

УДК: 631.52. 633. 633.1; 635

А.Б. Рысбекова, Т.Т. Турдиев, Д.Т. Казкеев, Е.А. Жанбырбаев, Б.Н. Усенбеков,
И.А. Сартбаева, Б.И. Мошан

Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: aiman_rb@mail.ru

Восстановление всхожести семян методом биотехнологии для пополнения коллекции использования в селекции риса с окрашенным перикарпом

В исследовательской работе приведены данные по оптимизации состава питательной среды для восстановления всхожести семян риса с окрашенным перикарпом.

Ключевые слова: рис с окрашенным перикарпом, биотехнология, восстановление всхожести семян, селекция.

А.Б. Рысбекова, Т.Т. Турдиев, Д.Т. Казкеев, Е.А. Жанбырбаев, Б.Н. Усенбеков, И.А. Сартбаева, Б.И. Мошан
Перикарпы боялған күріш коллекциясын толықтыру және селекцияда қолдану үшін биотехнология әдісімен дәннің өңгіштігін қалпына келтіру

Зерттеу жұмысында перикарпы боялған күріш дәннің өңгіштігін қалпына келтіру мақсатында қоректік органы оңтайландыру бойынша мәліметтер келтірілген.

Түйінді сөздер: перикарпы боялған күріш, биотехнология, дәннің өңгіштігін қалпына келтіру, селекция.

A.B. Rysbekova, T.T. Turdiev, D.T. Kazkeyev, Ye.A. Zhanbyrbayev, B.N. Ussenbekov, I.A. Sartbayeva, B.I. Moshan
Recovery of seed germination by biotechnology methods for the collection and using in colored rice breeding

In this paper presents data on the optimization of the nutrition medium for the recovery of seed germination of colored rice.

Keywords: colored pericarp rice, recovery of seed germination, biotechnology, rice breeding.

Рис является основным продуктом питания более половины населения земного шара, выращивается в 108 странах мира на площади более 145 млн. га., занимая второе место после пшеницы [1]. Наряду с рисом имеющий белый перикарп, существуют сорта риса с пурпурной, красной, коричневым, желтой и черным перикарпом [2, 3]. Окраска зерновки риса обусловлена пигментацией склеренхимы и перикарпа. В отличие от белого шлифованного риса, такие зерновки богаты биологически активными веществами, антиоксидантами, витаминами, макро- и микроэлементами. Эти компоненты снижают риск возникновения сердечно-сосудистых, онкологических и ряда других заболеваний [4-7].

Пополнения коллекции ИББР новыми сортообразцами зарубежной селекции и их изучения, вовлечения в селекцию обогащают банк генетических ресурсов страны и обеспечивают продовольственную безопасность Казахстана. В настоящий момент коллекция ИББР риса с окрашенным перикарпом насчитывает 14 перспективных

образцов (10 красных, 4 черных) из мировой коллекции, что позволяет вести целенаправленные селекционные работы по созданию отечественных исходных форм и линии риса с окрашенным перикарпом. Эти образцы риса с окрашенным перикарпом отличаются от сорно-полевых осыпающихся форм неосыпаемостью, что объясняется присутствием рецессивных аллелей (*sh1*, *sh2*), которые обеспечивают неосыпаемость культурных сортов риса [8]. В Казахстане исследования по рису с окрашенным перикарпом не проводились, что привело к отсутствию отечественных сортов красного и черного риса. Импортируемый рис сокращенным перикарпом (в частности «Черный рис») в 5-6 раз дороже обычного белозерного риса, что делает его недоступным для широких слоев населения.

Период хранения риса в виде семян составляет не более 2-3 лет, после чего происходит резкое снижение всхожести [9]. При неблагоприятных погодных условиях, длительном и неправильном хранении семян

возникает проблема потери всхожести ценного генетического материала [10]. Некоторые образцы риса с окрашенным перикарпом из коллекции были в ограниченном количестве и имели низкую всхожесть.

Целью исследований является восстановление всхожести семян биотехнологическим методом для пополнения коллекции и использования в селекции риса с окрашенным перикарпом.

Материалы и методы

В работе были использованы генотипы риса с окрашенным перикарпом: Черный рис, F₁ ♀Рубин × ♂ВНИИР 10178. При предварительном проращивании перед посевом у данных образцов лабораторная и полевая всхожесть была нулевая.

Для восстановления всхожести семена риса подвергали стрессовым воздействиям низкой температурой. Зерновки риса помещали в криопробирки и погружали в жидкий азот (ЖА) на 1 час. В качестве контроля использовали семена, не подвергнутые стрессу.

После замораживания в ЖА для проращивания *in vitro* зерновки риса стерилизовали 75% раствором белизны, 1% деохлором и 3% раствором TWEEN 20 (экспозиция 20 мин.). После стерилизации для выявления скрытой инфекции зерновки культивировали на провокационной питательной среде VISS в состав которой входит: сахара 10 г/л; гидролизат казеина 8

г/л; дрожжевой экстракт 4,0 г/л; КН₂РО₄ – 2,0 г/л; MgSO₄·7H₂O – 0,15 г/л; джелрайт 6,0 г/л; рН 6,9.

После подбора оптимальных условий стерилизации для проращивания семян, использовали 2 варианта питательной среды: МС без гормонов; МС, БАП-2,0 мг/л, НУК-0,5 мг/л, ГК-5,0 мг/л. Семена культивировали в светокультуральном помещении в чашках Петри при температуре 24°C и 16-часовом фотопериоде. В дальнейшем полученные регенеранты пересаживали в почвенно-торфянную смесь и выращивали до получения зерновок.

Результаты и их обсуждение

В результате исследований было выявлено, наиболее оптимальным стерилизующим агентом является 75% раствор белизны и 3% раствор TWEEN 20 (экспозиция 20 мин.). Заражаемость при обоих вариантах составила -10%, по сравнению с 1% раствором деохлора в течение 20 мин. при котором заражаемость достигала до 70 % (таблица 1). Проверка на провокационной среде VISS, показала эффективность полученных результатов по стерилизации зерновок риса. На всхожесть семян черного риса положительно влияет замораживание в жидком азоте, при этом всхожесть семян после ЖА и в дальнейшем проращиваний на среде МС: 2,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК и 5,0 мг/л ГК составила 30,0% (таблица 2).

Таблица 1 – Оптимизация условия стерилизации черного риса

Стерилизующие агенты	Высажено, шт.	Инфицировано	
		шт.	%
Деохлор 1%	10	7	70
Белизна 75%	10	1	10
Tween 3%	10	1	10

Таблица 2 – Влияние жидкого азота на всхожесть семян риса

Название образца	Посажено, шт.		Всхожесть, шт.	
	Контроль	ЖА	Контроль	ЖА
Черный рис (Китай)	10	10	0	1
	10	10	0	0
	10	10	0	2
Итого:	30	30	0	3/30

Оптимальной являлась питательная среда МС со следующим составом фитогормонов: 2,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК и 5,0 мг/л ГК.

После появления всходов в стерильных условиях проростки пересаживали на агаризованную питательную среду ½ МС без

гормонов. Проростки культивировали в светокультуральной комнате до появления 2-3 листочков (рисунок 1, а). После появления первых 2-3 листочков и корешков, извлекали из пробирок и помещали в раствор с ИУК-1,0 мг/л для нарастания массы корней. Через 3-4 суток растения с развитыми корнями пересаживали в

сосуды с почвой (рисунок 1, б) и выращивали в оранжерее до полного созревания семян.

В условиях оранжереи период вегетации черного риса составило -110 дней, длина метелки - 27 см (рисунок 2 а), пустозерность – 11%, число зерен (рисунок 2 в) в метелке - 140 шт.

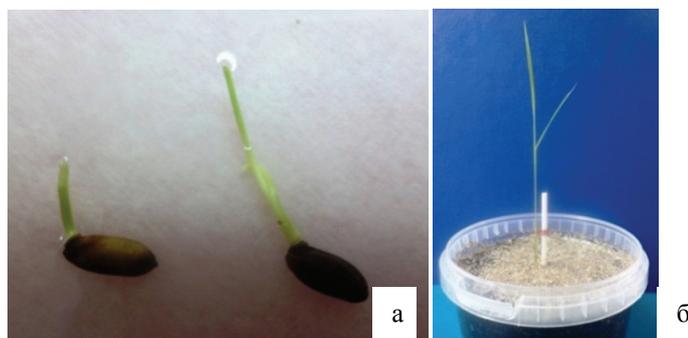


Рисунок 1 – а) прорастание семян черного риса после ЖА; б) проращивание черного риса в почвенном субстрате



Рисунок 2 – Метелки (а) и семена (б) восстановленного черного риса (Китай)

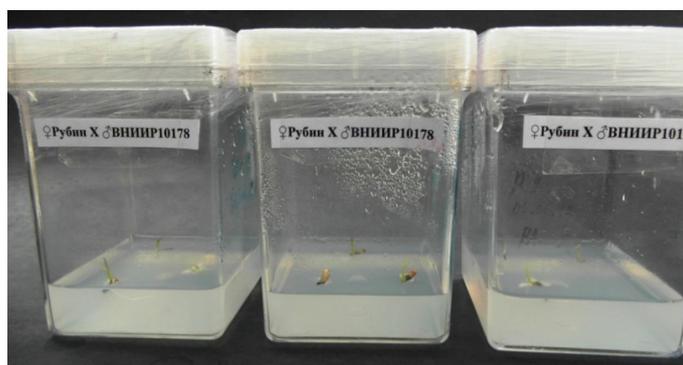


Рисунок 3 – Гибриды F_1 ♀Рубин × ♂ВНИИР 10178 на безгормональной агаризованной питательной среде МС

В результате гибридизации ♀Рубин × ♂ВНИИР 10178 получены зерновки F_1 гибрида,

которые были щуплыми и недоразвитыми эндоспермами. Для получения всхожести и

полноценных растений гибридные зерновки культивировали на питательной среде МС с 0,5 мг/л БАП и ГК и 0,2 мг/л ИМК. Всхожесть гибрида ♀Рубин × ♂ВНИИР 10178 составила 100%, что позволило получить максимальное количество проростков гибридных растений. Проростки пересаживали на безгормональную агаризованную питательную среду МС, содержащую половинный набор макро и микроэлементов (рисунок 3). Проростки культивировали в светокультуральной комнате до появления 2-3 листочков и корешков, в дальнейшем помещали в раствор с ИУК-1,0 мг/л для

наращивания корневой массы. Через 3-4 суток растения с хорошо развитой корневой системой пересаживали в вегетационные сосуды (рисунок 4 а) и культивировали до полного созревания (рисунок 4 б, в). В результате проведенной работы оптимизировано условия стерилизации зерновок с окрашенным перикарпом, подобраны питательные среды для получения полноценных растений, восстановлен исходный материал риса с низкой всхожестью и пополнена коллекция риса с окрашенным перикарпом для селекции.

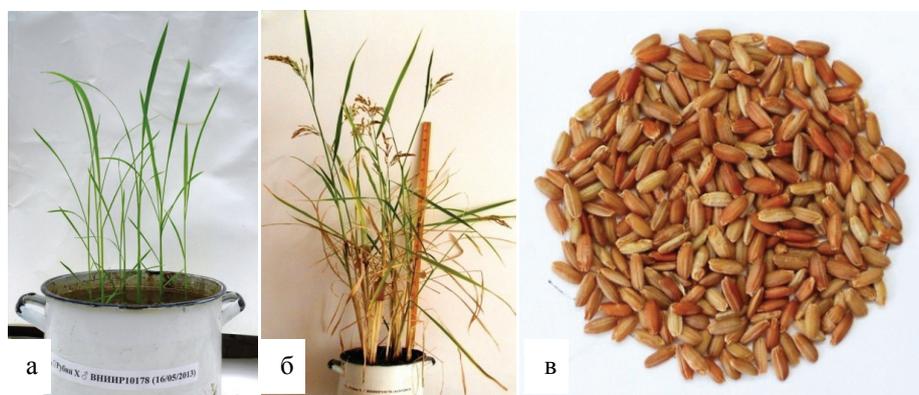


Рисунок 4 – Гибрид F₁ ♀Рубин × ♂ВНИИР 10178 в фазе всходов (а) и полного созревания семян (б, в)

Литература

- 1 Костылев П.И., Парфенюк А.А., Степова В.И. Северный рис (генетика, селекция, технология) - Ростов-на-Дону, 2004. - 576 с.
- 2 Давоян А.Е. Оценка исходного материала риса с окрашенным перикарпом в целях создания сортов с высокими пищевыми достоинствами // Рисоводство. – 2012. - №1 (19). [http://zhros.ru/num19\(1\)_2012/pdf/st08_01_2012-19_davodjan.pdf](http://zhros.ru/num19(1)_2012/pdf/st08_01_2012-19_davodjan.pdf)
- 3 Furukawa T, Maekawa M, Oki T, Suda I, Iida S, Shimada H, Takamura I, Kadowaki K. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp // Plant J. – 2006. – V. 49. – P. 91-102.
- 4 Yawadio R., Tanimori S. and Morita N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rice's and their aldose reductase inhibitory activities // Food Chemistry. – 2007. V. - 101(4). – P. 1616-1625.
- 5 Iqbal S., Bhangar M.I., Anwar F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan // Food Chemistry. – 2005. – V. 93(2). – P. 265-272.
- 6 Zhang, M.W., Guo, B.J., Zhang, R.F., Chi, J.W., Wei, Z.C., Xu, Z.H., Zhang, Y. and Tang, X.J. Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice // Agricultural Science in China. – 2006. – V. 5(6). – P. 431-440.
- 7 Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. and Kitts, D.D. Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) Pigmented Fraction Suppresses both Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Chemical and Biological Model Systems // Journal of Agriculture and Food Chemistry. – 2003. – V.51. – P. 5271-5277.
- 8 Дзюба В.А. Генетика риса. – Краснодар, 2004. – 284 с.
- 9 Jackson M.T., Huggan R. Sharing the diversity of rice to feed the world // Diversity. – 1993. - № 9. – P. 22-25.
- 10 Глазырина В.А., Савченко Е.Г., Шундирина Л.А. Получение проростков риса из семян, потерявших всхожесть с использованием янтарной кислоты // Материалы 18 международного симпозиума «Нетрадиционное растениеводство. Селекция и генетика. Эниология, Экология и здоровье», 2009. – С. 670-671.

УДК: 631.52. 633. 633.1; 635

И.А. Сартбаева*, Л.К. Мамонов, Б.Н. Усенбеков, А.Б. Рысбекова, Д.Т. Казкеев,
Е.А. Жанбырбаев, Х. Беркимбай, Б. Мошан, А.Н. Кожакулова, С.А. Шоинбекова

Институт биологии и биотехнологии растений (ИББР), г. Алматы, Казахстан

*e-mail: innabat-sa@mail.ru

Применение метода культуры пыльников в селекции отечественных сортов глютинозного риса

Работа посвящена созданию сортов глютинозного риса с использованием биотехнологически методов в сочетании с традиционными методами селекции. Актуальность проблемы связана с отсутствием отечественных сортов и необходимостью использования глютинозного риса в детском и диетическом питании. В результате проведенных работ получено 200 зеленых растений-регенерантов глютинозного риса в культуре пыльников для создания дигаплоидных линий.

Ключевые слова: глютинозный рис, растения-регенеранты, культура пыльников.

I.A. Sartbaeva, L.K. Mamonov, B.N. Ussenbekov, A.B. Rysbekova, D.T. Kazkeyev, E.A. Zhanbyrbayev, H.A. Berkimbai, B.I. Moshan, A.N. Kozhakulova, S.A. Shoynbekova

Application of anther culture in breeding domestic varieties of glutinous rice

Work is devoted to creation of a glutinous rice variety by use of biotechnological methods in combination with conventional breeding methods. The research is relevant due to lack of domestic varieties and need of use of glutinous rice for a baby and dietary food. As a result of the carried-out work 200 plant-regenerants of glutinous rice have been taken from anther culture for creating doubled-haploid plants.

Keywords: glutinous rice, plant-regenerants, anther culture.

И.Ә. Сартбаева, Л.К. Мамонов, Б.Н. Усенбеков, А.Б. Рысбекова, Д.Т. Казкеев, Е.А. Жанбырбаев, Х. Беркимбай,
Б. Мошан, А.Н. Қожақұлова, С.А. Шоинбекова

Отандық глютинозды күріш сорты селекциясында тозаң культурасы әдісін қолдану

Бұл жұмыс селекцияның дәстүрлі әдістерімен сәйкес биотехнологиялық әдістерді қолдану арқылы глютинозды күріш сортын шығаруға арналған. Мәселенің өзектілігі диеталық және балалар тағамына глютинозды күрішті қолданудың қажеттілігімен және отандық глютинозды сорттың болмауымен байланысты. Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде дигаплоидты линияларды шығару үшін глютинозды күріштің тозаң культурасынан 200 жасыл регенерант-өсімдіктер алынды.

Түйін сөздер: глютинозды күріш, регенерант-өсімдіктер, тозаң культурасы.

В Республике Казахстан используются в производстве и внесены в Государственный реестр селекционных достижений 27 сортов риса, из них 13 – отечественной селекции. Однако, среди них отсутствуют сорта риса специального назначения (глютинозные, с окрашенным перикарпом, высокоамилозные и длиннозерные). Мука глютинозного риса может использоваться как компонент продуктов детского питания, в сухих и жидких молочных смесях на зерновой основе, приближенных по составу к женскому молоку. Поэтому глютинозный рис необходим при искусственном вскармливании детей в первый год жизни. При варке глютинозные зерна не сохраняют форму, а образуют плотную, молочного цвета клейкую массу. Благодаря обволакивающим свойствам кашу из

глютинозного риса можно рекомендовать в качестве диетического продукта для больных с нарушениями функций пищеварительного тракта [1]. Поэтому получение исходных форм и линий для создания отечественного глютинозного сорта риса является своевременной и актуальной проблемой.

Одним из методов ускорения селекционного процесса является применение метода гаплоидной технологии – культуры изолированных пыльников и микроспор. Гаплоидные растения содержат одинарный набор хромосом, это позволяет селекционерам наблюдать мутации. В результате удвоения хромосом гаплоидов получают гомозиготные дигаплоиды, увеличивается эффективность отбора по качественными и количественными признаками. При скрещивании гомозиготных

линий получают гетерозисное потомство. Гомозиготные линии часто используются селекционерами для изучения взаимодействия генов, определения групп сцепления, для создания генетических карт на основе молекулярных маркеров и идентификаций локусов количественных признаков (QTL). Существующая гаметоклональная изменчивость, наблюдаемая в гаплоидах, является источником генетического разнообразия исходного материала и не является препятствием для использования гаплоидной биотехнологии в селекции [2, 3, 4]. В настоящее время есть много экспериментальных примеров, подтверждающих эффективность и применимость гаплоидной биотехнологии в селекции зерновых культур [3]. Целью настоящей работы является получение растений-регенерантов глютинозного риса в культуре изолированных пыльников.

Материалы и методы

В эксперименте использовали гибридную комбинацию: $F_2 \text{♀}$ Виола х ♂ Акдала, $F_2 \text{♀}$ Виола х ♂ Баканасский, $F_3 \text{♀}$ Виола х ♂ Баканасский. Наиболее подходящая фаза получения гаплоидов андрогенезом является одноядерная стадия микроспор. Морфологический данная стадия соответствует фазе трубкования. Метелки гибрида срезали в фазе трубкования и подвергали холодной обработке в течение 4-7 суток в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Для индукции эмбриоидов и каллусов использовали питательную среду N6 с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) [5]. Для получения регенерантов из каллусов использовали регенерационную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением гормонов: бензиламинопурина (5 мг/л), индолил-3-уксусной (1,0 мг/л), а также органических веществ: глутамин (500мг/л), гидролизат казеина (500 мг/л) [6]. На 20-30 сутки наблюдали появление зеленых растений регенерантов. Для увеличения количества регенерантов проводили клональное размножение *in vitro*. С этой целью растения регенеранты с хорошей кустистостью

разделяли на отдельные побеги и культивировали изолированно на регенерационной среде МС. Часть регенерантов которые, не имели корневую систему, культивировали на среде для ризогенеза [7]. Данная среда содержит половинный набор базовой среды МС с добавлением 1,0 мг/л ИУК, 30,0 г /л сахарозы, 7,0 г/л агара. Далее, растения регенеранты с хорошо развитой корневой системой отмывали от питательной среды и помещали в сосуды с водопроводной водой на трое суток для адаптации с *in vitro* в *in vivo*. После адаптации, растения переводили в вегетационные сосуды с почвенно-торфяной смесью.

Результаты и их обсуждение

Гаплоидные растения из культуры пыльников риса обычно получают через каллусогенез или прямой регенерацией соматических зародышей, в котором формируются проэмбриональные структуры с последующим развитием из них эмбриоидов. Ряд исследователей выявил, что добавление фенилуксусной кислоты в индукционную среду приводит к прямой регенерации в культуре пыльников. Поэтому было проведено сравнение двух ауксинов 2.4Д и ФУК в количестве 2 мг/л среды на индукцию каллусов риса в культуре пыльников. Пыльники глютинозных гибридов культивировали на двух питательных средах: N6+2,0 мг/л 2.4Д и N6+2,0 мг/л ФУК (таблица 1).

В среднем показатель каллусообразования у гибрида $F_2 \text{♀}$ Виола х ♂ Баканасский составил 5,2% от количества высаженных пыльников риса на индукционной среде N6 с 2,0 мг/л 2,4Д (рисунок 1а). Во втором варианте среды N6+2,0 мг/л ФУК у данного гибрида наблюдался более низкий выход каллусов - 0,3%. Индукция каллусов при культивировании пыльников гибрида $F_3 \text{♀}$ Виола х ♂ Баканасский на средах N6 с 2,0 мг/л 2,4Ди N6 с 2,0 мг/л ФУК была нулевой. Количество полученных каллусов у гибрида $F_2 \text{♀}$ Виола х ♂ Акдала составило 0,9%, а на среде N6 с 2,0 мг/л 2,4Д количество каллусов составило 4,5% от количества высаженных пыльников риса.

Таблица 1 – Частота андрогенеза *in vitro* гибридов риса в зависимости от гормона в индукционной среде

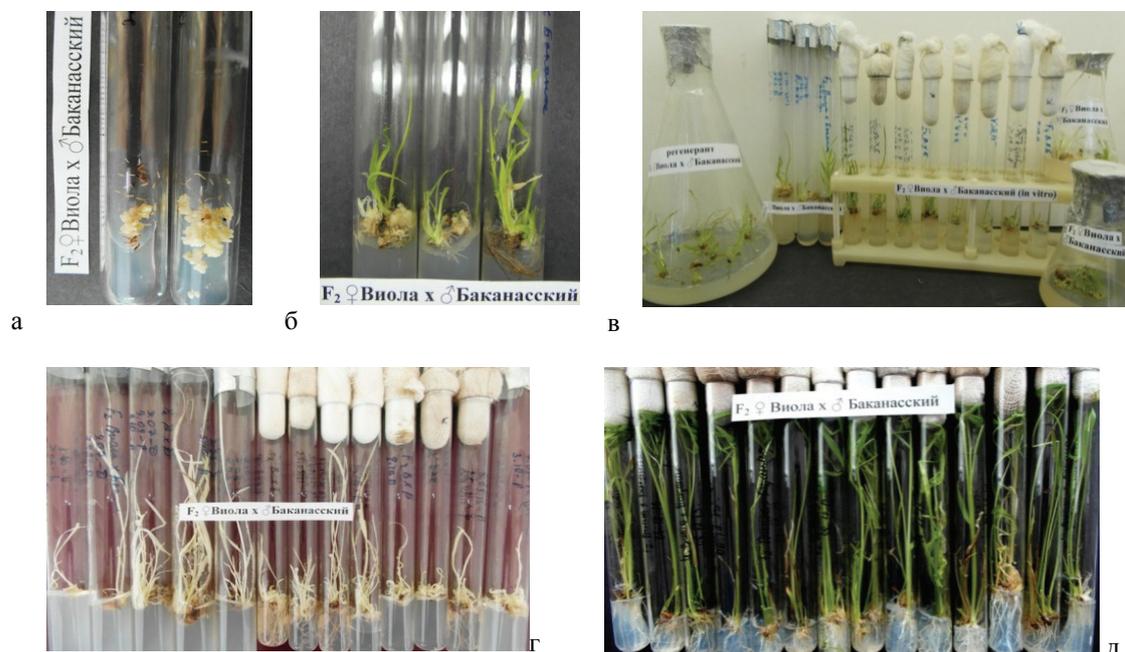
Исследуемые параметры	Гибриды					
	F ₃ ♀Виола х ♂Баканасский		F ₂ ♀Виола х ♂Акдала		F ₂ ♀Виола х ♂Баканасский	
	Питательные среды					
	N6+2,0 мг/л 2,4 D	N6+2,0 мг/л ФУК	N6+2,0 мг/л 2,4 D	N6+2,0 мг/л ФУК	N6+2,0 мг/л 2,4 D	N6+2,0 мг/л ФУК
Кол-во культ-ных пыльников, шт	240	260	220	220	940	800
Каллусогенез, %	-	-	4,5	0,9	5,2	0,3

Таблица 2 – Частота регенерации растений на среде МС

Генотип	Количество культивированных каллусов, шт.	Количество зеленых регенерантов, шт.	Количество альбиносных регенерантов, шт.
F ₂ ♀Виола х ♂Акдала	10	2	1
F ₂ ♀Виола х ♂Баканасский	50	40	59

Полученные каллусы разделяли на отдельные части и пересаживали на регенерационную среду МС содержащую 5мг/л БАП и 1мг/л ИУК, 500 мг/л гидролизата казеина. Данная регенерационная среда способствовала образованию зеленых и альбиносных регенерантов (рисунок 1 б, г).

Как видно из таблицы 2, наибольшая частота регенерации зеленых и альбиносных растений было у каллусов F₂♀Виола х ♂Баканасский по сравнению с F₂♀Виола х ♂Акдала (рисунок 1 г).



а – индукция каллусогенеза; б – зеленые регенеранты; в – размножение зеленых регенерантов; г - альбиносные регенеранты, д – ризогенез зеленых регенерантов

Рисунок 1 – Растения-регенеранты глютинозного риса в культуре пыльников
После адаптации растений к почве, переводили в вегетационные сосуды для получения семенного поколения

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 (рисунок 1 д). Таким образом, в результате

использования гаплоидной биотехнологии получено 200 растений-регенерантов (у гибрида F2 ♀Виола x ♂Баканасский) глютинозного риса в культуре пыльников. В дальнейшем полученные гаплоидные растения-регенеранты будут полиплоидизированы для получения семенного поколения глютинозного риса.

Литература

- 1 Лось Г.Д. Методика гибридизации риса // Рисоводство. – 2007. - № 10. – С.42-51.
- 2 Baenziger P.S., Keppenne V.D., Morris M.R. Quantifying gametoclonal variation in wheat doubled haploids // Cereal Research Communications. – 1991. – V. 19. - №1-2. – P. 33-42.
- 3 Maluszynski M., Kasha K.J., Forster, Szarejko B.P. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003. ISBN 1-4020-1544-5.
- 4 Jana Murovec, Borut Bohanec. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, Plant Breeding. Dr. Ibrokhim Abdurakhmonov (Ed.), InTech, 2012. ISBN: 978-953-307-932-5. Available from: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>.
- 5 Chu C., Wang C., Sun C., Hsu C., Yin K., Bi F. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources // Sci. Sin. – 1975. – V. 18. – P. 659-668.
- 6 Murashige T., Scoog F. Arevisedmediumforrapidgrowthandbioassayswithtobaccotissuecultures // Physiol.Plant. – 1962. – V.15. - №13. – P. 473-497.
- 7 Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. – Краснодар: ВНИИ риса, 2012. – 91 с.