутриентами образцы (генотипы).
5. Выявить локализацию Fe и Zn в структурных элементах зерна у исходных сортов яровой пшеницы и биофортифицированных мутантных линий методом гистохимического окрашивания металлов.
6. Провести анализ корреляционных связей между содержанием микронутриентов, компонентами продуктивности и морфометрическими параметрами зерна у исходных сортов и мутантных линий яровой пшеницы.
7. Провести скрининг на содержание фитиновой кислоты (основного антинутриента) в зерне исходных сортов и мутантных линий яровой пшеницы. Идентифицировать низкофитиновые генотипы, сопряженных с высокой биодоступностью микроэлементов.

8. Определить особенности экспрессии ключевых генов, участвующих в гомеостазе Fe, таких как, гены, контролирующие процессы поглощения металла, *TaSAMC*, *TaHAC1*, *TaHAAT2-B*, *TaДМҚС1-А* и *TaМКТ*, гены, обуславливающие регуляцию транслокации, *TaYSL* и *TaVIT2*, гены, отвечающие за накопление металла, *TaNRAMP* и *TaFer1A-D*, и транскрипционный Фактр *TabHLH*.

**Объекты исследования:** новые генетически стабильные (M<sub>5</sub>) 90 мутантных линий яровой пшеницы, созданные на генетической основе сортов Женис, Алмакен, Эритросперум-35 и исходные сорта.

**Методы исследования:** атомно-адсорбционная спектрометрия, инфракрасная спектрометрия, WinRHIZO система анализа изображений, ПЦР.

**Научная новизна исследования:** Впервые были созданы мутантные линии путем расширения генетической изменчивости яровой пшеницы на основе казахстанских, адаптированных к местным условиям, сортов Женис, Алмакен и Эритроспермум-35, путем физического мутагенеза гамма-облучения в дозах 100 и 200 Гр для генетического улучшения. Идентифицированы линии с улучшенными компонентами продуктивности как масса зерен главного колоса, масса зерен одного растения и масса 1000 зерен.

-Впервые установлено, что созданные мутантные линии яровой пшеницы характеризовались улучшенными морфометрическими параметрами зерна по сравнению с исходными сортами. Площадь зерна, и в меньшей степени его длина, являются наиболее фенотипический изменчивыми признаками.

-Впервые выявлена биофортификационная способность микронутриентами (белок, Fe и Zn) в зерне у ряда новых мутантных линий яровой пшеницы, что сопровождалась без снижения компонентов продуктивности и морфометрических параметров зерна.

-Впервые обнаружено, на основе гистохимического окрашивания по выявлению локализации Fe и Zn в зерне, что Fe и Zn в наибольшем количестве сконцентрированы в алейронном слое у биофортифицированных мутантных линий.

-Впервые у биофортифицированных Fe и Zn мутантных линий изучены особенности орган-специфичной экспрессии ключевых генов, регулирующих гомеостаз Fe, включая гены, участвующие в поглощении металла, *TaSAMC*, *TaHAC1*, *TaHAAT2-B*, *TaДМҚС1-А* и *TaМКТ*, гены, обеспечивающие транслокации, *TaYSL* и *TaVIT2*, гены, отвечающие за накопление металла, *TaNRAMP* и *TaFer1A-D*, и транскрипционный фактор *TabHLH*. Выявлен наибольший уровень экспрессии транскрипционного фактора *TabHLH* (13,1 и 30,2 раза) в корнях линии.

#### **Научно-практическая значимость работы:**

Показана эффективность индуцированного физического мутагенеза для расширения генетического разнообразия и улучшения с целью создания новых перспективных мутантных линий пшеницы на основе казахстанских сортов яровой пшеницы. Разработан комплексный подход к идентификации новых мутантных линий, характеризующихся улучшенными компонентами продуктивности, морфологических параметров и пищевой ценности зерна.

Установлена тесная корреляционная связь между питательной ценностью зерна (содержание белка, Fe и Zn) и морфологическими параметрами у новых

биофортифицированных микронутриентами мутантных линий.

Созданные генетически стабильные биофортифицированные микронутриентами мутантные линии яровой пшеницы внедрены в селекционный процесс КазНИИЗиР, АО «КазАгроИнновация».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Новые генетически стабильные M<sub>5</sub> мутантные линии, созданные на основе казахстанских сортов Женис, Алмакен и Эритросперум-35 с применением доз гамма радиации 100 Гр и 200 Гр характеризовались улучшенными компонентами продуктивности, как количество и масса зерен в главном колосе, масса зерен растения и масса 1000 зерен, по сравнению с исходными сортами.

- Идентифицированы мутантные линии с улучшенными морфологическими параметрами зерна (площадь, длина и ширина) по сравнению с исходными сортами. Наиболее фенотипический изменчивыми признаками являются площадь и длина зерен.

- Выявлена биофортификационная способность микронутриентами (содержание белка, Fe и Zn) у новых мутантных линии без снижения компонентов продуктивности и морфологических параметров зерен.

- Идентифицированы мутантные линии с низким содержанием фитиновой кислоты (основного антинутриента) в зернах, что сопряженно с их с высокой биодоступностью микроэлементов.

- С целью понимания механизмов накопления металлов в зерне, у биофортифицированных по содержания Fe и Zn линии сорта Эритросперум-35 изучены и выявлены генотип-зависимые и органоспецифичные особенности экспрессии ключевых генов, участвующих в гомеостазе Fe. Экспрессия гомологичных генов *TaSAMC*, *TaHAC1* и *TaСДМК* существенно повышалась в корнях изученных мутантных линий в 2,1–4,7 раза по сравнению с родительским сортом. Комбинированная экспрессия *TaYSL* и *TaVIT2* также выявлена в корнях мутантных линий в 1,3–2,7 раза. Гены, кодирующие внутриклеточный транспорт Fe и гены, отвечающие за аккумуляцию, *TaNRAMP* и *TaFer1A-D*, также значительно активировались в корнях и листьях. соответственно. Наибольшая степень экспрессии установлена для транскрипционного фактора, *TabHLH*, который был выражен в 13,1 и 30,2 раза в корнях мутантных линий.

#### **Основные результаты исследований и выводы:**

1. В результате расширения генетического разнообразия яровой пшеницы на основе казахстанских сортов Женис, Алмакен, Эритросперум-35 путем их обработки дозами гамма-излучения 100 Гр- и 200 Гр из источника <sup>60</sup>Со созданы новые генетически стабильные M<sub>5</sub> мутантные линии.

2. По улучшенным признакам продуктивности, таким как количество и масса зерен в главном колосе, масса зерна растения и масса 1000 зерен, идентифицировано 10 100- и 200 Гр мутантных линий (11,1%), масса зерна растения и масса 1000 зерен - у 19 мутантных линий (21,1%) по сравнению с исходными сортами.

3. Площадь зерна, в меньшей степени, его длина, наиболее фенотипический вариабельные признаки. Повышение длины и ширины зерна у мутантных линий была в диапазоне 7,6-34,9%, и 11,8-34,4%, соответственно, по сравнению с тако-

выми исходных сортов. Для генерации улучшения всех морфологических параметров зерна наиболее эффективной была дозой 200 Гр.

4. Содержание белка в зерне у ряда мутантных линий увеличилось на 3,4-16,9% по сравнению с исходными сортами. Идентифицированы биофортифицированные по содержанию Fe и Zn в зерне мутантных линий. Диапазон содержания металлов в зерне составил 46,4-111,3 мг/кг для Fe и 50,6-106,2 мг/кг для Zn. Максимальное значение Fe в зерне мутантной пшеницы выявлено в мутантной гермоплазме массой 200 Гр.

5. Гистохимический анализ у биофортифицированных по содержанию Fe и Zn выявил высокий их уровень в алейроне и эндосперме зерна.

6. Генерированные 200 Гр дозой мутантные линии сортов Женис и Алмакен характеризовались достоверно положительной корреляцией между содержанием белка в зерне и всеми морфометрическими параметрами зерна ( $r^2 = 0,11-0,25$ ,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о улучшенной способности физически крупного зерно накапливать высокое содержание белка. Повышение содержания Fe в зерне у Алмакен 100 Гр-созданных мутантных линий достоверно связано с компонентами продуктивности, как массой 1000 зерен ( $r^2 = 0,15$ ,  $p < 0,01$ ) и массой зерна растения ( $r^2 = 0,30$ ,  $p < 0,001$ ). Положительная корреляция между содержанием Fe и Zn в зерне у Женис и Эритросперум-35 200 Гр- мутантных линий и у Алмакен и Эритросперум-35 100 Гр-мутантных линий ( $r^2=0,22$ ,  $p < 0,05$ ), ( $r^2=0,15-0,42$ ,  $p < 0,001$ ) показывает, что накопление металлов контролируется одним локусом или одним белком, ферментом.

7. Существенная генетическая изменчивость выявлена среди мутантных линий по содержанию фитиновой кислоты (ФК, основного антинутриента) в зерне. Установлено, что в Алмакен мутантных линиях а, содержание фитиновой кислоты уменьшилось в 1,1-5,8 раза. Установлено, что мутантные линии характеризовались широким диапазоном варибельности молярного отношения ФК:Fe и ФК:Zn, соответственно, 1,14–14,5 и 0,9–13,0. Биодоступность микроэлементов у Fe и Zn биофортифицированных мутантных линиях увеличилась в 1-8, 7 и 1,1-7,9 раза соответственно.

8. Выявлена орган-специфические особенности экспрессии генов, участвующих в гомеостазе железа у Fe и Zn биофортифицированных мутантных. Экспрессия гомологичных генов *TaSAMC*, *TaHAC1* и *TaDMQC1-A* пшеницы значительно увеличилась (в 2,1-4,7 раза) в корнях изученных мутантных линий по сравнению с исходным сортом, экспрессия *TaYSL* и *TaVIT2* возросла – в 1,3-2,7 раза. Наибольшая степень экспрессии выявлена транскрипционном факторе *TabHLH* в корнях мутантных линий (в 13,1 - и 30,2 раза).

**Связь с планом основных научных работ.** Диссертационная работа выполнена в рамках проектов КН МОН РК 074/ ГФ «Создание и изучение линий мутантных пшениц для идентификации селекционно-ценных форм и новых аллелей генов, контролируемых ключевые адаптивные свойства» (2012-2014гг.), (Государственная регистрация № 012РК00581) и МАГАТЭ ТС проекта KAZ/5003 «Увеличение содержания микронутриентов и биодоступность в зародышевой плазме пшеницы с помощью комплексного подхода» (2012- 2015 гг.)

**Публикации.** Основное содержание диссертации отражено в 32 печатных

работах, в том числе 2 статьи в международном журнале с импакт-фактором, цитируемом в Scopus; 8 статей из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки, 2 статьи в коллекции зарубежных научных книг, 2 статьи в зарубежных научных журналах, 18 тезисах представленных на международных конференциях и симпозиумах.

**Объем и структура диссертации.** Текст диссертации состоит из 126 страниц, включая обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их анализ, заключение, библиографию. Количество использованной литературы 200. Результаты и данные, полученные в ходе эксперимента, представлены на 50 рисунках и 26 таблицах.