

УДК 633.18 : 631.527 : 606 (574)

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ В СЕЛЕКЦИИ КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ ГЛЮТИНОЗНОГО РИСА**

Усенбеков Бақдаулет Наубаевич  
к.б.н., зав. лаборатории физиологии и биохимии растений  
*Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан*

Зеленский Григорий Леонидович  
д.с.-х.н., профессор  
*ФГБОУ ВПО Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия*

Казкеев Даурен Табылтаевич  
магистр с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии растений

Жанбырбаев Елдос Алмабекович  
магистр с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии растений  
*Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан*

Сартбаева Иннабат Абибуллаевна  
магистр биологии, PhD докторант  
*Казахский национальный университет имени Аль-Фараби, Алматы, Казахстан*

Рысбекова Айман Бокеновна  
к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии растений  
*Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан.*

Батаева Дарига Сериккызы  
магистр биологии, PhD докторант  
*Казахский государственный женский педагогический университет, Алматы, Казахстан*

На среде N6 культивировали 1400 пыльников глютинозного сорта Виолетта, из которых получено 72 каллуса. При пересадке каллусов на регенерационную среду МС получено 7 зеленых фертильных и 1 стерильное растение. Из длительно культивируемых каллусов через 10 месяцев получены растения-регенеранты из глютинозного сорта Виолетта. Эти регенеранты пассировали на среду МС содержащий 5 мг/л БАП и 1мг/л ИУК. Для получения большего количества гаплоидных регенерантов было проведено клональное размножение

Ключевые слова: ГЛЮТИНОЗНЫЙ РИС, СЕЛЕКЦИЯ, КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ, СОДЕРЖАНИЕ АМИЛОЗЫ,

UDC 633.18 : 631.527 : 606 (574)

**ANTHER CULTURE METHOD IN BREEDING OF GLUTINOUS RICE VARIETIES IN KAZAKHSTAN**

Usenbekov Bakdaulet Naubaevich  
Cand.Biol.Sci., Head of the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry  
*Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan*

Zelensky Grigory Leonidovich  
Dr.Sci.Agric., professor  
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia*

Kazkeev Dauren Tabylytaevich  
Master of Agric. Sci., researcher of the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry

Zhanbyrbaev Eldos Almabekovich  
Master of Agric.Sci., researcher of the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry  
*Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan*

Sartbaeva Innabat Abibullaevna  
Master of Biology, Ph.D. doctoral  
*Kazakh National University named after Al-Farabi, Almaty, Kazakhstan*

Rysbekova Ayman Bokenovna  
Ph.D. (Biol. Sci.), Senior Researcher of the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry  
*Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan*

Bataeva Dariga Serikkyzy  
Master of Biology, Ph.D. doctoral  
*Kazakh State Women's Pedagogical University, Almaty, Kazakhstan*

The anthers of glutinous rice variety Violetta (1400) have been grown in medium N6 producing 72 calluses. Transplanting the calluses to regeneration medium MS gave 7 green fertile plants and one sterile. After 10 months the long cultivated calluses of the glutinous rice Violetta produced regenerated plants. They were passed onto MS medium containing 5 mg/l 6-benzylaminopurine and 1 mg/l IAA. Clonal reproduction was used for production of more haploid regenerated plants

Keywords: GLUTINOUS RICE, BREEDING, ANTHER CULTURE, CONTENT OF AMYLOSE, PERSPECTIVE LINES

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛИНИИ

Рис является основным продуктом питания более половины населения земного шара. Для другой половины – это ценный диетический продукт. По калорийности, легкой усвояемости и диетическим свойствам рисовая крупа занимает одно из первых мест среди всех видов круп [4].

Рис выращивают как во влажных тропиках, так и в полусухих районах с умеренно теплым климатом, на тяжелых глинистых и на бедных песчаных почвах. Он может расти на сухих полях и затопленных участках, в пресной и соленой воде. Широкая приспособляемость риса объясняется существованием огромного количества сортов. К примеру, в Индии зарегистрировано более 5 тысяч возделываемых сортов этой культуры. В Международном институте риса (на Филиппинах) создана коллекция сортов, форм и видов риса, в которую включено более 100 тысяч образцов. Практически для любых условий можно подобрать подходящий сорт риса, если имеется в достаточном количестве тепло, солнечный свет и вода [4].

В Казахстане рис является основной культурой орошаемого земледелия. Ежегодно здесь выращивают от 280 до 350 тыс. тонн риса-сырца. После заготовки зерна под семена на будущий год и переработки оставшегося объема производится около 130–140 тыс. тонн рисовой крупы. При этом среднегодовое потребление риса в стране составляет порядка 110–120 тысяч тонн. Рисоводство является одной из сельхозотраслей, в которой полностью достигнута продовольственная безопасность Казахстана: уровень самообеспеченности населения страны рисом достигает 116–120 %. В 2012 году, в целом по стране, выращено риса-сырца чуть более 420 тыс. тонн, на площади посева 89,6 тыс. га, при средней урожайности 46,8 ц/га. Около 90 % казахского риса производится в Кызылординской области. В перечень допущенных к использованию в этом регионе включены пять сортов риса местной селекции: Маржан, Арал 202, Ару, КазНИИР-5 и Тогускен 1 и

пять – российской селекции: Янтарь, Лидер, Новатор, Фишт и Анаит [6]. Все эти сорта относятся к обычному амилозному рису.

По биохимическому составу рис бывает обычным и восковым (глиутинозным или «клейким»). Обычные сорта риса богаты и амилозой (от 8 до 37 %) и амилопектином, а у глиутинозного риса влажное зерно клейкое и он отличается низким содержанием амилозы ( $> 2\%$ ) [9].

Так называемые глиутинозные сорта риса составляют особую группу. Они в мировой практике предназначены для выработки продуктов специального детского, лечебного и диетического питания. В России созданы два таких сорта: Виола и Виолетта. Сорта – короткозерные. Крупа белая, восковидная, выход крупы – 68–69 %. Содержание белка в зерне 6,5–7,5 %. Новизна сорта Виола защищена патентом Российской Федерации на селекционное достижение № 0946 от 03.04.2001 г., а сорта Виолетта – патентом РФ на селекционное достижение № 3647 от 25.08. 2007 г. [5]. Отличительная особенность Виолы и Виолетты в том, что в крупе их незначительное содержание амилозы или полное ее отсутствие (0,0–1,6 %) и высокое содержание амилопектина. Это способствуют быстрой набухаемости, повышенной клейкости и высокой обволакивающей способности сваренной каши. Кашу этих сортов, благодаря обволакивающим свойствам, рекомендуют в качестве диетического продукта для больных с нарушениями функций пищеварительного тракта. Мука из крупы Виолы и Виолетты может использоваться как компонент продуктов детского питания, в частности, в сухих и жидких молочных смесях на зерновой основе, приближенных по составу к женскому молоку [3].

Глиутинозный рис пользуется популярностью среди отдельных групп населения Казахстана. Для обеспечения продовольственной безопасности страны необходимо создание собственных высокопродуктивных глиутинозных сортов риса, адаптированных к местным условиям возделывания [7].

В настоящее время в селекции риса многих стран широко используют биотехнологические методы, позволяющие повысить результативность селекционного процесса [10]. Одним из них является метод гаплоидной биотехнологии, которая позволяет получить стабильное растение за одно поколение [8]. Для массового получения гаплоидов риса наиболее эффективным является метод культуры изолированных пыльников и микроспор.

Целью исследований являются получение дигаплоидных аналогов российского глютинозного сорта Виолетта и отбор перспективных линии по низкому содержанию амилозы с последующим вовлечением их в селекционный процесс для получения отечественного глютинозного сорта, адаптированного к условиям Казахстана.

**Материал и методы.** Объектом исследований является российский глютинозный сорт риса Виолетта.

Для индукции каллусогенеза пыльники сорта Виолетта пассировали на питательную среду N6 с добавлением 2,4-Д в концентрации 2 мг/л. Регенерацию каллусов проводили на среде МС, содержащей 5 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК.

Электрофоретический анализ запасных белков риса проводили в ПААГе 10 и 12 % концентрации модифицированным методом Laemmli [1].

**Результаты и их обсуждение** На среде N6 культивировали 1400 пыльников глютинозного сорта Виолетта, из которых получено 72 каллуса. При пересадке каллусов на регенерационную среду МС получено 7 зеленых фертильных и 1 стерильное растение. Из длительного культивируемых каллусов через 10 месяцев получены растения-регенеранты из глютинозного сорта Виолетта. Эти регенеранты пассировали на среду МС содержащий 5 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК. На третий неделе культивирования наблюдали кущение регенерантов (рис. 1).



Рисунок 1. Регенеранты глютинозного сорта Виолетта

Для получения большего количества гаплоидных регенерантов было проведено клональное размножение. Регенерант гаплоид сорта Виолетта делили на 8 отдельных растений. После двух недель культивирования на регенерационной среде МС, растения регенеранты переводили на безгормональную среду МС для развития корневой системы. Через месяц культивирования на безгормональной среде растения с хорошо развитой корневой системой отмывали от питательной среды в проточной воде и переводили на почвенно-торфяную смесь. После адаптации растений к почве, переводили в вегетационные сосуды для получения семенного поколения. Среди регенерантов наблюдались гаплоидные растения, которые были стерильными.

Одной из альтернатив получения фертильных растений из стерильных регенерантов гаплоидов является метод культивирования стеблевых узлов (рис. 2).

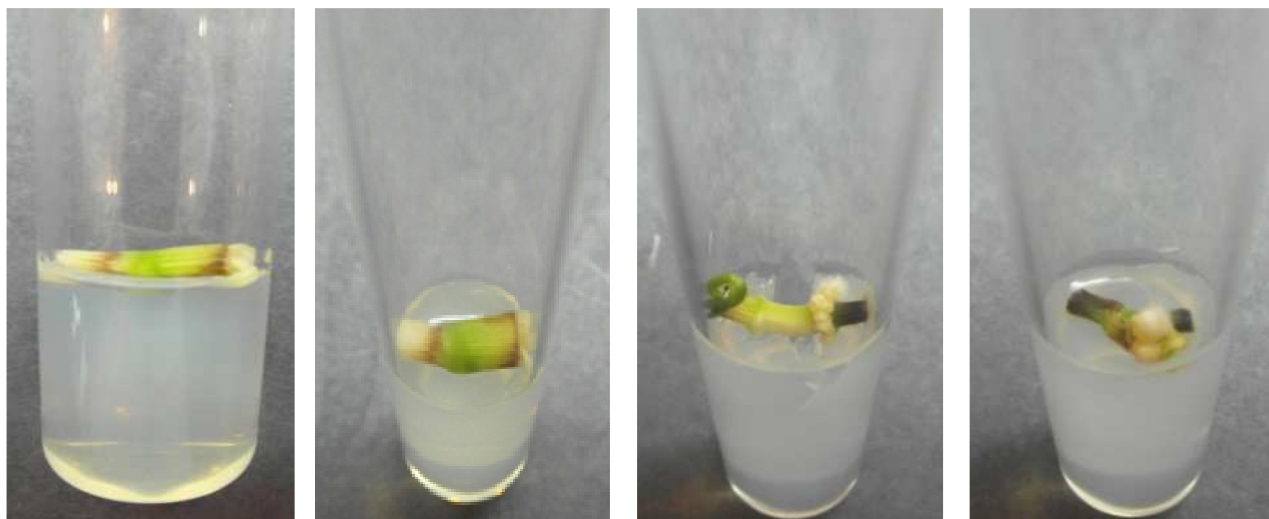


Рисунок 2. Стеблевые узлы глютинозного риса на среде для регенерации

В стеблевых узлах находятся меристематические клетки, из которых можно регенерировать целое растение. В результате активного роста меристем в *in vitro* происходит спонтанное удвоение хромосом. Во ВНИИ риса (г. Краснодар) используют метод стеблевых узлов и зачаточных побегов для получения фертильных удвоенных из гаплоидных растений. Для получения регенерантов из стеблевых узлов срезали стебли гаплоидных растений и пересаживали на среду МС, содержащую 2 мг/л 2,4-Д для регенерации. В условиях оранжереи ИББР из глютинозных регенерантов получено семенное поколение (рис. 3).



Рисунок 3. Растения-регенеранты из глютинозного сорта Виолетта в фазе полной спелости

В исследованиях российских ученых установлена различная отзывчивость на культуру пыльников у сортов, видов и подвидов риса. Максимальная – отмечена у глютинозного риса, далее следуют: подвид *japonica*, *japonica/indica* гибриды, *indica/indica* гибриды и подвид *indica* [2]. В результате проведенных нами исследований установлено, что у растений глютинозного дигаплоида наблюдается превышение показателей хозяйственно-ценных признаков по сравнению с исходной формой. Исключение составили высота растений и стерильность (пустозерность) метелок (табл. 1).

**Таблица 1** – Показатели хозяйственно-ценных признаков сорта Виолетта и дигаплоидов, полученных из сорта Виолетта

Признаки	Виолетта (контроль)	Дигаплоид из Виолетты
Высота растений, см	72,8±5,1	71,5±4,4
Диаметр стебля, мм	2,9±0,5	3,7±0,4
Кустистость, шт.	2,5±0,4	10,1±1,1
Длина флагового листа, см	29,3±2,2	23,1±2,7
Ширина флагового листа, см	1,1±0,1	1,2±0,1
Длина метелки, см	11,8±1,5	14,3±1,3
Количество колосков в метелке, шт.	56,0±4,4	92,5±4,4
Количество зерновок метелки, шт.	42,7±1,7	67,1±5,6
Пустозерность, %	16,2±1,7	26,6±4,1
Масса зерна с главной метелки, г	1,3±0,4	1,5±0,1
Масса зерна с 1 растения, г	2,5±0,7	5,8±0,8
Масса 1000 зерен, г	25,4±0,7	23,7±1,7

Для установления сходства и (или) различия полученных регенерантов с исходным глютинозным сортом Виолетта у всех растений были проведены биохимические анализы по содержанию амилозы и электрофоретические анализы запасных белков семян. Установлено, что все дигаплоидные линии внутрисортных типов сорта Виолетта по содержанию амилозы относятся к группе с очень низким содержанием амилозы. При этом наблюдался разброс данных от 1,86 до 5,32 % (табл. 2). Считаем, что причиной расщепления линий по содержанию амилозы могут являться мутации. Их частота в диплоидных линиях, полученных в культуре пыльников, оказывается значительно выше, чем в обычных условиях.

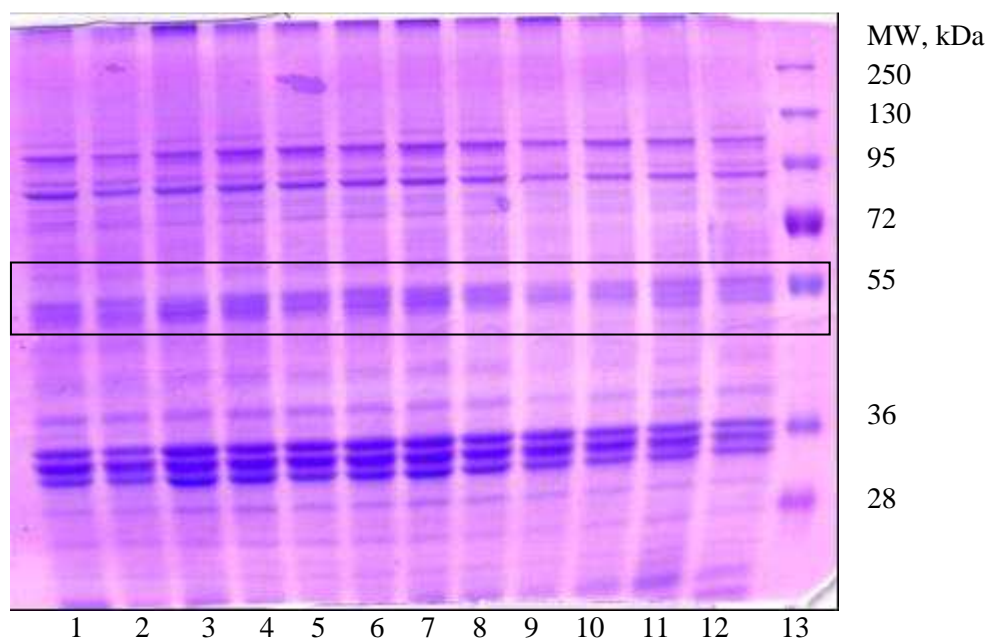


**Таблица 2** – Содержание амилозы у сорта Виолетта и дигаплоидных линиях

Образцы	Содержание амилозы, %
<b>Виолетта контроль</b>	<b>3,17</b>
Виолетта дигаплоид №1	3,17
<b>Виолетта дигаплоид №1а</b>	<b>1,86</b>
Виолетта дигаплоид №2	3,64
Виолетта дигаплоид №2а	3,54
<b>Виолетта дигаплоид №3</b>	<b>2,33</b>
<b>Виолетта дигаплоид №3а</b>	<b>2,24</b>
Виолетта дигаплоид №4	5,32
<b>Виолетта дигаплоид №4а</b>	<b>2,52</b>
Виолетта дигаплоид №5	4,10
<b>Виолетта дигаплоид №5а</b>	<b>2,80</b>
<b>Виолетта дигаплоид №6</b>	<b>2,52</b>
Виолетта дигаплоид №6а	3,17
Виолетта дигаплоид №7	3,92
Виолетта дигаплоид №7а	4,50

В то же время по спектру запасных белков отмечена вариация между линиями по интенсивности отдельных полос в зоне компонентов с молекулярной массой около 55 кДа (выделены рамкой). Это подтверждает расщепление линий по содержанию амилозы в культуре пыльников (рис. 4).

Проведение такого двойного контроля создаваемых дигаплоидных растений риса позволяет с высокой надежностью проводить селекционный отбор нужных генотипов.



- 1,2 – Виолетта (амилоза 3,17%);  
 3,4 – Виолетта дигаплоид №1 (содержание амилозы 3,17%);  
 5,6 – Виолетта дигаплоид №2 (содержание амилозы 3,64%);  
 7,8 – Виолетта дигаплоид №3 (содержание амилозы 2,33%);  
 9,10 – Виолетта дигаплоид №5 (содержание амилозы 4,10%);  
 11,12 – Виолетта дигаплоид №6 (содержание амилозы 2,52%);  
 13 – Белковый маркер.

**Рисунок 4. Электрофореграмма спектра запасных белков у дигаплоидов сорта Виолетта**

Таким образом, в ходе проведенных работ по оптимизации условий получения глютинозных дигаплоидов в культуре пыльников впервые созданы перспективные линии с низким содержанием амилозы (от 1,86 до 3,17 %), которые по морфологическим признакам отличаются от донорского сорта Виолетты. Эти дигаплоидные линии послужат в качестве исходного материала при селекции первого казахстанского глютинозного сорта риса.

#### **Список литературы**

1. Булатова К.М. Изучение компонентного состава глютеина пшеницы / К.М. Булатова // Вестник с.-х. науки Казахстана. – 1985, №4. – С. 37–39.
2. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса / Ю.К. Гончарова. – Краснодар, 2012. – 91 с.

3. Зеленский Г.Л. Эксклюзивные сорта в селекции ВНИИ риса. / Г.Л. Зеленский, Н.Г. Туманьян, Т.Н. Лоточникова, С.В. Лоточников, С.Г. Ефименко // Рисоводство. – 2004. – №4. – С. 20–23.

4. Зеленский Г.Л. Рис как продукт для диетического и лечебного питания / Г.Л. Зеленский // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2011. – №08(072). С. 28 – 42. – Шифр Информрегистра: 0421100012\0346, IDA [article ID]: 0721108002. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/08/pdf/02.pdf>.

5. Зеленский Г.Л. Российские сорта риса для детского и лечебного питания / Г.Л. Зеленский, О.В. Зеленская // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2011. – №08(072). С. 1 – 27. – Шифр Информрегистра: 0421100012\0342, IDA [article ID]: 0721108001. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/08/pdf/01.pdf>.

6. Зеленский Г.Л. Рисоводство Казахстана: состояние и перспективы / Г.Л. Зеленский // Рисоводство. – Краснодар, 2013. – Вып. 2 (23). – С. 51-57.

7. Научные основы и практика рисоводства в Казахстане / Сборник статей. Отв. редакторы: Л.К. Мамонов, Б.А. Сарсенбаев. Алматы: «Тоганай Т», 2012. – 320 с.

8. Рахимбаев И.Р. Экспериментальная гаплоидия в культуре пыльников и микроспор зерновых злаков / И.Р. Рахимбаев, Ш. Тивари, Б.Р. Кударов // Сельскохозяйственная биотехнология. – 1990. – №3. – С.44-55.

9. Sano Y. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm / Y. Sano // Theor. Appl. Genet. – 1984. – V68. – P. 467-473.

10. Silva and WJ Ratnayake. Anther culture potencial of *indica* rice varieties, Kurulu thuda and BG 250 TD / Silva and WJ Ratnayake // Tropical Agricultural Research & Extension 12(2): 2009. – P.53-56.

#### References

1. Bulatova K.M. Izuchenie komponentnogo sostava gljutenina pshenicy / K.M. Bulatova // Vestnik s.-h. nauki Kazahstana. – 1985, №4. – S.37-39.

2. Goncharova Ju.K. Ispol'zovanie metoda kul'tury pyl'nikov v selekcii risa / Ju.K. Goncharova. – Krasnodar, 2012. – 91 s.

3. Zelenskij G.L. Jekskljuzivnye sorta v selekcii VNII risa. / G.L. Zelenskij, N.G. Tuman'jan, T.N. Lotochnikova, S.V. Lotochnikov, S.G. Efimenko // Risovodstvo. – 2004. – №4. – С. 20-23.

4. Zelenskij G.L. Ris kak produkt dlja dieticheskogo i lechebnogo pitaniija / G.L. Zelenskij // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [Jelektronnyj resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2011. – №08(072). S. 28 – 42. – Shifr Informregistra: 0421100012\0346, IDA [article ID]: 0721108002. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2011/08/pdf/02.pdf>.

5. Zelenskij G.L. Rossijskie sorta risa dlja detskogo i lechebnogo pitaniija / G.L. Zelenskij, O.V. Zelenskaja // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [Jelektronnyj resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2011. – №08(072). S. 1 – 27. – Shifr Informregistra: 0421100012\0342, IDA [article ID]: 0721108001. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2011/08/pdf/01.pdf>.

6. Zelenskij G.L. Risovodstvo Kazahstana: sostojanie i perspektivy / G.L. Zelenskij // Risovodstvo. – Krasnodar, 2013. – Vyp. 2 (23). – S. 51-57.

7. Nauchnye osnovy i praktika risovodstva v Kazahstane / Sbornik statej. Otv. redaktery: L.K. Mamonov, B.A. Sarsenbaev. Almaty: «Toganaj T», 2012. – 320 s.

8. Rahimbaev I.R. Jeksperimental'naja gaploidija v kul'ture pyl'nikov i mikrospor zernovyh zlakov/ I.R. Rahimbaev, Sh. Tivari, B.R. Kudarov // Sel'skohozjajstvennaja biotehnologija. – 1990. – №3. – S.44-55.

9. Sano Y. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm / Y. Sano // Theor. Appl. Genet. – 1984. – V68. – P. 467-473.

10. Silva and WJ Ratnayake. Anther culture potencial of *indica* rice varieties, Kurulu thuda and BG 250 TD / Silva and WJ Ratnayake // Tropical Agricultural Research & Extension 12(2): 2009. – P.53-56.