

Краткая информация о проекте

Наименование	AP09258679 «Молекулярно-биохимическая характеристика созданной мутантной гермоплазмы яровой пшеницы, на устойчивость к листовой и желтой ржавчине, морфометрию и качество зерна» (0121PK0037)
Актуальность	Проект включает создание и молекулярно-биохимическую характеристику новых мутантных ресурсов яровой пшеницы на устойчивость к листовой и желтой ржавчине, морфометрию и качество зерна, включающих содержание важных микронутриентов и их биодоступность. Интегральный подход основан на мутационной селекции посредством применения различных доз гамма-облучения и генетической основы устойчивого к ржавчине сорта Казахстанская-19, включает фенотипирование с помощью гиперспектральной визуализации, скрининг на содержание белка зерна, железа (Fe) и цинка Zn, и их биодоступность, визуальную оценку развития грибковой структуры и гиперспектральную визуализацию, изучение экспрессии генов <i>b-1,3</i> -глюканазы и эндохитиназы и определение их активности как временной ответ на инфекцию патогенными грибами и использование конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP) для определения дискриминации аллелей генов <i>Lr</i> .
Цель	Целью проекта является молекулярно-биохимическая характеристика созданной мутантной гермоплазмы яровой мягкой пшеницы на устойчивость к листовой и желтой ржавчине, продуктивность, морфометрическим показателям зерна и его качества, включая содержание важнейших микронутриентов и их биодоступность, и определение дискриминации аллелей генов <i>Lr</i> . скрининг с использованием конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP маркер).
Задачи	1. Большинство сортов пшеницы, широко используемых в сельскохозяйственном производстве, существенно страдают от грибковых заболеваний, и потери урожая зерна, составляют до 50–85%. В связи с этим существует необходимость в создании новой гермоплазмы яровой пшеницы, устойчивой к листовой и желтой ржавчине. С целью расширения генетической изменчивости яровой пшеницы на основе устойчивого к ржавчине сорта Казахстанская-19, и использования индуцированного мутагенеза с помощью различных доз гамма-облучения (300, 350 и 400 Гр), были созданы новые мутантные линии (M ₃ –M ₄ поколение) для фенотипирования на устойчивость к ржавчинным грибковым болезням. Эти мутантные ресурсы использовались для определения параметров, связанных с продуктивностью и морфометрией зерна, а также для анализа характеристик устойчивости к ржавчине посредством визуальной оценки развития грибковой структуры (обнаружение гиперчувствительной реакции или хлороза вокруг участков инфекции) и гиперспектральной визуализации (анализ различия значений отражения в диапазоне от

	<p>404 до 2511 нм и для идентификации кандидатов-соединений, обуславливающих устойчивость.</p> <p>2. Мутантные ресурсы яровой пшеницы были оценены по характеристикам качества зерна, как содержание белка, содержание микроэлементов зерна (Fe и Zn). Для определения биодоступности микронутриентов мутантные линии был проведен скрининг на содержание фитиновой кислоты, являющейся основным «антинутриентом» ввиду ее сильной хелатирующей способности металлов. Идентифицированы мутантные линии, устойчивые к листовой и желтой ржавчине, биофортифицированные микронутриентами зерна и низким содержанием фитиновой кислоты, а также улучшенной биодоступностью микроэлементов.</p> <p>3. <i>b-1,3</i>-глюканазы растений сами, либо преимущественно, в комбинации с хитиназой, являясь патогенез-связанными белками, (ПСБ), непосредственно участвуют в защитных механизмах путем гидролиза <i>b-1,3</i>-глюканов и хитина, основных структурных компонентов клеточной стенки грибов и подавляют рост патогенов. Изучены их роли в устойчивости путем определения экспрессии генов как временные реакции против фитопатогена и активность ферментов. Технология молекулярных маркеров как ценных инструментов применена для оценки генетического разнообразия, идентификации и выбора желаемых генотипов. Конкурентная аллель-специфическая ПЦР (KASP), - одна из платформ униплексного генотипирования SNP, имеющая решающее значение для идентификации <i>Lr</i> генов, использована для скрининга мутантной гермоплазмы пшеницы.</p>
<p>Достигнутые результаты</p>	<p>В настоящем проекте расширена генетическая изменчивость яровой пшеницы на основе устойчивого к ржавчине сорта Казахстанская-19 с использованием индуцированного мутагенеза посредством трех доз гамма-облучения (300-, 350- и 400-Гр) из источника ⁶⁰Co в лаборатории селекции и генетики растений МАГАТЭ, Зайберсдорф, Австрия. Созданы новые М₃ – М₄ поколения мутантных линий. Эти три дозы облучения были выбраны на основании лабораторного теста на радиочувствительность, которая LD50 составляла 330 Гр для сорта Казахстанская-19. Созданные 300-, 350- и 400-Гр мутантные линии были фенотипически идентифицированы по устойчивости взрослого растений к листовой и желтой ржавчине. Отобраны 75 иммунных или устойчивых взрослого растения М₃ мутантных линий вместе с сортом Казахстанская-19, которые охарактеризованы на устойчивость проростков. Мутантная гермоплазма включала 42 линии 300 Гр, 16 образцов 350 Гр линий и 17 линий 400 Гр линий, достоверно превышающих сорт Казахстанская-19 по параметрам продуктивности в 1,6-1,7 раза (масса и число зерен в главном колосе).</p> <p>Новые мутантные линии, устойчивые взрослого растений к листовой и желтой ржавчине, были фенотипированы на устойчивость проростков после инокуляции ржавчиной в тепличных экспериментах. Фон ювенильной устойчивости ана-</p>

лизировали микроскопически и с помощью гиперспектральной визуализации для выявления и/или структурных изменений поверхности листьев, вызывающих устойчивость. На основании устойчивости взрослого растений к листовой и желтой ржавчине, и микроскопических исследований ювенильной устойчивости выявлено, что большинство из 75 М₃ мутантных линий, и генерируемых дозами гамма радиации 300-, 350- и 400-Гр (89,33%) сочетали ювенильную устойчивость с таковой взрослого растения к обоим видам ржавчины, к листовой и желтой ржавчине.

Анализ гиперспектральной визуализации показал, что инфицированные листья генотипов пшеницы имеют повышенную относительную отражательную способность в видимом и ближнем инфракрасном свете по сравнению с неинфицированными генотипами, с пиковыми средними значениями при 462 и 644 нм, а также 1936 и 2392 нм, соответственно. Пять спектральных индексов, включая индекс растительности, нормализованный по красному краю (RNDVI), индекс структурно-нечувствительного пигмента (SIPI), индекс растительности соотношения (RVSI), индекс воды (WI) и индекс нормализованной разницы воды (NDWI), продемонстрировали значительный потенциал для определения степени устойчивости проростков. Наиболее существенные различия в отражательной способности между чувствительными и устойчивыми мутантными линиями проявлялись при длинах волн 694,57 и 987,51 нм.

Проведена оценка созданных линий по морфо-метрическим параметрам зерна (площадь, длина, ширина и толщина зерна). Наибольшую площадь зерна (16,2 и 16,5 мм²) имели мутантные линии, генерированные дозами 350 и 400 Гр, с номерами 8/2 и 25/3, соответственно. Вариация длины зерна (ДЗ) составляла от 6,43 до 7,29 мм при среднем значении $6,75 \pm 0,18$ мм во всей мутантной популяции. Девять М₄ мутантных линий (28,0 %) имели значительно более длинные зерна, что аналогично параметру площади зерна, было выявлено в 350- и 400 Гр мутанной гермоплазме.

По сравнению с морфометрическими параметрами зерна, как площадь и длина зерна, наименьшие диапазоны изменчивости наблюдались по толщине зерне (ТЗ) с интервалами от 2,6 до 3,34 мм при среднем значении $3,15 \pm 0,13$ мм во всех облученных линиях. Выявлено 6 генотипов со статически значимыми высокими значениями ТЗ, чем сорт Казахстанская-19.

По важному признаку качества зерна, как содержание белка в зерне (СБЗ), установлено, что диапазоны для мутантных гермоплазм пшеницы составляли 9,6–15,6 % со средним значением $13,99 \pm 1,16$, $12,63 \pm 1,49$ и $12,43 \pm 1,54$ % у 300-, 350- и 400 Гр линиях, соответственно (n=138). Идентифицировано 17 мутантных линий (37,0%), из которых 8, 6 и 3 образцов представленные 300-, 350- и 400 Гр линиями, имели СБЗ, статистически значимо превышающие сорт Казахстанская-19 ($13,95 \pm 0,12$ %) в 1,08-1,12 раза. ANOVA анализ по

СБЗ выявил существенные различия между сортом Казахстанская-19 и 350- и 400 Гр-линиями, что свидетельствуют об эффективности высоких уровней гамма-облучения для генерации генетической изменчивости СБЗ. Таким образом, созданные Казахстанская-19 мутантные линии являются новыми ценными генетическими источниками, сочетающие с устойчивостью растения к листовой и желтой ржавчине с высоким СБЗ.

Из 18 проскринированных 300 Гр мутантных линий (89%) по содержанию железа в зерне (СFeЗ) большинство (16 образцов) статистически значимо превышали сорт Казахстанская-19 в 1,82–3,19 раза. В 350- и 400 Гр мутантных гермоплазмах по СFeЗ было проскринировано, соответственно, 15 и 13 линий. Из которых 14 и 10 образцов характеризовались статистически значимыми более высокими СFeЗ по сравнению с исходным сортом в 1,43–3,13 раза и 1,43–2,42 раза. Таким образом, по биофортифицированной способности Fe в трех дозированных мутантных гермоплазмах выделено 40 перспективных образцов, устойчивых к листовой и желтой ржавчине (ЛР и ЖР) и высокими показателями элементов продуктивности. Диапазоны варьирования содержания цинка в зерне (СZnЗ) у 300-, 350- и 400 Гр- составляли, соответственно, 42,7–97,3, 72,0–119,5 и 100,2–105,8 мг/кг, со средними значениями для каждой дозированной гермоплазмы, $64,43 \pm 19,18$, $98,3 \pm 10,78$ мг/кг и $102,05 \pm 1,43$ мг/кг. Идентифицированные биофортифицированные Zn из трех мутантных гермоплазм (всего 39 генотипов) статистически значимо превышали родительский сорт, соответственно, у 300 Гр линий в 1,47–2,77 раза, у 350 Гр линий в 2,05–3,40 раза и 400 Гр линий в 3,0 раз.

Изучена экспрессия *b-1,3*-глюканазы, кодирующей ПСБ, у сорта яровой пшеницы Эритроспермум-35 (ювенильно-чувствительный) и 100 гр- и 200 Гр- созданных мутантных линиях и 4 ювенильно-чувствительных и 4 ювенильно-устойчивых линиях, как временная реакция на инфекцию листовой ржавчины. При 24 ч заражении ее уровень был существенно выше у чувствительных генотипов по сравнению с устойчивых. Наибольшие различия между генотипами проявлялись при 48 и 72 ч заражения со соотношением, соответственно, 32,67 и 2,78 раза выше у устойчивых линий.

Профиль экспрессии генов эндохитиназы, также кодирующих ПСБ, у сорта яровой пшеницы Эритроспермум-35 и ювенильно-чувствительных и устойчивых линиях, как временная реакция на ЛР заражение показывает ее пониженный уровень у большинства чувствительных генотипов. Аналогично реакции экспрессии генов *b-1,3*-глюканазы, таковая эндохитиназы между как генотипами выявлялась при длительном эффекте kb. Уровень экспрессии генов эндохитиназы был в 2,60 раза выше у устойчивых линий, что свидетельствует о проявлении ее защитной роли при длительном действии патогена. Определены активность эндохитиназы во флаговых листьях Эритроспермум-35 мутантных линий,

	<p>различающихся по устойчивости к ЛР и ЖР на 2 стадиях развития, выявляет, что у 2 устойчивых мутантных линий она в 9,73 и 4,30 раза была выше, чем таковая сорта Эритро-спермум-35.</p> <p>Разработан и оценен KASP маркер для 6 генов <i>Lr</i>: <i>Lr1</i>, <i>Lr2a</i>, <i>Lr3</i>, <i>Lr9</i>, <i>Lr10</i> и <i>Lr17</i>. Созданные мутантные линии сорта Казахстанская-19 имели высокие частоты аллеля устойчивости «а» (0,88) во всех шести генах <i>Lr</i>, которые были значимо связаны с устойчивостью проростков к листовой ржавчине и предполагают возможность благоприятной интрогрессии гаплотипа через функциональные маркеры. 9 мутантных линий характеризовались наличием аллеля «b» в <i>Lr9</i> и <i>Lr10</i> генов, за исключением 1 линии с аллелем «а» в <i>Lr9</i> и 3 линий с аллелем «а» в <i>Lr10</i>, которые были чувствительны в отношении прогрессивного развития ряда клеток гаустории гриба (КМК) через 72 часа после инокуляции. Одна линия из мутантной гермоплазмы, обработанной дозой 300 Гр, имеющей аллели «b» в <i>Lr1</i>, <i>Lr2a</i>, <i>Lr10</i> и <i>Lr17</i>, но аллели «а» в <i>Lr3</i> и <i>Lr9</i>, была устойчива при фенотипировании к КМК.</p> <p>В целом, получены приоритетные фундаментальные и практические результаты, связанные с расширением генетического разнообразия яровой пшеницы, созданием и молекулярно-биохимической характеристикой новых мутантных ресурсов на устойчивость к листовой и желтой ржавчине, морфометрию и качество зерна, включающих содержание важных микронутриентов и их биодоступность. Результаты проекта вносят новые знания и расширяют понимание механизмов устойчивости к ржавчинным болезням. Проект имеет высокий потенциал для коммерциализации. Таким образом, проект внес существенный вклад по снижению негативного действия ржавчин, являющейся наиболее экономически важным заболеванием пшеницы, вызывая значительные потери урожая. Отсутствие предсказуемости появления новых рас ржавчины с высоким эпидемическим потенциалом подчеркивает необходимость дополнительных исследовательских усилий для оценки уязвимости глобальных продовольственных культур к болезням до их внедрения в крупных масштабах.</p> <p>Результаты проекта будут распространены заинтересованным лицам, селекционным станциям, что внесет экономический, экологический, научно-технический эффект. Полученные результаты с использованием интегрального подхода повышения устойчивости пшеницы к ржавчинным болезням, сочетающих биофортификацию микронутриентами, могут быть дополнены другими исследованиями и обменом научными знаниями для дальнейшего международного сотрудничества.</p>
<p>Имена и фамилии членов исследовательской группы с их идентификаторами (Scopus Author ID, Researcher ID, ORCID,</p>	<p>1. Кенжебаева Сауле Сагиндыковна, доктор биологических наук, Индекс Хирша – 5, Researcher ID Q-4381-2016 , ORCID: 0000-0003-0238-2607 , Scopus author ID: 56230125100.</p> <p>2. Атабаева Сауле Джумагалиевна, доктор биологических наук, Индекс Хирша – 4, Researcher ID N-9656-2014, ORCID: 0000-0002-4704-6909 , Scopus author ID: 562295975000.</p>

при наличии) и ссылками на соответствующие профили	3. Шоинбекова Сабина Алимжанова, доктор химических наук, Индекс Хирша – 2, Researcher ID P-2773-2015 , ORCID: 0000-0003-0238-2607 , Scopus author ID: 8370741600.
Список публикаций со ссылками на них	<p>S.S. Kenzhebayeva, S.A. Shoinbekova, D. Zharassova³, K.D. Miatzhanova¹, A. Abekova, S.Sh. Asrandina, Moahid Ahmal Javid. New spring wheat mutant resources with yellow rust resistance, improved grain morphometric parameter, and high grain protein content. <i>Bulletin of KazNU named after Al-Farabi, Ecological Series</i>, 2021, No. 3 (68), 55-63. : https://doi.org/10.26577/EJE.2021.v68.3.06.</p> <p>Kenzhebayeva, S.S., Atabayeva, S.D., Sarsu, F. Iron-deficiency response and differential expression of iron homeostasis related genes in spring wheat (<i>Triticum aestivum</i>) mutant lines with increased grain iron content <i>Crop and Pasture Science</i> 2022, 73(2), pp. 127–137 Web of Science Q-2, Scopus Q-2, percentile – 75. Scopus citation index -4, Web of Science citation index - 4. DOI: 10.1080/15427528.2016.1276990.</p> <p>Kenzhebayeva, S., Atabayeva, S., Sarsu, F., Abekova A., Shoinbekova S., Omirbekova N., Doktyrbay G., Beisenova, A., Shavrukov, Y. Organ-specific expression of genes involved in iron homeostasis in wheat mutant lines with increased grain iron and zinc content <i>PeerJ</i>, 2022, DOI 10.7717/peerj.13515. Web of Science Q-1, Scopus Q-1, percentile – 85. Scopus citation index - 2, Web of Science citation index - 2.</p> <p>Kenzhebayeva, S., Mazkirat, S., Shoinbekova, S., Atabayeva, S., Abekova, A., Omirbekova, N., Doktyrbay, G., Asrandina, S., Zharassova, D., Amirova, A.; et al. Phenotyping and exploitation of Kompetitive allele-specific PCR assays for genes underpinning leaf rust resistance in new spring wheat mutant lines. <i>Curr. Issues Mol. Biol.</i> 2024, 46, 689–709. https://doi.org/10.3390/cimb46010045. Web of Science Q-2, Scopus Q-2, percentile – 30.</p>
Информация о патентах	-