

УДК 633/635:631.52; 633.1

<sup>1</sup>Д.Т. Казкеев\*, <sup>2</sup> Н.Н. Спатай,  
<sup>1</sup>Б.Н. Усенбеков,  
<sup>1</sup>А.Б. Рысбекова, <sup>1</sup>Е.А. Жанбырбаев, <sup>1</sup>Б.И. Мошан,  
<sup>3</sup>Д.С. Батаева, <sup>4</sup>А. Мухамежан

<sup>1</sup>Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК,  
Республика Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный аграрный университет, Республика Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup>Казахский государственный женский педагогический университет,  
Республика Казахстан, г. Алматы

<sup>4</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби,  
Республика Казахстан, г. Алматы

\*E-mail: dauren.kazkeyev@gmail.com

### **Агрономическая характеристика образцов и дигаплоидов риса, полученных в культуре пыльников**

В статье приведены данные применения гаплоидной технологии в селекции глютинозного риса. В результате многолетних исследований в ИББР впервые получены дигаплоиды риса и проведены полевые испытания в рисосеющих регионах республики. Для получения гаплоидов риса было использовано 24 гибрида, 2 линии и 9 сортов отечественной и зарубежной селекции. Пыльники культивировали на питательной среде N6, содержащей 2 мг/л 2,4 Д и 90 г/л мальтозы. В результате исследований созданы перспективные выравненные дигаплоидные линии и проведены их полевые испытания в условиях Алматинской области. Проведен структурный анализ по хозяйственно-ценным признакам аналогов и дигаплоидов риса, выращенных в полевых условиях. Скрининг на содержание амилозы выявило генотипы с низким содержанием амилозы (от 1,86 до 3,17%), представляющие интерес для селекции глютинозного риса. Выявлены дигаплоиды F<sub>1</sub> GS-207, F<sub>1</sub> BR-4 с высоким ИНР в условиях 0,75% хлоридного засоления.

**Ключевые слова:** глютинозный рис, дигаплоид, растения регенеранты, интегральный физиологический показатель.

D.T. Kazkeyev, N.N. Spatay,  
B.N. Usenbekov, A.B. Rysbekova, E.A. Zhanbyrbayev, D.S. Batayeva,  
B.I. Moshan, A. Muhametzhon

### **Agronomic characteristics of samples and dihaploids of rice obtained in anther culture**

The paper presents the application of haploid technology in glutinous rice breeding. As a result of years of research in IPBB, Kazakhstan first obtained dihaploid rice and field tested in the rice-growing regions of the country. For obtaining doubled haploids of rice 24 hybrids, 2 lines and 9 varieties of domestic and foreign rice breeding were used. Anthers were cultured on N6 medium containing 2 mg / l 2,4 D and 90 g / l maltose. As a result of study, perspective aligned doubled haploid lines were created and their field test was carried out under the Almaty region. The structural analysis of economically-valuable attributes analogues and doubled haploids rice were grown in the field. Screening for the amylose content of genotypes was showed low amylose content (from 1.86 to 3.17%) representant interest for glutinous breeding rice. It was identified doubled haploids F<sub>1</sub> GS-207, F<sub>1</sub> BR-4 with high initial growth under 0.75% chloride salinity.

**Key words:** glutinous rice, dihaploid, regenerated plants, integrated physiological parameters.

Д.Т. Казкеев, Н.Н. Спатай,  
 Б.Н. Усенбеков, А.Б. Рысбекова, Е.А. Жанбырбаев, Д.С. Батаева,  
 Б.И. Мошан, А. Мухамежан  
**Тозаң дақылдау әдісі бойынша алынған күріш аналогтарының  
 және дигаплоидтарының агрономиялық сипаттамасы**

Берілген мақалада глютинозды күріш селекциясында гаплоидты технологияны қолдану келтірілген. Көп жылдық зерттеу нәтижесінде ӨББИ-да алғаш дигаплоидты күріш алынды және республиканың күріш өсіруші аймақтарында далалық тәжірбиелер жүргізілді. Дигаплоидтар және олардың аналогтары шаруашылық құнды белгілері бойынша ерекшеленеді. Күріштің гаплоидтарын алу үшін отандық және шетелдік селекцияның 24 гибридтері, 2 линиялары және 9 сорттары қолданылды. Тозаңдар құрамында 2 мг/л 2,4 Д және 90 г/л мальтоза бар қоректік ортада өсірілді. Зерттеу нәтижесінде біркелкі перспективті дигаплоидтар алынды және олардың Алматы облысы жағдайында далалы сынағы жүргізілді. Далалы жағдайда өсірілген дигаплоидтар мен олардың туындыларына шаруашылық-құнды белгілері бойынша құрылымдық талдаулар жасалды. Амилоза мөлшеріне скрининг нәтижесі глютинозды күріш селекциясы үшін маңызды болып табылатын амилозасы төмен (1,86 ден 3,17%) генотиптерді айқындады. 0,75% хлоридті тұздану жағдайында алғашқы өсі индексі жоғары дигаплоидтар анықталды.

**Түйін сөздер:** глютинозды күріш, дигаплоид, регенерант, интегралды физиологиялық көрсеткіштер.

## Введение

Выведение новых сортов самоопыляющихся растений состоит из трех основных моментов: создание изменчивости путем скрещивания, стабилизация самоопылением или беккроссом в течение нескольких поколений и отбора желательных рекомбинантов. В последние годы в селекции риса используют биотехнологические подходы позволяющие повысить результативность селекционного процесса. Для ускорения селекционного процесса применяют метод гаплоидной биотехнологии, который позволяет получать стабильное растение за одно поколение [1,2]. Для массового получения гаплоидов риса (*Oryza sativa* L.) более эффективным методом является метод культуры изолированных пыльников и микроспор. Тем не менее, этот метод все еще не находят широкого применения в практической селекции в связи с низкой частотой получения зеленых растений регенерантов.

В Республике отсутствуют глютинозные сорта, поэтому создание отечественных сортов риса является актуальной задачей.

## Материалы и методы

Для получения гаплоидов риса было использовано 24 гибрида, 2 линии и 9 сортов отечественной и зарубежной селекции. Донорные растения выращивали в оранжерее ИББР. В фазе трубкования метелки срезали и подвергали хо-

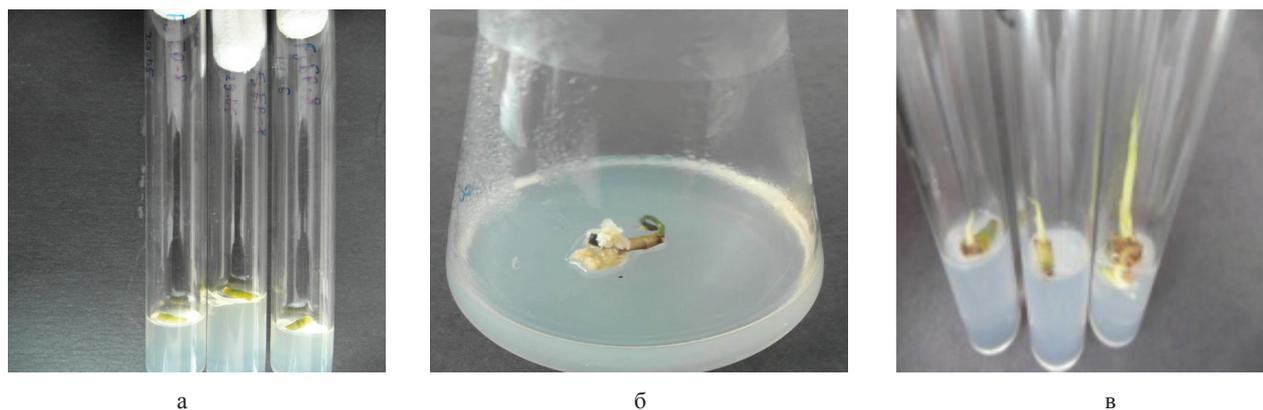
лодовой обработке при +4+7С<sup>0</sup> в течении 5-7 суток. Для индукции каллусов пыльники пассировали на питательную среду N6 [3] с добавлением 2 мг/л 2,4 Д и мальтозы в концентрации 90 г/л). На 25-е сутки культивирования наблюдали появление первых каллусов, которые при достижении размеров в диаметре более 3 мм, пассировали на регенерационную среду Мурасиге и Скуга [4] с добавлением 5 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. Зеленые растения-регенеранты отмывали от питательной среды, помещали в сосуды с водопроводной водой на 2 суток для адаптации к условиям *in vivo*. После адаптации пересаживали на почвенно-торфяную смесь и культивировали до получения семенного поколения. Полученные зерновки R<sub>1</sub> дигаплоидов риса размножали в оранжерее ИББР. Среди растений регенерантов наблюдали гаплоидные стерильные растения. Цитологический контроль уровня пloidности проводили согласно Паушевой (1992) [5].

Одной из альтернатив получения фертильных растений из стерильных регенерантов гаплоидов является метод культивирования стеблевых узлов. В стеблевых узлах находятся меристематические клетки, из которых можно регенерировать целое растение. Преимуществом удвоения числа хромосом методом культуры изолированных стеблевых узлов является избегание мутагенного эффекта по сравнению с колхицинированием, а также дешевизна. В результате активного роста меристем в *in vitro* происходит спонтанное удвоение хромосом с высокой частотой. Для спонтанного удвоения

числа хромосом, вычленили стеблевые узлы из стерильных регенерантов, стерилизовали в растворе препарата «Белизна» и дистиллированной воды в соотношении 1:3 в течении 20 минут. Стерильные узлы культивировали на среде МС с 2 мг/л 2.4 Д. На второй неделе культивирования наблюдали начало регенерации растений из стеблевых узлов (рисунок 1). Регенеранты полученные из стеблевых узлов также переводили на

почвенно- торфянную смесь и выращивали до получения семенного поколения.

Определение количественного содержание амилозы проводили согласно методу Джулиано (1971) [6]. Полевые испытания сортов, линии и дигаплоидов проводили на полях ТОО «Агрофирма Бирлик» Алматинской области, Балхашского района. После уборки урожая, проводили сноповый анализ по хозяйственно-ценным признакам.



а- стеблевые узлы из стерильных регенерантов риса; б, в- регенерация растений из стеблевых узлов

Рисунок 1 – Культура межстеблевых узлов риса.

### Результаты и обсуждение

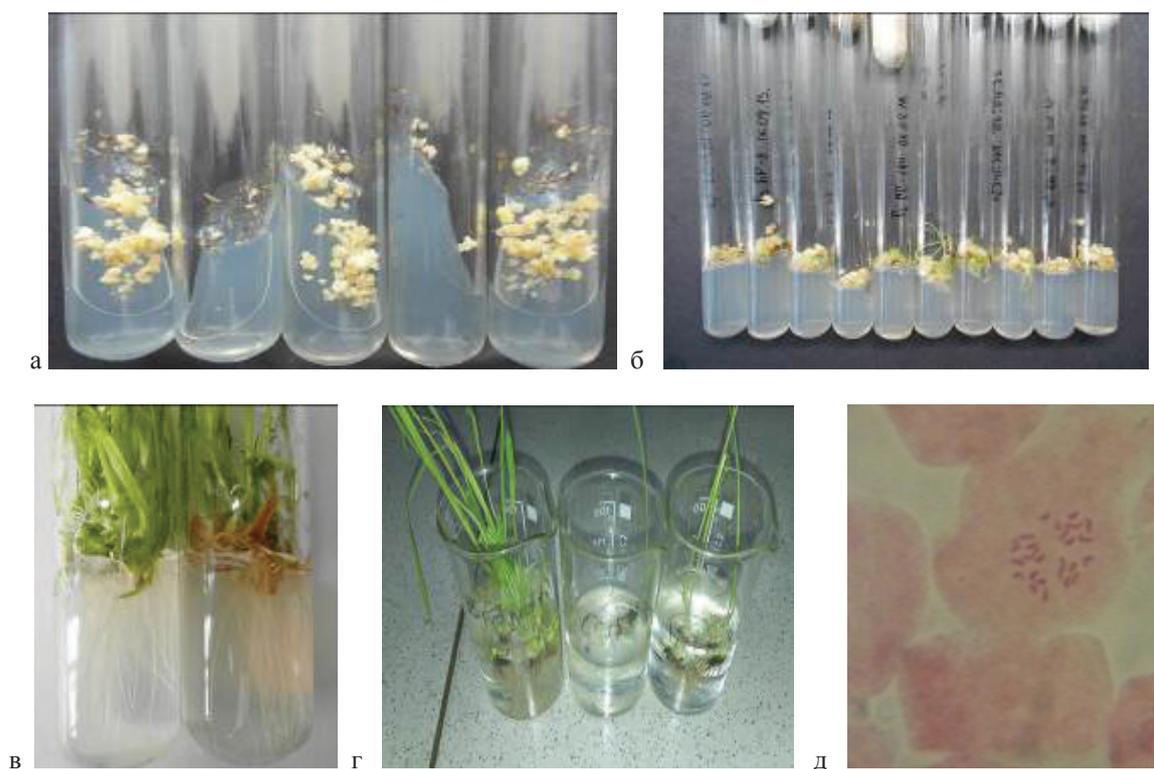
Наибольшее количество каллусов получено у гибридов  $F_1$  *Italica*,  $F_3$  БР-8,  $F_6$  КС 6-8,  $F_6$  СПЕ, где было индуцировано 56, 52, 40 и 39 каллусов соответственно. Сорт Виолетта был наиболее отзывчивым, из него было получено 72 каллусов (рисунок 2).

При пересадке, часть каллусов генотипов Баканас,  $F_3$  БР-6,  $F_3$  БР-8,  $F_6$  ГС 189 и ССП-5-6 формировали ризогенные каллусы (таблица 1).

У сортов Баканасский и Баракат количество каллусов составило 64 и 36 каллусов соответственно. Из каллусов гибрида  $F_3$  БР-8 получено 5 зеленых регенерантов и 1 альбиносное растение. В результате проведенных работ регенерировано 27 зеленых растений-регенерантов в культуре пыльников риса. Все зеленые регенеранты культивировали в оранжерее ИББР с целью получения зерновок и их размножения. В 2014 г. проводили полевые испытания контрольных образцов и их аналогов-дигаплоидов в полевых условиях Балхашского района Алматинской области для определения хозяйственно – ценных признаков (таблица 2, рисунок 2).

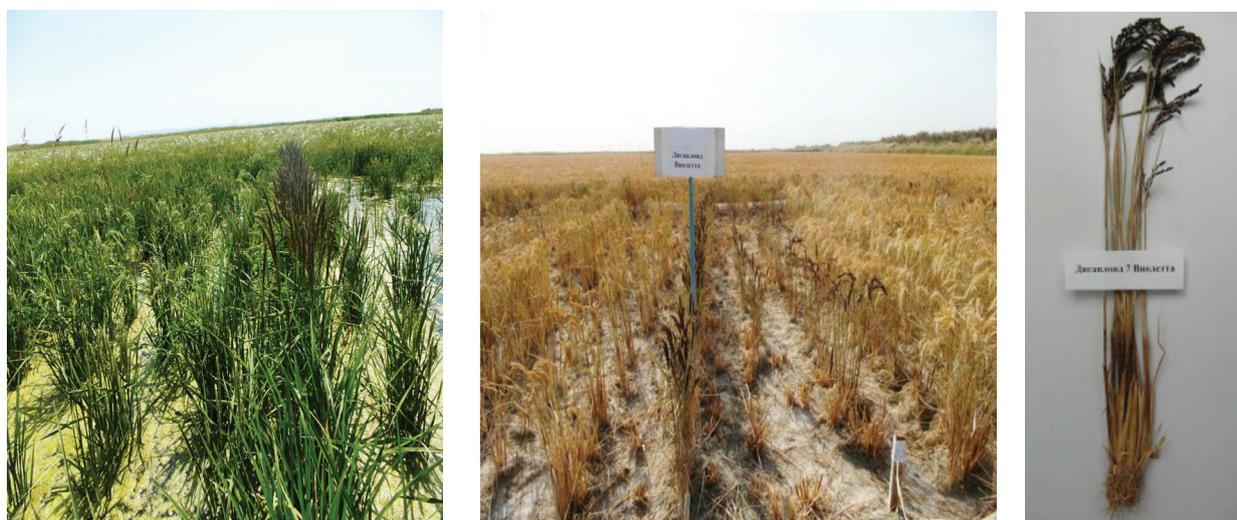
Как видно из таблицы 2 кустистость сорта Виолетта и дигаплоидов варьировало незначительно от 0,5 в контроле и до 1,1 у дигаплоида. Количество зерновок в метелке у дигаплоида 1 было на уровне контроля, в то время как у дигаплоида 2 и 3 была незначительно ниже. Дигаплоиды аналогии сорта Виолетта показали также незначительное снижение массы зерна с метелки и массу 1000 зерен, в то время как у дигаплоидов КС- 6- 8 и ССП 5-6 эти показатели были на уровне или незначительно выше по сравнению с контролем (рисунок 3).

Одним из преимуществом глютинозных дигаплоидных аналогов от основного сорта Виолетта является выравненность по габитусу растений- высоте растений, по длине метелки. Дигаплоиды, при структурном анализе, показали выравненность по сравнению с контролем. В контроле высота растений составило в среднем 68,3 при отклонении  $\pm 4,1$ , в то время как отклонение у дигаплоидов составило  $\pm 1,2$  было ниже и составило  $\pm 2,1$ , 2,5 и 2,5 % соответственно. Длина метелки дигаплоида 2 и 3 также была более выравненной по сравнению с контролем.



а – индукция каллусов, б – регенерация растений, в – индукция ризогенеза, г – адаптация растений *in vivo*, д – цитологический контроль уровня плоидности

**Рисунок 2** – Культура пыльников риса



**Рисунок 2** – Дигамплоиды Виолетты в полевых условиях Алматинской области

**Таблица 1** – Получение зеленых гаплоидных регенерантов в культуре пыльников риса

Генотипы	Количество пассированных каллусов, шт	Процент регенерации, %	Процент альбиносных растений, %	Процент ризогенных каллусов, %
Виолетта	72,0	15,2	2,7	4,1
Баканасский	64,0	3,1	1,5	3,1
Баракат	36,0	2,7	-	-
F <sub>1</sub> <i>italica</i>	52,0	-	1,9	-
F <sub>1</sub> <i>zeravshanica</i>	24,0	-	-	-
F <sub>1</sub> ГС-207	15,0	13,3	26,6	-
F <sub>1</sub> БР-4	32,0	6,2	15,6	-
F <sub>3</sub> БР-3	20,0	5	10,0	-
F <sub>3</sub> БР-8	40,0	12,5	-	2,5
F <sub>6</sub> ГС 189	4,0	-	50,0	25,0
F <sub>6</sub> КС 6-8	56,0	3,5	1,7	-
ССП-5-6	12,0	8,3	-	16,6

**Таблица 2** – Элементы структуры урожая сорта Виолетта и дигаплоидов

Генотип	Кустистость	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерновок метелки, шт	Пустозерность, шт	Масса зерна с метелки, г	Масса 1000 зерен, г
Виолетта контроль	4,2±0,5	68,3±4,1	11,6±1,3	119±10,6	8,0±0,7	2,6±0,5	24,0
Дигаплоид-1 Виолетта	5,6±0,5	76,4±2,1	22,6±1,9	119,8±8,3	13,3±1,2	2,1±0,4	20,1
Дигаплоид-2 Виолетта	3,9±0,2	57,2±2,5	12,0±0,4	122,1±11,3	33±3,8	1,4±0,3	18,0
Дигаплоид-3 Виолетта	5,4±1,1	66,4±2,5	13,2±0,7	124,3±12,0	13,9±2,4	2,4±0,8	20,7
КС- 6- 8 Контроль	4,4±1,2	65,4±2,8	13,2±0,7	126,1±35,5	13,5±8,0	3,4±0,9	28,4
Дигаплоид-1 КС- 6- 8	4,1±0,7	64,0±2,5	12,4±0,7	119,6±22,1	23,3±27,9	2,7±0,8	28,6
ССП 5-6 контроль	6,4±1,4	71,6±9,7	14±1,1	124,6±31,9	17,4±11,4	3,4±0,7	27,0
Дигаплоид ССП 5-6	4,7±1,2	59,1±3,0	12,6±0,8	104±19,3	19,7±6,8	2,6±0,6	29,0
F <sub>3</sub> БР-8 Контроль	4±0,7	66,5±5,9	13,2±0,9	75,4±19,1	17,4±8,3	2,3±0,7	31,5
Дигаплоид F <sub>3</sub> БР-8	7,8±2,5	60,1±2,6	12,9±0,8	93,9±19,3	16,2±7,2	2,1±0,4	27,0

Все дигаплоидные линии внутрисортных типов сорта Виолетта по содержанию амилозы относятся к группе с очень низким содержанием амилозы. Причиной расщепления линии по содержанию амилозы (от 1,86 до 5,32%) могут являться мутации, частота которых в диплоидных

линиях, полученных в культуре пыльников, значительно выше (таблица 3). Известно, что продолжительное культивирование растительных тканей на среде вызывает появление большого числа мутаций, как ядерных, так и соматических [7].



Рисунок 3 – Зерновки контрольных образцов и дигаплоидов риса

Таблица 3 – Содержание амилозы сорта Виолетта и дигаплоидов

Образцы	Содержание амилозы, %
Виолетта контроль	3,17
Виолетта дигаплоид главная метелка №1	3,17
Виолетта дигаплоид общая метелка №1	1,86
Виолетта дигаплоид главная метелка №2	3,64
Виолетта дигаплоид общая метелка №2	3,54
Виолетта дигаплоид главная метелка №3	2,33
Виолетта дигаплоид общая метелка №3	2,24
Виолетта дигаплоид главная метелка №4	5,32
Виолетта дигаплоид общая метелка №4	2,52
Виолетта дигаплоид главная метелка №5	4,10
Виолетта дигаплоид общая метелка №5	2,80
Виолетта дигаплоид главная метелка №6	2,52
Виолетта дигаплоид общая метелка №6	3,17
Виолетта дигаплоид главная метелка №7	3,92
Виолетта дигаплоид общая метелка №7	4,5

В дальнейшем проводили изучение интенсивности начального роста (ИНР) в условиях засоления NaCl 0,75% селекционных (дигап-

лоидных образцов F<sub>1</sub> ГС-207, F<sub>1</sub>БР-4) и коллекционных образцов. Как показали наши предыдущие исследования, ИНР – интегральный физиологический показатель, отражающий комплексную устойчивость генотипа не только к засолению, но и к холоду и анаэробизму под слоем воды. Как правило, образцы с высокой ИНР формируют и наиболее дружные всходы в полевых условиях. Полученные результаты сравнивались с показателем районированного сорта-стандарта Маржан, отличающегося очень высокими темпами начального роста. Наибольший селекционный интерес представляют формы с относительной ИНР не ниже стандартной (таблица 4).

Ранее при изучении гибридов F<sub>1</sub> наблюдали стандартный гетерозис в среднем 15-17% (115-117 % к стандарту Маржан), но проявлялся он не более чем в 5-7% комбинаций. Не исключено, что андрогенными манипуляциями удалось зафиксировать на гомозиготном уровне гетерозисный эффект в комбинациях F<sub>1</sub>БР-4 и F<sub>1</sub>ГС-207. Дальнейшие исследования и использование гаплоидной технологии, анализ других признаков, а главное – увеличение объема экспериментального материала, очень перспективно, актуально и интересно для селекции риса.

**Таблица 4** – Высота 14-суточных растений в условиях засоления (ИНР) некоторых образцов риса

Сорт, линия	Высота, см	% к стандарту
Маржан-стандарт	16,8	100
Дигаплоид F <sub>1</sub> БР-4	16,1	96
<b>Дигаплоид F<sub>1</sub> БР-4</b>	<b>17,7</b>	<b>105</b>
<b>Дигаплоид F<sub>1</sub> ГС-207</b>	<b>19,3</b>	<b>115</b>
Аналог 2	13,9	83
Акдала	11,8	71
Виолетта (Краснодар)	6,6	39
НСР <sub>05</sub>	0,94	

**Заключение**

В ходе проведенных работ созданы перспективные выравненные дигаплоидные линии и проведены их полевые испытания с низким содержанием амилозы (от 1,86 до 3,17%) и высоким ИНР в качестве перспективного материала в селекции казахстанских сортов глютинозного риса.

Исследования проведены в рамках проекта 0039/ГФ КН МОН РК: «Получение линий глютинозного риса как исходного материала в селекции эксклюзивных сортов для детского и диетического питания».

**Литература**

- 1 Jana Murovec and Borut Bohanec (2012). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, ISBN: 978-953-307-932-5. [www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding](http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding)
- 2 Forster, B.P. and Thomas, W.T. B. (2005) Doubled Haploids in Genetics and Plant Breeding, in Plant Breeding Reviews, Volume 25 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK
- 3 Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops // In Proc. Symp. On Plant Tissue Culture. Science Press. Beijing, China, 1978. – P. 43-50
- 4 Murashige T, and F Skoog. Arevised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures // Plant Physiology, 1962. – 15: P. 473-479.
- 5 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1992. – 267 с.
- 6 Juliano B.O. A simplified assay for milled rice amylose // Cereal Sci. Today. – 1971. – 16. P. 334-340.
- 7 Ю.К. Гончарова. Использование метода культуры пыльников в селекции риса.- Краснодар: ВНИИ риса, 2012.-39 с.

**References**

- 1 Jana Murovec and Borut Bohanec (2012). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, ISBN: 978-953-307-932-5. [www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding](http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding)
- 2 Forster, B.P. and Thomas, W.T. B. (2005) Doubled Haploids in Genetics and Plant Breeding, in Plant Breeding Reviews, Volume 25 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK
- 3 Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops // In Proc. Symp. On Plant Tissue Culture. Science Press. Beijing, China, 1978. – P. 43-50
- 4 Murashige T, and F Skoog. Arevised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures // Plant Physiology, 1962. – 15: P. 473-479.
- 5 Pausheva Z.P. Workshop on cytology plants. – М.: Kolos, 1992. – 267 p.
- 6 Juliano B.O. A simplified assay for milled rice amylose // Cereal Sci. Today. – 1971. – 16. P. 334-340.
- 7 J.K. Goncharova. The use of anther culture in rice breeding.- Krasnodar Rice Research Institute, 2012.-39.