

УДК: 633/635:631.52; 633.1

## Получение дигаплоидных линий для селекции глютинозного риса

© 2018 И.А. САРТБАЕВА<sup>1</sup>, Б.Н.УСЕНБЕКОВ<sup>2</sup>, А.Б. РЫСБЕКОВА<sup>2,3,\*</sup>, Ж.М. МУХИНА<sup>4</sup>,  
Д.Т. КАЗКЕЕВ<sup>5</sup>, К.Ж. ЖАМБАКИН<sup>2</sup>, Е.А. ЖАНБЫРБАЕВ<sup>4</sup>, Х.А. БЕРКИМБАЙ<sup>2</sup>,  
Д.Ш. АХМЕТОВА<sup>2</sup>, А.А. МЕЛДЕБЕКОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, 050040, Казахстан

<sup>2</sup>Институт биологии и биотехнологии растений (ИБРР), Алматы, 050040, Казахстан

<sup>3</sup>Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Астана, 010000, Казахстан

<sup>4</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт риса (ВНИИ риса), Краснодар, п/о Белозерный, 350921

<sup>5</sup>Казахский национальный аграрный университет, Алматы, 050010, Казахстан

e-mail: bakdaulet7@yandex.ru, aiman\_rb@mail.ru\*

Поступила 01.11.2017 г.

Принята в печать 15.11.2017 г.

Проведен скрининг районированных сортов риса Республики Казахстан на содержание амилозы. Определение аллельного состояния гена *waxy* с помощью маркера Glu-23 показало, что все исследованные сорта в сравнении со стандартными японскими сортами содержат среднее количество амилозы. Проведена гибридизация казахстанских сортов Баканасский и Акдала с глютинозным сортом Виола для получения низкоамилозных форм риса. Показана способность завязывания гибридных зерновок в условиях оранжереи; эти зерновки были посеяны в оранжерейных условиях для получения дигаплоидов в культуре пыльников. Методом ПЦР-анализа была проведена идентификация аллелей генов *Wx* и *Alk* у сортов и дигаплоидных линий с использованием следующих маркеров: Glu-23; SNP3; SNP4; WxE6; WxE10; dCAPS. Методом традиционной селекции с последующим применением гаплоидной технологии созданы перспективные линии глютинозного риса, обладающие хозяйственно ценными признаками (скороспелость, урожайность, низкое содержание амилозы), для передачи на государственные сортоиспытания.

*Ключевые слова:* дигаплоиды, глютинозный сорт, культура пыльников риса, содержание амилозы, ген *waxy*.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-26-36

В государственный реестр селекционных достижений Республики Казахстан внесены 28 сортов риса. Среди них отсутствуют глютинозные сорта. Глютинозный (клейкий) рис представляет собой разновидность данной крупы, которая вследствие особых свойств крахмала образует при варке клейкую массу. Мука из глютинозного риса может использоваться как компонент продуктов детского питания. Клейкая рисовая каша защищает слизистую оболочку желудка от раз-

дражения химическими факторами, поэтому она рекомендуется и как диетический продукт для больных с нарушениями функции желудочно-кишечного тракта [1, 2].

Клейкий рис из-за его полезных свойств становится все более популярным на мировом рынке. В странах Азии глютинозный рис возделывается уже давно. В Казахстане целенаправленные селекционные работы по созданию глютинозных сортов риса ранее не проводились.

*Список сокращений:* БАП – 6-бензиламинопурип; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ДГ – дигаплоиды; ИУК – индоллил-3-уксусная кислота; КазНИИ риса – Казахский научно-исследовательский институт риса им. И. Жахаева; КазНИИЗиР – Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства; среда МС – среда Мурасиге–Скуга; УзНИИ риса – Узбекский научно-исследовательский институт риса; dCAPS (Cleaved Amplified Polymorphous Sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности; GBSS (Granule-Bound Starch Syntase) – синтаза гранулированного крахмала.

В настоящее время в селекции риса широко используют биотехнологические методы, позволяющие повысить результативность селекционного процесса. Одним из таких методов является гаплоидная биотехнология, применяя которую можно получить генетически стабильные гомозиготные растения за одну генерацию. Гаплоидный набор хромосом микроспор злаковых, таких как ячмень, пшеница и рис, спонтанно удваивается в условиях *in vitro* [3]. Гомозиготные растения используются в селекции растений для анализа количественных признаков, изучения взаимодействия и экспрессии генов, а также выявления рецессивных мутаций. Гаплоидные клетки применяют в генетической инженерии и клеточной селекции. В данное время многими экспериментальными примерами подтверждена применимость и эффективность гаплоидной биотехнологии в селекции зерновых культур [4, 5].

Одним из важнейших факторов, влияющих на пищевые и технологические качества приготовленного риса, являются свойства присутствующего в нем крахмала. Углеводы в зернах злаков представляют собой С<sub>6</sub>-сахара, полимеризованные в гранулы крахмала, которые находятся в основном в эндосперме. Различают два типа продуктов полимеризации: амилоза (молекулы с прямыми цепями и  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями) и амилопектин (сложноразветвленные молекулы цепей сахара с  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-связями) [6]. По содержанию амилозы рис классифицируется на пять групп: глютинозный (0–2%), очень низкоамилозный (3–9%), низкоамилозный (10–19%), среднеамилозный (20–24%) и высокоамилозный (>24%) [7]. Содержание амилозы в эндосперме зерновки зависит от количества продукта экспрессии *Waxy*-гена, кодирующего синтазу гранулированного крахмала (GBSS = *Wx*-protein), который расположен на 6-й хромосоме. *Waxy*-ген амилозосодержащих сортов имеет два аллеля *Wxa* и *Wxb*. Аллель *Wxa* контролирует синтез амилозы у сортов *Indica* с более высоким ее содержанием ( $\geq 25\%$ ), *Wxb* – у сортов *Japonica* с более низким содержанием амилозы ( $\leq 20\%$ ) [1, 2]. Для выяснения G/T-полиморфизма среди глютинозных сортов был разработан праймер dCAPS, который распознает локацию сайта рестрикции [8]. Это позволило выявить филогенетическое происхождение глютинозного риса с помощью успешной детекции единичных нуклеотидных вариантов (SNP).

Наряду с этим у сортов глютинозного риса, у которых амилоза не содержится в крахмале эндосперма, выявлена вставка из 23 нуклеотидов

во 2-м экзоне *Waxy*-гена, что приводит к образованию стоп-кодона в данном экзоне на позиции 172-го нуклеотида. Прекращение транскрипции *Waxy*-гена в точке стоп-кодона приводит к невозможности продукции фермента GBSS и дальнейшего синтеза амилозы [9, 10].

Описана связь между содержанием амилозы и полиморфизмом по одному нуклеотиду (SNP) у *Wx*-гена риса в сайтах доноров сплайсинга первого интрона (G-T) и у экзонов 6 (A/C) и 10 (C/T) [11, 12].

Одним из важнейших параметров, влияющих на кулинарные и вкусовые качества риса, является конечная температура клейстеризации, при которой более 90% гранул крахмала необратимо набухают в горячей воде и теряют свойство двойного лучепреломления. Температура клейстеризации влияет на продолжительность варки обработанного риса: чем выше эта температура, тем дольше время варки. Зерна восковидного и невосковидного крахмала имеют одинаковую величину и одинаковую температуру клейстеризации [13]. Крахмал большинства разновидностей сорта *Japonica* имеет более низкую температуру клейстеризации, чем линии, полученные от скрещивания сортов *Indica* и *Japonica* [14]. Сортные различия в длине боковых цепей амилопектина регулируются функциональными изменениями крахмал-синтазы IIa (SSIIa). Ген SSIIa идентичен гену *alk*, расположенному на 6-й хромосоме, который отвечает за щелочной распад амилопектина риса [6]. Температурные условия в период формирования зерна влияют на температуру клейстеризации крахмала.

Целью исследования было получение дигаплоидных линий глютинозного риса и изучение *Wx*- и *Alk*-гаплотипов у отобранных дигаплоидов для ускорения селекции и создания казахстанских глютинозных сортов растения. Настоящая работа является первой попыткой создания в Казахстане исходных линий глютинозного риса с применением гаплоидной технологии и молекулярных маркеров для последующего использования этих линий в селекции новых ценных сортов данного сельскохозяйственного растения.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Селекционный материал

Объектами исследования являлись сорта риса отечественной и зарубежной селекции и гибриды селекции ИББР. Для гибридизации в оранжерее ИББР в вегетационных сосудах выращивали глютинозные и амилозные сорта риса (эксперимент проводили в трех повторностях) с интервалом

в сроках посева 10 сут для совмещения времени цветения одних сортов риса с разными периодами вегетации других сортов. Для элиминации мужских генеративных органов обрезали цветковые чешуи, пыльники удаляли с помощью 3-канального компрессора (пневмокастрация) и метелку опыляли ТВЕЛЛ-методом [15].

### Культура изолированных пыльников риса в условиях *in vitro*

В эксперименте по культивированию изолированных пыльников *in vitro* использовали гибридные комбинации F<sub>1</sub>: Виола×Акдала и Виола×Баканасский. Выращивание и доведение донорных растений до стадии трубкования проводили в оранжерее ИББР. Метелки отбирали в фазе трубкования, помещали в сосуды с водой и подвергали действию низкой положительной температуры (4 °С) в течение 5–7 сут. Для индукции каллусогенеза использовали питательную среду № 6 (CHU (N<sub>6</sub>), Titan Biotech Ltd, India) с добавлением 2,4-Д (Sigma, США) в концентрации 2 мг/л [16]. По достижении диаметра более 3 мм каллусы переносили на регенерационную среду МС (Sigma) с добавлением следующих компонентов, мг/л: гормонов БАП – 5 и ИУК – 1, а также глутамина – 500 и гидролизата казеина – 500 (Sigma) [17].

На 20–30 сутки наблюдали появление зеленых проростков. Часть регенерантов, лишенных корней или имевших слабо развитую корневую систему, культивировали для стимуляции ризогенеза на среде МС1/2, состоящей из половинного набора микро- и макроэлементов среды MS, Fe-хелата, 1 мг/л ИУК и 30 г/л сахарозы (Sigma) [3]. Далее растения-регенеранты с хорошо развитой корневой системой отмывали от питательной среды и помещали в сосуды с водопроводной водой для адаптации к смене условий культивирования с *in vitro* на *in vivo*. После этого растения переносили в вегетационные сосуды с почвенно-торфяной смесью («Садовый центр», Алматы) и выращивали в оранжерее при температуре 28 °С и относительной атмосферной влажности 48%.

### Определение содержания амилозы

Содержание амилозы в зерновках определяли с помощью аутоанализатора II (Bran+Luebbe Co. Ltd., Norderstedt, Германия) согласно методике [18].

### Электрофорез запасных белков риса

Экстракцию запасных белков проводили трис-НСI- и фосфатным буфером, рН 6,8, содержащими додецилсульфат натрия, меркаптоэта-

нол, глицерин и краситель бромфеноловый синий (Sigma). Разделение проводили в 7,5%-ном полиакриламидном геле (Sigma) модифицированным методом Лэммли [19].

### Выделение ДНК и ПЦР-анализ

Для выделения ДНК использовали бесхлорофилльные 7-дневные проростки, полученные путем инкубации на увлажненной фильтровальной бумаге в темноте при температуре 25–27 °С. Экстракцию ДНК из проростков проводили модифицированным методом СТАВ [20]. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в 8%-ном полиакриламидном геле.

Для идентификации гена *Wx* проводили ПЦР с использованием праймера Glu 23 [10]. При выявлении *Wxa*- и *Wxb*-типов гена изучаемые образцы подвергали анализу с помощью маркера dCAPS. Для рестрикции по этому маркеру использовали фермент *EcoT141* (Thermo Scientific), в присутствии которого продукты ПЦР инкубировали при 37 °С. Состав смеси для обработки эндонуклеазой рестрикции был следующий, мкл: продукты ПЦР – 10; вода, свободная от ДНКазы и РНКазы – 18; 10-кратный буфер для *EcoT141* – 2; фермент *EcoT141* – 1,5.

Для определения аллельного состояния *Wxb*-локуса между высоким и средним содержанием амилозы использовали маркеры *WxEh-6* и *WxE-10* [21]. Идентификацию гена *Alk* осуществляли с помощью маркеров SNP3 и SNP4 [22]. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные в работе, приведены в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Идентификация гена *waxy* у районированных сортов риса в Казахстане

На территории Республики Казахстан возделываются в основном отечественные сорта (полученные в КазНИИ риса) и сорта, происходящие из ближнего зарубежья (УзНИИ риса, ВНИИ риса). Так как содержание амилозы является одним из важных показателей для оценки качества зерна, проведен биохимический скрининг на содержание амилозы у районированных сортов риса (табл. 2).

Результаты анализа свидетельствуют, что сорта риса, возделываемые в рисосеющих регионах республики, в основном относятся к низко- и среднеамилозным (содержание амилозы 13–21,7%).

Проведенная ПЦР-идентификация аллельного состояния гена *waxy* с использованием маркера Glu-23 показала, что все районированные

Таблица 1

**Структура использованных в работе праймеров**

**Structures of used primers**

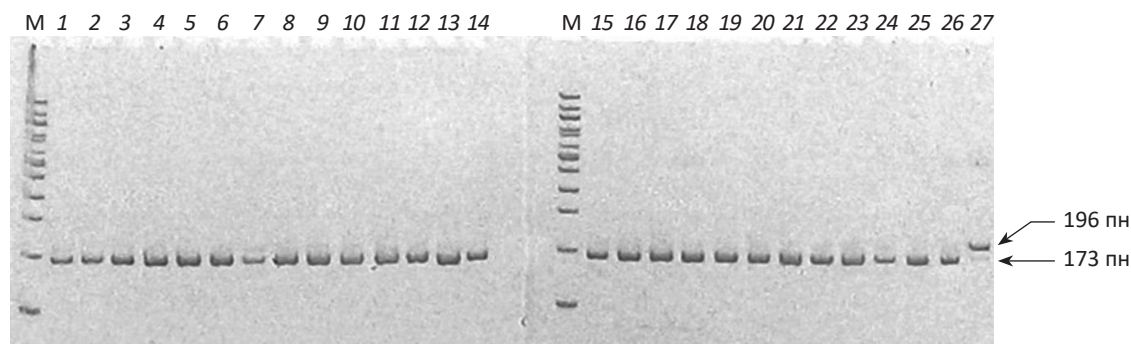
Праймер	Нуклеотидная последовательность	Источник
Wx-CAPS Wx-B	F-5'-TGTTGTTTCATCAGGAAGAACATCTCCAAG-3' R-5'-TTAATTTCCAGCCCAACACC-3'	[8]
SSIIa_SNP4(C) SSIIa_SNP4(T) SSIIa SNP-L2	F-5'-GAG AGC TGG AGG GGG C-3' F-5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGAGCTGGAGGGGT-3' R-5'-CACACAAACCGGAAGCTAAT-3'	[6]
Glu-23F Glu-23R	5'-TGCAGAGATCTTCCACAGCA-3' 5'-GCTGGTCGTCACGCTGAG-3'	[10]
Wx_E6-F-C Wx_E6-F-A Wx_E6-R	5'-CAACCCATACTTCAAAGGAACATC-3' 5'-AACAAACCCATACTTCAAAGGAACCTA-3' 5'-AGTCGTTGCAGACGAACACAAC-3'	[12]
Wx_E10-R-C Wx_E10-R-T Wx_E10-F	5'-GCGGCCATGACGTCTGG-3' 5'-GGCGGCCATGACGTCAGA-3' 5'-TCAGGCAATCGAGGCGAAG-3'	То же

Таблица 2

**Характеристика районированных сортов риса Республики Казахстан**

**Characteristics of rice varieties zoned in the Republic of Kazakhstan**

Сорт	Год допуска	Оригинатор	Вегетационный период, сут	Масса 1000 зерен, г	Амилоза, %
Авангард	1985	УзНИИ риса	117–125	32–33	15,9
Лазурный	1990	То же	122–126	29-30	15,7
УзРос 7-13	1968	»»	135–140	31–32	16,5
Алтынай	1999	ИББР	108–110	29–31	15,9
Баканасский	2008	То же	100–105	30–31	20,2
Заря	2008	»»	124–125	30–31	16,0
Мадина	2007	»»	110–112	40–42	16,0
КазНИИР-5	2012	То же	105–110	32–33	13,0
Арал 202	2006	»»	110–112	33–34	13,0
Ару	2008	»»	90–95	30–32	20,0
Маржан	1987	»»	110–115	33–34	21,7
Тогускен	2009	»»	112–115	32–34	16,0
КазЕр 6	2015	»»	105–107	31–32	20,0
Кубань-3	1963	ВНИИ риса	105–110	30–32	18,0
Лидер	2010	То же	120–125	30–31	15,0
Лиман	2007	»»	115–117	28–30	15,2
Новатор	2010	»»	100–105	29–31	15,0
Солнечный	1982	»»	110–120	30–32	20,3
Фишт	2012	»»	116–118	32–35	14,5
Янтарь	2009	»»	114–117	32–33	15,5
Анаит	2012	»»	100–106	37–39	17,9
Суаг	2009	КазНИИЗиР	120–122	30–31	20,0
Опытное	2006	То же	118–120	29–31	18,0
Пак-Ли	2004	»»	112–115	30–31	20,0



**Рис. 1.** Идентификация гена *waxy* у районированных сортов риса Казахстана: дорожки 1 – Авангард; 2 – Алтынай; 3 – Анаит; 4 – Арал 202; 5 – Ару; 6 – Баканасский; 7 – Заря; 8 – КазНИИР-5; 9 – Кубань-3; 10 – Лазурный; 11 – Лидер; 12 – Лиман; 13 – Мадина; 14 – Маржан; 15 – Новатор; 16 – Опытное; 17 – Пак-Ли; 18 – Солнечный, 19 – Суаг; 20 – УзРос7-13; 21 – Фишт; 22 – Янтарь; 23 – Тогускен; 24 – КазЕр. В качестве стандартных использованы сорта: 25 – Kitamizuho (содержание амилозы 26,9%); 26 – Yukigozon (19,56%) и 27 – Hakucho-mochi (0,15%). М – маркеры молекулярной массы (Applied Biosystems, Великобритания)

**Fig. 1.** Identification of *waxy* gene in rice varieties regionalized in Kazakhstan: lane 1, Avangard; 2, Altynay; 3, Anait; 4, Aral 202; 5, Aru; 6, Bakanasskii; 7, Zaria; 8, KazNIIR-5; 9, Kuban'-3; 10, Lazurnyi; 11, Leader; 12, Liman; 13, Madina; 14, Marzhan; 15, Novator; 16, Opytnoye; 17, Pak-Li; 18, Solnechnyi; 19, Suag; 20, UzRos7-13; 21, Fisht; 22, Yantar'; 23, Toguskien; 24, KazEr. Following varieties were used as reference: 25, Kitamizuho (amylase content of 26.9%); 26, Yukigozon (19.56%) and 27, Hakucho-mochi (0.15%). M, MM markers (Applied Biosystems, GB)

сорта республики являются среднеамилозными. Для сравнения были взяты японские стандартные сорта с различным содержанием амилозы (рис. 1).

Результаты ПЦР-анализа с помощью праймера Glu-23 показали наличие двух продуктов: 1) продукт размером 173 пн характерен для средне- и высокоамилозных сортов; 2) продукт размером 196 пн является признаком глютинозного сорта.

### Применение гаплоидной технологии для получения предселекционного материала глютинозного риса

После биохимического и молекулярного анализа районированных сортов риса была проведена гибридизация местных амилозных сортов Баканасский и Акдала, имеющих стекловидный эндосперм (отцовская форма), с российским глютинозным сортом Виола (материнская форма) для получения предселекционного материала глютинозного риса [23]. При этом количество полученных гибридных зерновок в комбинации Виола × Баканасский составило 16 шт. (завязываемость 13–24%), у Виола × Акдала – 43 шт. (завязываемость 20–80%).

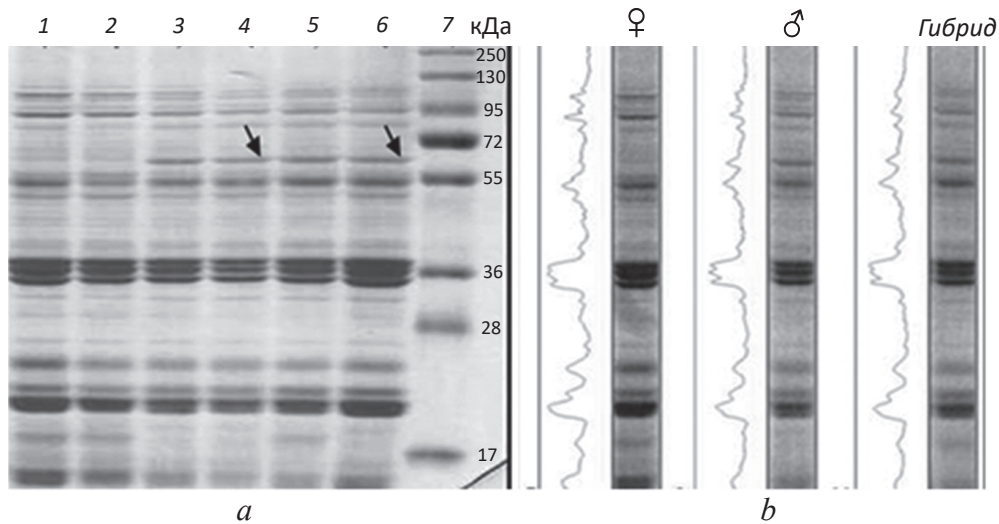
Гибридные зерновки подвергали электрофоретическому анализу для точной идентификации истинности гибридного происхождения генерации F<sub>1</sub>, а также для установления сходства и(или) различия с их родительскими формами по спектрам запасных белков (рис. 2).

В спектре запасных белков семян F<sub>1</sub> Виола × Баканасский отмечается появление интенсивных белковых полос отцовской формы, к примеру, компонента с молекулярной массой 60 кДа, что является подтверждением гибридного происхождения данной линии.

Полученные гибридные зерновки были посеяны в оранжерейных условиях для получения дигиплоидов в культуре пыльников. В фазе трубкования пыльники, отобранные из гибридных комбинаций F<sub>1</sub> Виола × Баканасский и Виола × Акдала, культивировали на твердой питательной среде № 6 с добавлением 2 мг/л 2,4-Д (1740 и 440 пыльников, соответственно). Индуцированные каллусы (123 образца) пассировали на регенерационной среде МС с БАП (5 мг/л) и ИУК (1 мг/л). В результате регенерации из гибрида F<sub>1</sub> Виола × Баканасский получено 79 зеленых и 30 альбиносных растений (72,5% и 27,5% соответственно) (рис. 3).

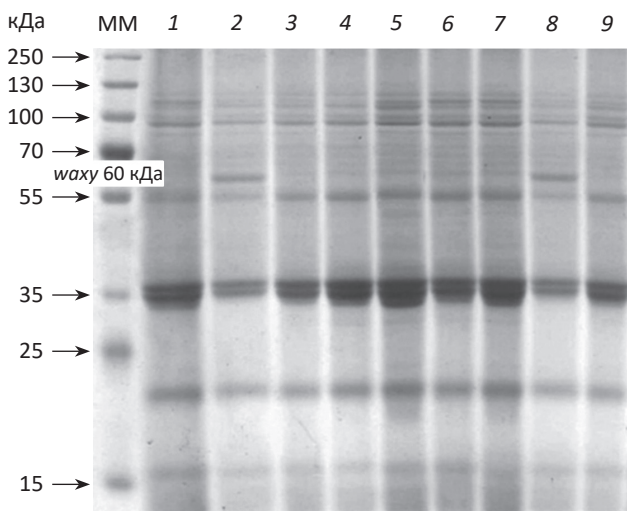
Из комбинации F<sub>1</sub> Виола × Акдала *in vitro* получено 20 каллусов. Из этих каллусов регенерировано четыре зеленых растения и два альбиносных (табл. 3).

Растения-регенеранты с хорошо развитой корневой системой извлекали из пробирок, отмывали от питательной среды и помещали в сосуды с водопроводной водой для адаптации из *in vitro* в *in vivo*. После двух суток адаптации растения-регенеранты пересаживали в сосуды с почвенно-торфяной смесью и культивировали в оранжерее до полного созревания.



**Рис. 2.** Электрофорез (а) и денситограмма (b) запасных белков гибрида F<sub>1</sub> Виола×Баканасский в сравнении с родительскими формами. а: дорожки 1, 2 – Виола; дорожки 3, 4 – Баканасский; дорожки 5, 6 – F<sub>1</sub> Виола×Баканасский; дорожка 7 – маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific, Литва); b: ♀ – Виола; ♂ – Баканасский; Гибрид – F<sub>1</sub> Виола×Баканасский. Стрелки указывают фрагмент размером 60 кДа отцовской формы

**Fig. 2.** Electrophoresis (a) and densitogram (b) of rice spare proteins of F<sub>1</sub> hybrid Viola×Bakanasskii as compared to parental forms. (a): lanes 1 and 2, Viola; lanes 3 and 4, Bakanasskii; lanes 5 and 6, F<sub>1</sub> Viola×Bakanasskii; lane 7, MM markers (Thermo Scientific, Lithuania); (b): ♀, Viola; ♂, Bakanasskii; Гибрид, F<sub>1</sub> Viola×Bakanasskii. Arrows show 60-kDa fragment from paternal form



**Рис. 3.** Электрофорез запасных белков дигаплоидных линий риса (дорожки 3–7 – линии ДГ<sub>2</sub>-1, ДГ<sub>2</sub>-2, ДГ<sub>2</sub>-3, ДГ<sub>2</sub>-4, ДГ<sub>2</sub>-5, соответственно; 9 – ДГ<sub>2</sub>-6) в сравнении с родительскими сортами (дорожка 1 – Виола; дорожка 2 – Баканасский; дорожка 8 – Акдала). MM – маркеры молекулярной массы (Fermentas)

**Fig. 3.** Electrophoresis of spare proteins from rice doubled haploid lines (lanes 3–7, lines DH<sub>2</sub>-1, DH<sub>2</sub>-2, DH<sub>2</sub>-3, DH<sub>2</sub>-4, DH<sub>2</sub>-5, respectively; lane 9, DH<sub>2</sub>-6) in comparison with parental varieties (lane 1, Viola; lane 2, Bakanasskii; and lane 8, Akdala). MM, markers from Fermentas

Таблица 3

**Частота регенерации пыльников из глютинозных гибридов**

**Frequency of anthers regeneration from glutinous hybrids**

Растительный материал	F <sub>1</sub>			
	Виола × Баканасский		Виола × Акдала	
	шт.	%	шт.	%
Высаженные пыльники	1740	–	440	–
Образовавшиеся каллусы	123	7,0	20	4,5
Зеленые растения	79	72,5	4	66,6
Альбиносные растения	30	27,5	2	33,3
Гаплоидные растения	4	5,1	3	75,0
Дигаплоидные растения	75	94,9	1	25,0

Таблица 4

**Содержание амилозы и белка Waxy в зерновках дигиплоидных и родительских линий**

**Contents of amylose and Waxy protein in caryopsis of doubled haploid and parental lines**

Образцы		Амилоза, %
Сорт	Виола	1,85
	Баканасский	20,20*
	Акдала	18,20*
Дигиплоид	ДГ <sub>2</sub> -1	0,31
	ДГ <sub>2</sub> -2	0,80
	ДГ <sub>2</sub> -3	1,44
	ДГ <sub>2</sub> -4	0,78
	ДГ <sub>2</sub> -5	1,17
	ДГ <sub>2</sub> -6	1,66

Примечание: здесь и в табл.5 (ДГ<sub>2</sub>-1)–(ДГ<sub>2</sub>-5) – дигиплоиды из комбинации F<sub>1</sub> Виола × Баканасский, ДГ<sub>2</sub>-6 – дигиплоид из комбинации F<sub>1</sub> Виола × Акдала.

\*Отмечено присутствие белка Waxy (60 кДа).

В комбинации F<sub>1</sub> Виола × Баканасский 75 растений из 79 (94,9%) были спонтанно удвоенными дигиплоидами, в то время как у гибрида F<sub>1</sub> Виола × Акдала получен один спонтанно удвоенный дигиплоид из четырех зеленых регенерантов (25%) (см. табл. 3).

Полученные дигиплоидные линии были размножены в полевых условиях Алматинской обл. Среди дигиплоидов был проведен индивидуальный отбор по хозяйственно ценным признакам. В результате отбора из комбинации F<sub>1</sub> Виола×Баканасский отобрано пять наиболее перспективных глютинозных дигиплоидных линий ((ДГ<sub>2</sub>-1)–(ДГ<sub>2</sub>-5)). Отобранные линии были оценены по

биохимическим показателям (содержание амилозы, наличие Waxy-белка) (табл. 4).

Содержание амилозы у глютинозного сорта риса Виола составило 1,85%, тогда как у амилозных сортов Баканасский и Акдала – 20,2 и 18,2%, соответственно. У полученных дигиплоидных линий ((ДГ<sub>2</sub>-1)–(ДГ<sub>2</sub>-6)) содержание амилозы варьировало на уровне 0,3–1,66%.

С целью выявления связи интенсивности продукции Wx-белка с содержанием амилозы был проведен качественный анализ электрофоретических спектров запасных белков семян у родительских сортов и дигиплоидов риса. Что касается компонента с массой 60 кДа, отмеченного стрелками на рис. 2 у генотипов отечественных сортов Баканасский и Акдала, глютинозные семена Виолы и дигиплоидные линии характеризовались меньшей интенсивностью соответствующих полос Waxy-белка (см. рис. 3).

В ходе работы Waxy-белок использовали в качестве белкового маркера амилозных линий риса в отличие от глютинозных в популяции дигиплоидов. Выявлено, что все отобранные дигиплоидные линии обеих комбинаций Виола×Баканасский и Виола×Акдала были глютинозными.

В дальнейшем зерновки дигиплоидов анализировали с помощью ПЦР, используя маркеры Glu-23, SNP3, SNP4, WxE6, WxE10 и dCAPS для идентификации аллелей Wx и Alk (табл. 5).

ПЦР-анализ с использованием праймера Glu-23 подтвердил, что этот специфический праймер фланкирует фрагмент размером 173 пн у амилозных сортов Баканасский и Акдала (делеция 23 нуклеотидов), тогда как у глютинозного сорта Виола и дигиплоидных линий данный праймер способствует амплификации ПЦР-продукта длиной 196 пн (23-нуклеотидная вставка).

Таблица 5

**Идентификация аллелей Wx и Alk у родительских сортов и дигиплоидных линий**

**Identification of Wx и Alk alleles in parental varieties and doubled haploid lines**

Сорт и дигиплоид	Glu-23	SSIIa_SNP3 A/G	SSIIa_SNP4 TT/GC	Wx_E6(A/C)	Wx_E10 (C/T)	Wx_dCAPS
Виола	G	A	GC	C	C	TT
Баканасский	A	G	GC	C	C	CC
Акдала	A	G	GC	C	C	CC
ДГ <sub>2</sub> -1	G	A	GC	C	C	TT
ДГ <sub>2</sub> -2	G	A	GC	C	C	TT
ДГ <sub>2</sub> -3	G	A	GC	C	C	TT
ДГ <sub>2</sub> -4	G	A	GC	C	C	TT
ДГ <sub>2</sub> -5	G	A	GC	C	C	TT
ДГ <sub>2</sub> -6	G	A	GC	C	C	TT

С помощью dCAPS-праймера установлены различия в *Wxa*- и *Wxb*-гаплотипах. Ген *Wx*, который содержат обе амилозные родительские формы, относится в *Wxa*-типу, а гены *wx* глютинозных генотипов относятся к *Wxb*-типу. Результаты ПЦР *WxE\_6* и *WxE\_10* с использованием аллель-специфических праймеров показывают, что все изученные образцы имеют 'С-С' SNP-аллели и, следовательно, *Wxa*-аллель амилозных родителей относится к среднеамилозным гаплотипам, тогда как *Wxb*-ген у материнских форм и дигаплоидных линий относится к *wx*-типу. SNP-анализ гена *Alk* показал, что глютинозный сорт Виола и все дигаплоидные линии имеют последовательность 'А' в SNP3 и 'GC' в SNP4, а значит, их гаплотипы не содержат функциональный ген *alk*. В то же время амилозные родители имели последовательность 'G' в SNP3 и 'GC' в SNP4 и, таким образом, они имеют функциональный *Alk*-ген.

В результате проведенных работ получен перспективный селекционный материал дигаплоидных линий глютинозного риса из гибридов F<sub>1</sub> Виола × Баканасский и Виола × Акдала, характеризующийся низким содержанием амилозы. Анализ структуры урожая показал целесообразность использования полученных дигаплоидов для дальнейшей селекции. Выделенные глютинозные линии дигаплоидов F<sub>1</sub> Виола × Баканасский №148 и №149 превосходят стандартные родительские формы по урожайности, а также способны созревать в условиях Алматинской обл. По агроклиматическим показателям данная область относится к I зоне рисосеяния, где продолжительность периода с температурой выше 15 °C составляет 130–145 дней, тогда как для Кызылординской (II зона) и Южно-Казахстанской (III зона) областей этот показатель равен 145–160 и более 160 дней, соответственно [24].

Данные линии предварительно описаны по морфологическим признакам на отличимость, однородность и стабильность (DUS test), утвержденным Международным союзом по охране новых сортов растений (UPOV), для последующей передачи на Государственное сортоиспытание.

Как уже было сказано выше, одной из важных характеристик сортов риса является качество зерна, включающее комплекс различных признаков, в том числе компонентный состав крахмала. От содержания амилозы зависят кулинарные достоинства крупы риса (коэффициент привара и водопоглощения, консистенция и вкус блюда), что в конечном счете влияет на процесс ценообразования на рынке продукта. Известно, что зерновки наибо-

лее качественных, глютинозных, сортов риса содержат пониженное количество амилозы. Поэтому был проведен скрининг содержания амилозы в зерне районированных сортов, возделываемых в рисосеющих хозяйствах республики. По полученным данным, изученные сорта риса можно разделить на две группы: низкоамилозные – 17 сортов из 24 (70,83%) и среднеамилозные – 7 из 24 (29,17%). Глютинозные сорта среди районированных сортов Республики Казахстан отсутствуют, что обусловило необходимость их селекции.

У вышеуказанных сортов риса проведена идентификация аллельного состояния гена *Wx* с помощью ПЦР и с использованием праймера *Glu 23*. В результате ПЦР-анализа выявлено, что все изученные сорта являются амилозными: с помощью указанного праймера был амплифицирован продукт размером 173 пн, в то время как для глютинозного образца (*Nakucho-mochi*) характерен ПЦР-продукт величиной 196 пн.

Таким образом, результаты анализа состояния гена *Wx* также указывают на принадлежность всех изученных районированных сортов республики к низко- и среднеамилозным.

На рис. 1 видно, что специфический праймер *Glu-23* фланкирует фрагмент размером 173 пн у всех районированных сортов (образцы 1–24), тогда как у японского глютинозного стандартного образца *Nakucho-mochi* (образец 27) с помощью данного праймера амплифицирован ПЦР-продукт длиной 196 пн. Таким образом, показано, что низкое содержание амилозы коррелирует с наличием указанного ПЦР-продукта.

Российский глютинозный сорт Виола использовали в качестве материнской формы при создании глютинозных линий. Отцовской формой служили местные, адаптированные к почвенно-климатическим условиям рисосеющих регионов сорта казахстанской селекции (Баканасский и Акдала). Количество полученных гибридных зерновок из комбинации Виола × Баканасский составило 16 (завязываемость 13–24%), тогда как из комбинации Виола × Акдала получены 43 полноценных зерновки (завязываемость 20–80%). Необходимо учесть, что завязываемость гибридных зерновок анализировали в нерегулируемых оранжерейных условиях.

Высокая воспроизводимость результатов электрофоретического анализа позволяет использовать его для точной идентификации родительских форм, контроля этапов гибридизации, интрогрессии генетического материала, а также при изучении всех типов изменчивости, включая геномную. Известно, что запасные белки зерновых, в том



числе и риса, наследуются кодоминантно и соответствующие гены проявляются в спектре гетерозиготного генотипа в зависимости от дозы генов в триплоидном эндосперме (две дозы генов материнского и одна доза отцовского генома). Поэтому когда при электрофорезе запасных белков семян  $F_1$  Виола  $\times$  Баканасский отмечается проявление интенсивных белковых полос отцовской формы, например, компонента с молекулярной массой 60 кДа, это является весомым подтверждением гибридного происхождения данной линии. Полученные гибриды были использованы для ускоренного создания стабильных глютинозных форм риса с помощью гаплоидной технологии. Для быстрой стабилизации признака пониженного содержания амилозы у перспективных глютинозных гибридов  $F_1$  Виола  $\times$  Баканасский и  $F_1$  Виола  $\times$  Акдала применен метод культуры пыльников.

В опытах отмечена высокая скорость спонтанного удвоения числа хромосом в комбинации  $F_1$  Виола $\times$ Баканасский (94,9%), тогда как у  $F_1$  Виола  $\times$  Акдала этот показатель составил всего 25%, что говорит о генотипической зависимости данного показателя (см. табл. 3).

В результате настоящего исследования из 75 дигаплоидов гибрида  $F_2$  комбинации Виола $\times$ Баканасский выделено пять растений с полезными признаками и низким содержанием амилозы. Для установления сходства и(или) различия с родительскими формами был проведен электрофоретический анализ запасных белков семян у родительских форм сортов, гибридов и дигаплоидов риса. Дигаплоиды были глютинозными и не содержали компонент с молекулярной массой 60 кДа (так называемый Waxy-белок), уровень которого коррелирует с содержанием амилозы.

Доля амилозы в зерновке риса в основном контролируется локусом *Wx*, который включает аллели *Wxa*, *Wxb*, *Wx op*, *Wx in* и *wx*. В данной работе показано, что ген *wx* амилозных сортов принадлежит к *Wxa* типу, а глютинозные образцы – к *Wxb* типу. Содержание амилозы и амилопектина определяют пищевое качество риса [1, 2]. Доминантный ген *SSIIa* (*Alk*) способствует более твердой и менее липкой консистенции по сравнению с рецессивным геном *alk* [8]. При повышенном содержании амилозы ( $\geq 25\%$ ), обусловленном генами *Wxa* и *Wxb*, сохраняется форма и целостность ядер риса при кулинарной обработке. Результаты анализа SNP-маркеров показали, что амилозные сорта имеют функциональный доминантный *Alk*-ген, а глютинозные сорта – нефункциональный рецессивный *alk*-ген.

Таким образом, по результатам исследований выделены перспективные предселекционные образцы, которые будут использованы в получении новых казахстанских сортов глютинозного риса.

Авторы выражают глубокую признательность коллективу ВНИИ риса и лично доктору сельскохозяйственных наук проф. Г.Л. Зеленскому за любезно предоставленный для селекции исходный материал, теоретические и практические консультации и рекомендации. Мы благодарим также сотрудников лаборатории Crop Breeding Research Division Сельскохозяйственного исследовательского центра Японии (NARO, Hokkaido Agricultural Research Center) Drs. Norio Iriki и T. Umemoto за помощь при проведении молекулярно-генетических исследований и за консультации.

Данная работа финансировалась в рамках Проекта грантового финансирования 2168/ГФ4 КН МОН РК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sano Y. Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, 1984, 68, 467–473.
2. Sano Y., Katsumata M., Amano E. Correlation between the amount of amylose and *Wx* protein in rice endosperm. *SABRAO J.*, 1985, 17, 121–127.
3. Chen C.C., Tsay H.S., Huang C.R. Factors affecting androgenesis in rice (*O. sativa* L.). *Biotechnology in agriculture and forestry rice* [Ed Bajaj, Y.P.S.]. 1991, 14, 193–215. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 1986.
4. Ming Y. Zheng Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73(3), 213–230.
5. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. Краснодар: ВНИИ риса. 2012, 91.
6. Umemoto T., Horibata T., Aoki N., et al. Rice starch properties and eating quality of cooked rice affected by starch synthase variations, *Plant Prod. Sci.*, 2008, 11, 472–480.
7. Juliano B.O. A simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Sci. Today*, 1971, 16, 334–340.
8. Yamanaka S., Nakamura I., Watanabe K.N., et al. Identification of SNPs in the *waxy* gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication processes of rice, *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 108, 1200–1204.
9. Cai X.L., Wang Z.Y., Xing Y.Y., et al. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J.*, 1998, 14, 459–465.

10. Wanchana S., Toojinda Th., Tragoonrung S., et al. Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, 2003, 165, 1193–1199.
11. Larkin P.D., Park W.D. Association of waxy gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.*, 2003, 12, 335–339.
12. Chen M.H., Fjellstrom R.G., Christensen E.F., et al. Development of three allele-specific codominant rice Waxy gene PCR markers suitable for marker-assisted selection of amylose content and paste viscosity, *Mol. Breeding*, 2010, 26, 513–523.
13. Larkin P.D., Park W.D. Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. *Plant Mol. Biol.*, 1999, 40, 719–727.
14. Козьмина Е.П. Рис и его качество. М.: Колос, 1976, 34–46.
15. Лось Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса. *Сельхозбиология*, 1987, 12, 107–109.
16. Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In Proc. Symp. On plant tissue culture. Beijing, China: Science Press, 1978, 43–50.
17. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(13), 473–497.
18. Ando T., Takeuchi Y. Genetic analysis of the low-amylose characteristics of rice cultivars Oborozuki and Hokkai-PL9. *Breed. Sci.*, 2010, 60, 187–194.
19. Булатова К.М. Изучение компонентного состава глютеина пшеницы. *Вестник с.-х. науки Казахстана*, 1985, 4, 37–39.
20. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 10, 4321–4325.
21. Tran Th., Hiroaki M., Yoshiko T., et al. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding granule-bound starch synthase I on amylose content in Vietnamese rice cultivars. *Breed. Sci.*, 2014, 64, 142–148. doi: 10.1270×jsbbs.64.142
22. Hiratsuka M., Umemoto T., Aoki N., et al. Development of SNP markers of starch synthase IIa (*alk*) and haplotype distribution in Rice Core Collections. *Rice Genetic Newsletter*, 2009, 25, 80–82.
23. Зеленский Г.Л., Туманьян Н.Г., Логочникова Т.Н., и др. Эксклюзивные сорта в селекции ВНИИ риса. *Рисоводство*, 2004, 4, 20–23.
24. Коваленко В.И., Дуденко В.П. Культура риса в Казахстане. Алма-Ата: «Кайнар», 1974, 16.

## Obtaining of Doubled Haploid Lines for Selection of Glutinous Rice

I.A. SARTBAEVA<sup>1</sup>, B.N. USENBEKOV<sup>2</sup>, A.B. RYSBEKOVA<sup>2,3,\*</sup>, Zh.M. MUKHINA<sup>4</sup>, D.T. KAZKEEV<sup>5</sup>, K.Zh. ZHAMBAKIN<sup>2</sup>, E.A. ZHANBYRBAEV<sup>4</sup>, Kh.A. BERKIMBAI<sup>2</sup>, D.Sh. AKHMETOVA<sup>2</sup>, and A.A. MELDEBEKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Al-Farabi Kazakh National University, 050040, Almaty Kazakhstan

<sup>2</sup>The Institute for Plant Biology and Biotechnology (IBRR), 050040, Almaty Kazakhstan

<sup>3</sup>The Seifullin Kazakh University of Agrotechnics, 010000, Astana Kazakhstan

<sup>4</sup>The All-Russian Rice Research Institute (ARRRI), 350921, p/o Belozernyi, Krasnodar Russia

<sup>5</sup>The Kazakh National Agrarian University, 050010, Almaty Kazakhstan

e-mail: bakdaulet7@yandex.ru, aiman\_rb@mail.ru\*

Received 11 January, 2017

Accepted November 15, 2017

**Abstract**—A screening of zoned in the Republic of Kazakhstan rice varieties for the amylose content has been carried out. The allele state identification of the waxy gene using a marker of Glu-23 showed that all the studied varieties contain a medium amount of amylose as compared to the standard Japanese varieties. A hybridization of the Bakanasskii and Akdala Kazashstan varieties with the glutinous variety of Viola was performed to obtain low-amylose rice forms. A capacity of knotting hybrid grains in greenhouses was shown; those grains were sown in the greenhouse to obtain doubled haploids in the anthers culture. PCR

was used to identify the alleles of the *Wx* and *Alk* genes in the varieties and haploid lines using the Glu-23, SNP3, SNP4, Wx\_E6, Wx\_E10 and dCAPS markers. Therefore, promising lines of glutinous rice with economically valuable properties to be transferred to State Trials were created using the method of routine selection and following haploid technique.

*Key words:* doubled haploids, glutinous variety, rice anthers culture, amylose content, *waxy* gene.

**Acknowledgements**—The authors are deeply acknowledged to the staff of the All-Russian Rice Research Institute and personally to Prof. G.L. Zelenskii, PhD Agric. Sci., for kindly provided material for selection, and theoretical and practical consulting. We are also acknowledged to Drs. Norio Iriki and T. Umemoto, employees of the Crop Breeding Research Division of the National Agricultural Research Center (NARO, Hokkaido), for the assistance in molecular genetic studies and consulting.

The work was supported by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the framework of Grant Financing (Project 2168/GF 4 SC MES RK).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-26-36