

УДК 576.32:581.4:633.16

А.К.Амирова*, А.А. Шилманова, К. Касымхан, А.К. Парменова,
 Н.К. Бишимбаева, И.Р. Рахимбаев
 РГП «Институт биологии и биотехнологии растений», г. Алматы, Казахстан
 *e-mail: aigul_amir@mail.ru

Создание стабильных соматоклональных линий пшеницы с ценными хозяйственными признаками на основе биотехнологии

Разработанная нами технология длительной регенерации растений позволяет получать линий со стабильно наследуемыми хозяйственно-ценными признаками. Показано, что некоторые из этих признаков (карликовость, высокая масса зерна, крупное зерно, высокая урожайность) полностью сохраняются и усиливаются в последующих поколениях соматоклональных линий сортов Отан и Целинная ЗС. ПЦР анализ с использованием IRAP-маркеров позволил выявить различие соматоклональных линий как по сравнению с исходным сортом, так и между собой.

Ключевые слова: соматоклональные варианты, регенерация растений, наследование, ДНК, ПЦР, IRAP маркеры.

A.K. Amirova, A.A. Shilmanova, K. Khasymkhan, A.K. Parmenova,
 N.K. Bishimbayeva, I.R. Rakhimbayev

Creation of wheat stable somaclonal lines with valuable traits on the base of biotechnology

The long-term plant regeneration technology developed by us can be use for obtain of somaclonal lines with stable inherited valuable traits. It was shown that some of these traits (dwarf, high grain mass, large grain, high grain yield) were fully maintained and increased in next generation of Otan and Celinnaya ЗС cvs. somaclonal lines. The differences somaclonal lines as compared to the original variety and between themselves were revealed by the use of PCR analysis with IRAP-markers.

Keywords: somaclonal variants, plant regeneration, inheritance, DNA, PCR, IRAP-markers.

A.K. Амирова, А.А. Шилманова, Қ. Қасымхан, А.К. Парменова,
 Н.К. Бишимбаева, И.Р. Рахимбаев

Құнды шаруашылық белгілері бар тұрақты бидай соматоклонды линияларының биотехнология негізінде алу

Бізбен жасалған ұзақ мерзім өсімдік регенерациясы алатын технологиясы тұрақты тұқым қуалайтын құнды шаруашылық белгілері бар соматоклонды линиялар алуға мүмкіншілік береді. Бұл белгілердің кейбірі (карликтілік, дәннің жоғары массасы, ірі дәнділік, жоғары өнімділік) Отан және Целинная ЗС сорттарының соматоклонды линияларының келесі ұрпақтарында толық сақталатыны және күшеетіні көрсетілді. ПТР анализге IRAP-маркерлерің қолдануы соматоклондық линиялардың бастапқы сортпен және бір бірімен салыстырғанда өзгешіліктерің анықтыуға ықпал етті.

Түйін сөздер: соматоклонды варианттар, өсімдік регенерациясы, тұқым қуалау, ДНК, ПТР, IRAP маркерлері.

В ходе разработки биотехнологических методов генетического улучшения важнейших с/х культур нами создана технология длительной регенерации растений, позволяющая значительно расширить спектр и размах изменчивости пшеницы [1]. Полученные при помощи этой технологии соматоклональные линии пшеницы отличались от прототипа не только моногенными (окраска зерен, колосковых чешуи), но и полигенными признаками (высота растений, сроки колошения, продуктивность), что согласуется с литературными данными [2]. У соматоклонных вариантов Отан в R₃ поколении получены линии с ценными признаками – краснозерные короткостебельные линии, продуктивные формы с белым крупным зерном, выравненные формы с крупным озерненным колосом. У соматоклонов Целинная ЗС в R₂ поколении получены высокорослые скороспелые линии и крупнозерные линии с понижающим колосом [1]. Необходимым условием для вовлечения соматоклональных форм в селекционный процесс является сохранение ценных признаков в потомстве от их самоопыления. В задачу данного исследования входило изучение стабильности ценных признаков, выявленных у соматоклональных вариантов в последующих поколениях и генетическая дифференциация соматоклональных вариантов пшеницы с использованием ПЦР анализа IRAP-методом.

Материалы и методы

Объектами исследования служили соматоклональные варианты мягкой пшеницы сорта Отан R₄ поколения, сорта Целинная ЗС R₃ поколения, полученные с использованием разработанной нами технологии длительной регенерации растений [1]. Анализ структуры урожая и морфологии регенерантов и их потомства проводили по общепринятым методам селекционно-генетической оценки растений [3]. Статистическую обработку данных проводили по Н.А. Плохинскому [4].

Детекцию полиморфизма проводили методом ПЦР с использованием IRAP праймеров [5]. Геномную ДНК выделяли из 3-х дневных этиолированных проростков соматоклональных вариантов пшеницы согласно СТАБ-методу. Качество выделенной геномной ДНК определяли спектрофотометрически по отношению экстинкций D260/D280 и методом электрофореза [6]. Электрофорез проводили в 1,0% агарозном геле с добавлением этидиум бромид. ПЦР-анализ проводили на амплификаторе "Eppendorf personal". Электрофоретические гели анализировали при помощи гель-документирующей системы "Biorad".

Результаты и их обсуждение

У соматоклональных линий Отан изучали стабильность сохранения таких признаков как короткостебельность, масса зерна в главном колосе, окраска зерна. **Признак «короткостебельности»** изучали на примере соматоклональных линий Отан 1№5 и 5№5. Отмечено, что в R₄ поколении в 2005 г. высота всех линий, произошедших от двух короткостебельных линий R₃ поколения (1№5; 5№5) ниже контроля (с. Отан 2005 г., 70,85±6,19 см), и варьирует от 49,4±6,18 до 63,57±8,34 см. Высота соломины этих линий, как и в предыдущем поколении, оказалась ниже контроля (исходный сорт Отан). Следовательно, признак короткостебельности соматоклональных линий R₃ поколения (1№5; 5№5) сохраняется в R₄ поколении.

Признак «масса зерна в главном колосе» изучали на примере соматоклональных линий с. Отан R₃ поколения (1№4; 1№5; 1№12; 2№23; 15№12). Так, масса зерен некоторых соматоклональных линий (1№12; 2№23) – (2,28±0,3; 1,74±0,2г.) выше, чем у исходного сорта Отан – 1,11±0,15 г. и урожая предыдущего года. Следовательно, можно сделать вывод не только о сохранении определенных значений признака «масса зерна» у отобранных соматоклональных линий, но и об усилении этого признака в R₄ поколений.

Признак «окраска зерна». Соматоклональные линии (2№23) Отан R₃ поколения характеризовались стекловидными зернами темно-красного цвета. В R₄ поколении наблюдалась изменчивость по признаку темно-красной окраски зерна в пределах линии и одного колоса. Отобраны соматоклональные линии 2№23 в R₃ поколений, сохраняющие красную окраску зерен. В некоторых растениях было показано исчезновение красной окраски и появление зерен белого цвета, что приводило к появлению «мозаичности» колоса с различной окраской зерен. Признак «окраска зерна» в соматоклональных линиях наследовался в тех случаях, если он изначально равномерно проявлялся у всех семян колоса, а если он изначально был мозаичным, то продолжал далее расщепляться.

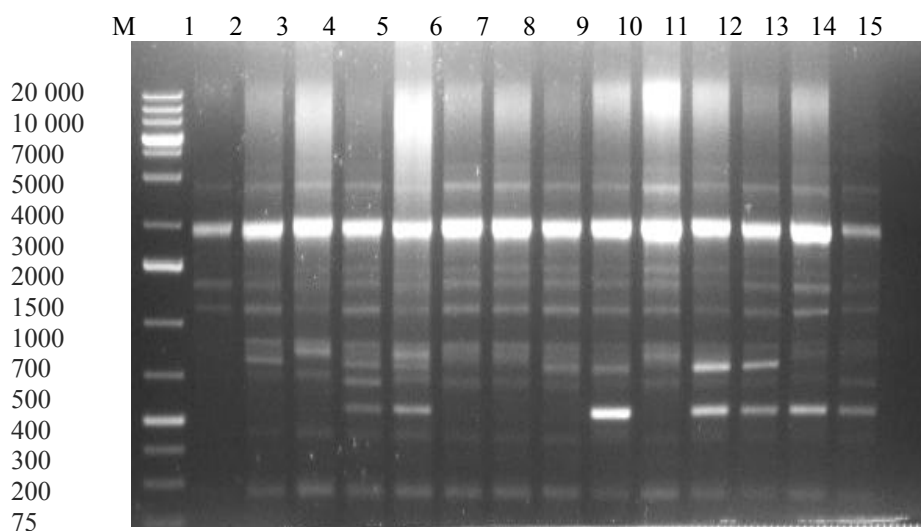
В целом, признаки, выявленные у соматоклональных линий Отан R₃ поколения, такие как короткостебельность, высокая масса зерна, удлиненный колос полностью наследуются и усиливаются в R₄ поколении, что ведет к существенному увеличению размеров колоса и появлению двухколосковых цветков. Для дальнейшего изучения отобраны соматоклональные линии с. Отан R₄ поколения со стабильно наследуемыми ценными признаками – короткостебельные (1№5. 5№5), короткостебельные красnozерные формы (2№23), выравненные формы с удлиненным колосом и большой массой зерна в главном колосе (1№12), с белой (2№14) и серой (10№7) окраской зерна.

У соматоклональных линий сорта Целинная ЗС изучали стабильность сохранения таких признаков как "высокорослость", «крупное зерно» и «большое число зерен». **Признак "высокорослости"**. Для последующих исследований были отобраны 28 высокорослых неполегающих линий Целинная ЗС №6№7. Установлено, что признак "высокорослости", наблюдаемый в R₂ поколении, сохраняется лишь у некоторых линий в R₃ поколении (в 6-ти из 28). **Признаки «крупное зерно» и «большое число зерен»** у высокопродуктивных соматоклональных линий R₂ поколения сорта Целинная ЗС с понижающим колосом (№6№7) наследуются, а в некоторых случаях даже усиливаются в R₃ поколений. Отобраны линии со стабильно наследуемыми ценными признаками: высокорослая и скороспелая линия Целинная ЗС №6№7 и две крупнозерные линии (№6, №7, №18, №6№7 №19).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сохранении некоторых изменений, вызванных условиями культивирования *in vitro*, в последующем поколении соматоклональных вариантов пшеницы и возможности отбора среди них исходных форм с хозяйственно-ценными признаками для вовлечения в селекционный процесс.

Для генетической дифференциации соматоклональных вариантов пшеницы нами проведен молекулярно-биологический анализ с использованием IRAP-маркеров. Для проведения ПЦР анализа IRAP-методом использовались следующие комбинации праймеров: 1) PawS5 + PawS16; 2) PawS6 + PawS17; 3) Nikita C0699 + Sabrina C0945; 4) Nikita C0699 + Sukkula 9900. При использовании комбинации праймеров PawS5+PawS16 выявлено отличие соматоклонов от исходного сорта Целинная 3С по 4 локусам, заключающееся в появлении высокомолекулярных ампликонов 1300, 1500, 1800 и 2000 п.о. У исходного сорта Целинная 3С было идентифицировано 13 фрагментов амплификации длиной от 100 до 1400 п.о., у раннеспелой линии Целинная 3С - 16 фрагментов длиной от 100 до 2000 п.о. У неполегающей скороспелой линии Целинная 3С выявлено 14 фрагментов. У сорта Отан суммарный спектр продуктов амплификации состоит из 20 фрагментов размером от 100 до 2100 п.о. В то время как у соматоклональных линий Отан суммарный спектр ампликонов колеблется от 19 до 21 фрагментов в зависимости от наличия или отсутствия ампликонов размером 530 и 800 п.о.

При комбинации праймеров Nikita C0699+Sabrina C0945 в спектрах продуктов амплификации сорта Целинная 3С обнаружены 14 фрагментов размером от 280 до 2800 п.о. У раннеспелой линии Целинная 3С выявлено 18 ампликонов, появились новые локусы, состоящие из 800, 1750 и 3200 п.о., исчез фрагмент размером 650, имеющийся у исходного сорта (рисунок 1). Неполегающая скороспелая линия Целинная 3С отличалась от первого соматоклона тем, что в ее спектре добавились фрагменты размером 550 и 650 п.о. и отсутствует один ампликон (800 п.о.).



1 – маркер молекулярной массы (GeneRuler 1kb DNA Ladder), 2 – сорт Целинная 3С, 3 – раннеспелая линия Целинная 3С, 4 – скороспелая, неполегающая линия Целинная 3С, 5 – сорт Отан, 6 – стекловидная, краснозерная короткостебельная линия Отан №101. 2.23, 7 – крупнозерная линия Отан 20.9, 8 – остистая линия Отан, 9 – выровненная линия Отан, 10 – краснозерная, короткостебельная линия Отан 2.23, 11 – низкорослая карликовая линия Отан, 12 – линия Отан с дымчатыми семенами, 13 – белозерная линия Отан, 14 – Гибрид Г-4 (Целинная 3С x Казахстанская 15), 15 – гибридная линия Г-4 с нулевой мутацией по Glu 1D локусу, 16 – контроль (H₂O)

Рисунок 1 – Электрофореграммы продуктов амплификации IRAP-маркеров ДНК исходных сортов (2, 5) и соматоклональных линий (3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) яровой мягкой пшеницы с использованием комбинации праймеров Nikita C0699+Sabrina C0945

В спектре сорта Отан выявлено 15 фрагментов размером от 280 до 3200 п.о. Спектр амплификации крупнозерной соматоклональной линии состоял из 12 фрагментов, отсутствовали ампликоны размером 550, 800 и 2500 п.о., имеющиеся у исходного сорта Отан. В продуктах амплификации остистой линии

Отан обнаружено 13 фрагментов, отсутствовали три фрагмента размером 550, 800 и 2500 п.о., но присутствовал фрагмент в 400 п.о., отсутствующий у сорта Отан. В спектре выравненной линии отсутствовали два фрагмента размером 550 и 2500 п.о.

ПЦР анализ геномной ДНК соматоклональных вариантов и их исходных форм с использованием молекулярно-генетических IRAP-маркеров позволил выявить различия соматоклональных линий как по сравнению с исходным сортом, так и между собой и отобрать наиболее полиморфные комбинации праймеров: PawS5+PawS16 и Nikita C0699+Sabrina C0945.

Выявление нами сохранения некоторых ценных признаков в нескольких поколениях и отбор стабильных линий с новыми ценными признаками позволяет сделать заключение о принципиальной возможности использования разработанной нами технологии длительной регенерации для улучшения существующих сортов.

Литература

- 1 Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Беглов Р.Б., Оразалы М., Рахимбаев И.Р. Расширение спектра генетической изменчивости пшеницы на основе клеточной технологии длительной регенерации растений *in vitro* // Доклады НАН РК. – 2005. – № 5. – С. 71-76.
- 2 Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // Theor. And Appl. Genet.–1981. – Vol. 60. – №4. – P. 197-214.
- 3 Апробация сельскохозяйственных культур Казахстана / Под ред. Н.Л. Удольской, И.В. Соснина и А.И. Пастухова. – Алма-Ата: «Кайнар», 1974. – С. 4-12.
- 4 Плохинский Н.А. Биометрия. – 2-е изд. М.: Изд-во Московского университета, 1970. – 367 с.
- 5 Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // Theor. App. Gen. – 1999. – № 98. – P. 704-711.
- 6 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярная биология. – Москва: «Мир», 1984. – 479 с.

УДК 581.1.035

Б.Б. Анапияев^{1*}, К.М. Исакова¹, Е.Б. Бейсенбек¹, П.А. Момбаева¹, А.С. Жангазиев²,
А.Т. Сарбаев², И.М. Двейкат³, П.С. Баензигер³

¹Институт высоких технологии и устойчивого развития КазНТУ им. К.И. Сатпаева, г.Алматы, Казахстан;

²КазИИ земледелия и растениеводства; ³Университет штата Небраска, США;

*e-mail: bak_anapiyayev@mail.ru

Использование гаплоидной биотехнологии в создании нового высокопродуктивного сорта *Triticum aestivum* L.

В работе приведены результаты многолетних исследований по культуре изолированных микроспор пшеницы *in vitro*, результаты исследования путей развития микроспор *in vitro* и процессы морфогенеза и регенерации гаплоидных растений. Приведены практические результаты использования гаплоидной биотехнологии в экологической селекции *Triticum aestivum* L. на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. В работе также приведены результаты использования молекулярных маркеров на ранних этапах селекционного процесса.

Ключевые слова: гаплоидная биотехнология, культура микроспор *in vitro*, *Triticum aestivum* L.

Б.Б. Анапияев, К.М. Исакова, Е.Б. Бейсенбек, П.А. Момбаева, А.С. Жангазиев,
А.Т. Сарбаев, И.М. Двейкат, П.С. Баензигер

Гаплоидтық биотехнологияны *Triticum aestivum* L. жоғары өнімді жаңа сортын алуда қолдану

Күздік бидай бірінші ұрпақтары гаплоидты биотехнологиясын қолдана отырып, АДГ-линиялары алынды. Олардың өнімділігі және сапасы жағынан жоғары. Өзінің үлгілерінен артық өнім береді. Дигаплоидтық линиялардан бидайдың «Нуреке» деген жаңа сорты алынып Алматы және Жамбыл облыстарында аудандастырылды.

Түйін сөздер: гаплоидтық биотехнология, *in vitro* микроспора культурасы, *Triticum aestivum* L.

B.B. Anapiyayev, K.M. Iskakova, E.B. Beisenbek, P.A. Mombayeva, A.S. Jangaziev,
A.T. Sarbayev, I.M. Dweikat, P.S. Baenziger

Use of haploid biotechnology for production of new highly productive cultivars of *Triticum aestivum* L.

By using of haploid biotechnologies *in vitro* are received valuable DHL-lines of a winter wheat which have surpassed on productivity and on quality of grain of parental grades or the standard. From DHL lines has been selected