

УДК 633.18:577.2:57.088

UDC 633.18:577.2:57.088

**СОЗДАНИЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ РИСА, НЕСУЩИХ ГЕН ШИРОКОГО СПЕКТРА УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ *Pi-40*, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ДНК-МАРКИРОВАНИЯ**

**CREATION OF RICE BREEDING LINES, CARRYING BROAD SPECTRUM BLAST RESISTANCE GENE *Pi-40* USING DNA-MARKERS METHODS**

Супрун Иван Иванович  
к.б.н., с.н.с.  
[supruni@mail.ru](mailto:supruni@mail.ru)

Suprun Ivan Ivanovich  
Cand.Biol.Sci., senior staff scientist  
[supruni@mail.ru](mailto:supruni@mail.ru)

Ковалев Виктор Савельевич  
д.с.-х.н. зам. директора института по научной работе

Kovalev Victor Savelyevich  
Dr. Sci.Agr., deputy director of science

Шиловский Валентин Николаевич  
д.с.-х.н. зав. отделом  
*Всероссийский научно-исследовательский институт риса, п.Белозерный, г.Краснодар, Россия*

Shilovskiy Valentin Nikolaevich  
Dr.Sci.Agr., head of the laboratory  
*All Russian Rice Research Institute, p.Belozerny, Krasnodar, Russia*

Представлены результаты работы по созданию селекционных форм риса, несущих ген широкого спектра устойчивости к пирикуляриозу *Pi-40*. Для идентификации доминантной аллели гена использовали ДНК - маркерный анализ. С применением кодоминантных ДНК-маркеров отобраны растения самоопыленных популяций, несущие доминантный аллель данного гена в гомозиготном состоянии

The results of development of rice breeding lines, carrying the wide range resistance gene to rice blast disease - *Pi-40*. For identification of the dominant allele of the gene the DNA - marker analysis was used. With co-dominant DNA markers plants from inbred populations that carry a dominant allele of this gene in the homozygous state were selected

Ключевые слова: ПИРИКУЛЯРИОЗ, ГЕНЫ ШИРОКОГО СПЕКТРА УСТОЙЧИВОСТИ, *PIRYCULARIA ORYZA*, МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ

Keywords: RICE BLAST DISEASE, BROAD SPECTRUM RESISTANCE GENES, *PIRYCULARIA ORYZA*, MARKER-ASSISTED BREEDING

Доминирующее положение, по степени вредоносности для риса, в Краснодарском крае занимает пирикуляриоз. Основными причинами распространения и вредоносности этого заболевания являются: использование сортов интенсивного типа, применение повышенных доз азотных удобрений, регуляторов роста, неоправданное увеличение норм высева семян, нарушение приемов технологии возделывания риса [1].

В Краснодарском крае при благоприятных для патогена условиях отмечается эпифитотийное развитие болезни [2].

В системе интегрированной защиты растений от болезней наиболее эффективным элементом является селекция устойчивых сортов, возделывание которых позволяет снизить объем применения пестицидов,

загрязняющих окружающую среду, и получить стабильный высококачественный урожай зерна риса. При этом особого внимания, с точки зрения эффективности, заслуживает создание сортов, несущих несколько генов устойчивости к патогену. Помимо создания сортов с пирамидированными (объединенными в одном генотипе) расоспецифическими генами устойчивости, перспективным является селекция сортов, несущих гены широкого спектра устойчивости к пирикулярриозу [3, 4].

Одна из наиболее современных селекционных технологий - ДНК-маркерная селекция, предполагает использование ДНК-маркеров для идентификации генов устойчивости в селекционном материале без проведения фитопатологического тестирования экспериментальных растений, что позволяет сохранить гибридные образцы и использовать максимальное их количество для выполнения возвратных скрещиваний, при необходимости. Использование ДНК-маркерного отбора дает возможность в максимально короткие сроки выполнять интрогрессию генов устойчивости из генетически отдаленной генплазмы путем выполнения серии возвратных скрещиваний, при постоянном контроле наличия целевых генов в гибридном потомстве с помощью ДНК-маркеров [5, 6].

Ген широкого спектра устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-40* в соответствии с современными литературными данными, обеспечивает устойчивость к широкому спектру рас патогена [7]. По данным выполненного ранее нами фитопатологического тестирования, линии риса, несущие данный ген, проявили высокую степень устойчивости к Краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза (от 4 до 13% ИРБ, при степени поражения сорта-стандарта Хазар 83%) [8].

Данный ген был интрогрессирован в геном культурного риса *Oryza sativa* подвида из дикого вида *Oryza australensis*. В качестве реципиента

при интрогрессии был использован корейский сорт подвида *japonica*. Была получена интрогрессивная линия IR65482-4-136-2-2, несущая данный ген. Эта линия в дальнейшем использовалась при создании гибридной популяции, при выполнении картирования данного гена. Кроме того, на ее основе корейскими учеными был создан ряд селекционных линий, несущих ген *Pi-40*.

Данный ген был картирован на коротком плече хромосомы 6. В настоящее время идентифицирована область генома с локализацией данного гена протяженностью 95 тыс. пар оснований (Рис. 1) [9].

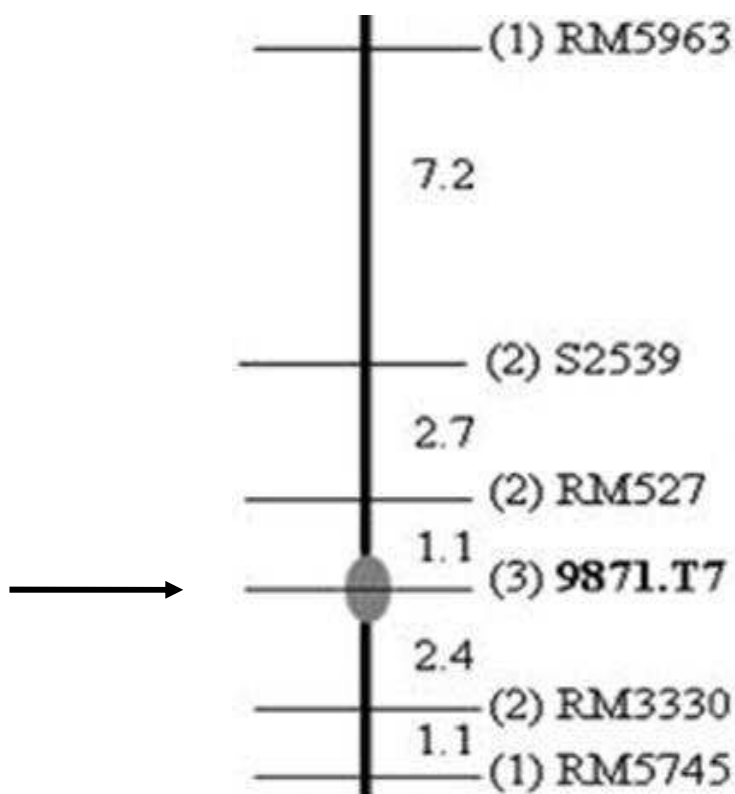


Рисунок 1 Генетическая карта области локализации гена широкого спектра устойчивости риса к пирикуляриозу *Pi-40*

На рисунке стрелкой отмечена локализация гена. ДНК-маркер 9871.T7 является косегрегирующим (сонаследуемым) с данным геном, что делает его наиболее ценным для использования в маркерной селекции. В то же

время, два фланкирующих микросателлитных локуса (RM527 и RM 3330), расположенных на дистанции 1,1 и 2,4 сантиморганид также представляют ценность, т.к. являются кодоминантными и могут выявлять гомо- и гетерозиготное состояние локуса данного гена. Это необходимо для идентификации гибридных растений, гомозиготных по доминантной аллели при получении самоопыленных потомств.

Широкий спектр устойчивости, определяемый данным геном, его эффективность по отношению к Краснодарской популяции возбудителя пирикуляриоза, а также наличие ДНК-маркеров, позволяющих проводить его ПЦР – идентификацию обусловили целесообразность выполнения представленной работы, основной целью которой являлось создание селекционных форм риса на основе отечественных сортов, несущих данный ген устойчивости.

### Материал и методы

Донором гена *Pi-40* послужили линии риса IR 83260-1-1-1-5-B, IR 83260-2-10-5-2-1-B. Линии риса, несущие ген устойчивости *Pi-40* были предоставлены ВНИИриса доктором К.К. Jena (IRRI) в рамках работы международного Консорциума TRRC.

Сортами реципиентами при создании линий, несущих ген устойчивости *Pi-40*, послужили отечественные сорта риса Хазар и Новатор, которые использовались в качестве материнской формы. Кроме того, реципиентом являлась и гибридная линия, несущая ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b*, созданная нами ранее на основе отечественного сорта риса Янтарь, с применением ДНК-маркерной селекции [10].

Гибридизация растений осуществлялась методом ТВЕЛЛ с применением пневмокастрации в лаборатории исходного материала [11].

Образцы ДНК выделяли из свежесрезанной части листовой пластинки гибридных растений на различных стадиях вегетационного развития. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 20мл 1М Tris-HCl (pH 7.5), 5 мл 5М NaCl, 5 мл 0.5М EDTA (pH 8.0), 5 мл 10% SDS в общем объеме 100 мл. Часть листа (2-3см) растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5мл. Инкубировали образцы при 60<sup>0</sup>С в течение 3 часов. Отделяли супернатант центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 500 мкл изопропанола, оставляли для преципитации на 10-20 минут при комнатной температуре, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 300мкл 70% этанола, высушивали и растворяли в 200мкл 0,1\*TE. В ПЦР смесь добавляли по 2,5 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом.

ПЦР проводили по стандартным методикам, с выполнением предварительной оптимизации экспериментальных параметров [12].

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР маркеров использовали 8% акриламидный гель на основе 1×Трис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М Борной кислоты, 2мМ ЭДТА, pH=8,2). Полимеризацию геля проводили при комнатной температуре в течение 30 минут. В качестве катализаторов полимеризации использовали ТЕМЕД и аммония персульфат, из расчета 40 мкл ТЕМЕДа (100% раствор) и 350 мкл аммония персульфата 10%-ного на 40 мл раствора геля.

После окончания полимеризации лунки геля промывали электродным 1×Трис-боратным буфером и проводили предварительный электрофорез без внесенных образцов, для удаления из геля остатков катализаторов и незаполимеризовавшегося акриламида, при

напряжении 150V, в течение 30 минут. После этого вносили в лунки геля по 10 мкл продуктов амплификации, предварительно смешав их с буфером нанесения (40% сахара, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% ксилен цианол), при этом соблюдали соотношение: продукты ПЦР/буфер нанесения = 5/1.

Электрофорез проводили при напряжении 250V в течение 4 часов для маркера 9871.T7E и 3 часов для ДНК-маркеров RM527 и RM 3330. В работе был использован аппарат вертикального электрофореза VE-3 фирмы Хеликон. После электрофореза гелевые пластины помещали на 10 минут в раствор бромистого этидия 5мкг/мл, и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

### **Результаты и обсуждение**

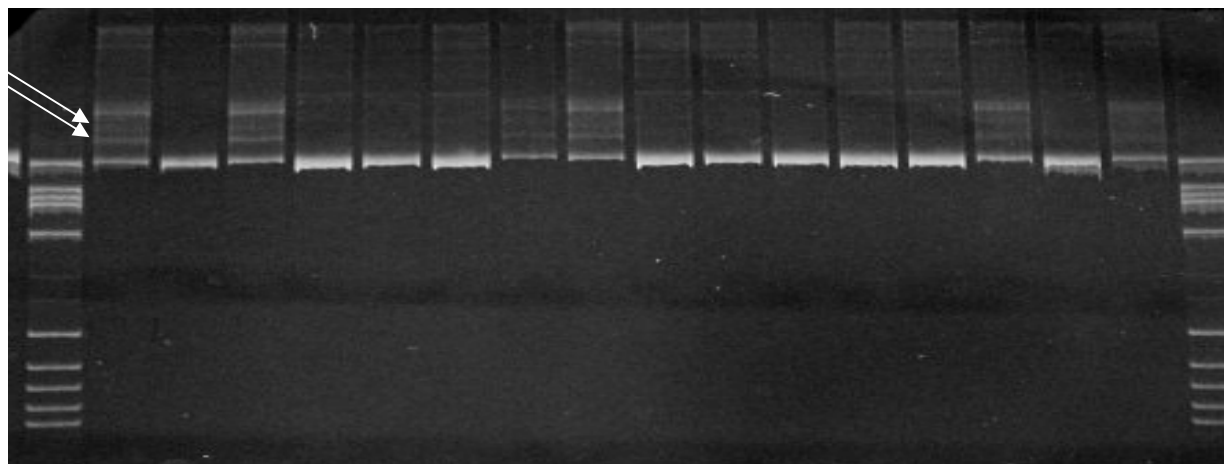
Ранее нами была проведена оценка линий-доноров данного гена по продолжительности вегетационного периода. В результате для гибридизации отобрали линии IR 83260-1-1-1-5-B, IR 83260-2-10-5-2-1-B, обладающие вегетационным периодом близким по продолжительности к сортам риса, районированным в Краснодарском крае.

После проведения гибридизации с отечественными сортами риса Хазар, Северный и Новатор, полученные гибридные растения F<sub>1</sub> были проанализированы с использованием наиболее сонаследуемого с данным геном ДНК-маркера - 9871.T7. Гибридные растения с идентифицированной доминантной аллелью использовались в качестве отцовских родительских форм при проведении возвратных скрещиваний.

Для проведения ДНК-анализа на начальном этапе были оптимизированы параметры ПЦР и электрофореза. Оптимальной для ДНК-маркеров использованных в работе определили следующую программу

ПЦР: начальная денатурация 5 мин. – 94°C, следующие 30 циклов(30 сек.- 94°C, 45 секунд –60°C, 45 секунд. – 72°C), финальный цикл синтеза 5 мин. – 72°C.

На рисунке 2 представлены результаты ПЦР - анализа с ДНК-маркером 9871.T7E2b, косегрегирующим с данным геном устойчивости.



МВ К+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 К+МВ

Рисунок 2 Результаты ДНК - маркерного анализа гибридных растений на предмет наличия доминантной аллели гена *Pi-40*.

МВ-маркер молекулярной массы ДНК; К + линия IR83260-1-1-1-5-B стандарт наличия доминантной аллели гена *Pi-40*. 1-сорт Хазар; 2-14 – образцы гибридной популяции: 2, 6, 7, 13, *Pi-40* «+» образцы; 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14 - *Pi-40* «-» образцы.

На рисунке стрелками обозначены целевые фрагменты, специфичные для доминантной аллели искомого гена устойчивости. Видно, что у образцов 2, 6, 7, 13, как и у положительного контроля, присутствует данный фрагмент. Это свидетельствует о наличии у них доминантной аллели гена *Pi-40*.

В дальнейшем ДНК - маркерный контроль наличия доминантной аллели гена *Pi-40* проводился в каждом последующем гибридном поколении, полученном при возвратном скрещивании. В настоящее

время получены  $BC_2F_1$  гибридные растения, несущие данный ген устойчивости в комбинации Хазар/IR 83260-1-1-1-5-В. Кроме того, в результате самоопыления гибридных растений были получены самоопыленные гибридные поколения  $F_3$  и  $BC_1F_3$  комбинациях Хазар/IR 83260-1-1-1-5-В, Новатор/IR 83260-2-10-5-2-1-В. Для идентификации гибридных растений, несущих доминантную аллель гена в гомозиготном состоянии использовали фланкирующие микросателлитные ДНК маркеры, являющиеся кодоминантными. На рисунках 3 и 4 представлены результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР по данным ДНК-маркерам у шести гибридных образцов поколения  $F_3$ .

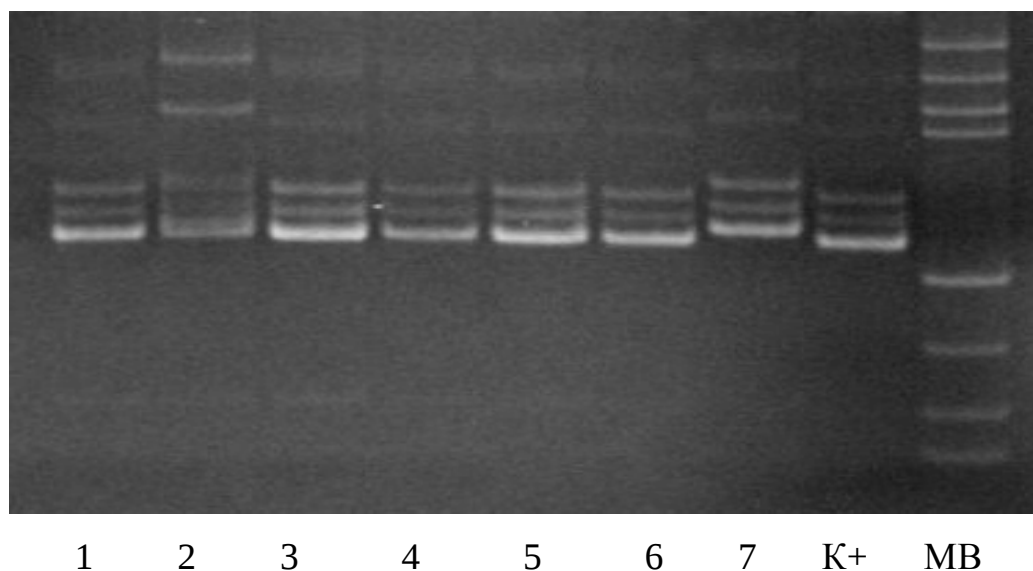


Рисунок 3 Результаты анализа гибридных растений с ДНК-маркером RM3330.

MB-маркер молекулярной массы ДНК; К + линия IR83260-1-1-1-5-В стандарт наличия доминантной аллели гена *Pi-40*; 7-сорт Хазар; 1-6 образцы гибридной популяции.

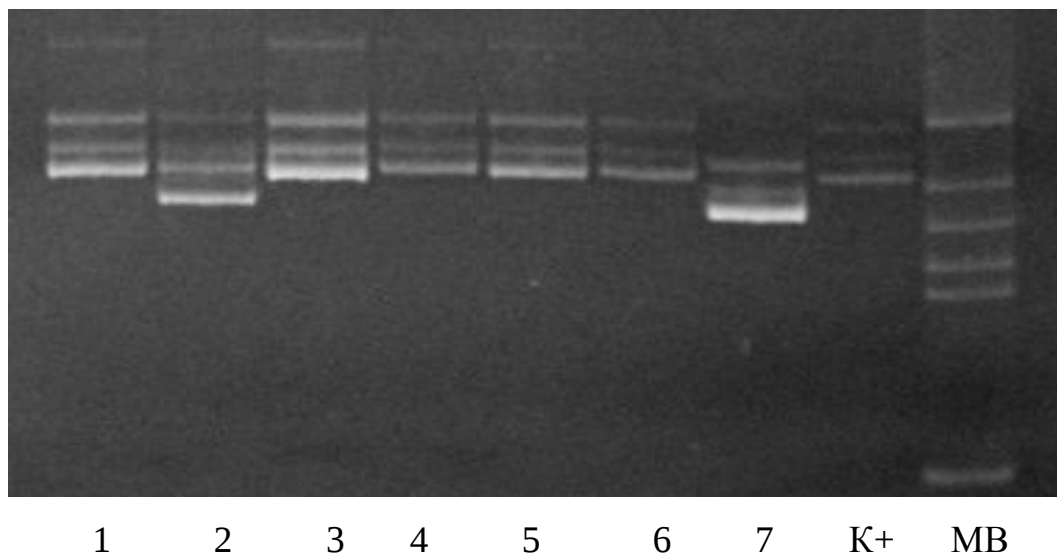


Рисунок 4 Результаты анализа гибридных растений с ДНК-маркером RM527.

MB-маркер молекулярной массы ДНК; К + линия IR83260-1-1-1-5-B стандарт наличия доминантной аллели гена *Pi-40*; 7-сорт Хазар; 1-6 образцы гибридной популяции.

На рисунках 3 и 4 видно, что у образцов 1, 3, 4, 5 и 6 присутствует только фрагмент, аналогичный по размеру ПЦР - продукту линии IR83260-1-1-1-5-B, что говорит о наличии у них доминантной аллели в гомозиготном состоянии. У образца номер 2, наряду с ПЦР - фрагментом, специфичным для доминантной аллели гена *Pi-40*, идентифицируется фрагмент, аналогичный фрагменту у сорта Хазар, и соответствующий рецессивной аллели. Это говорит о гетерозиготности локуса данного гена. Использование кодоминантных маркеров позволит отбирать растения, гомозиготные по доминантной аллели для дальнейшей их оценки по комплексу признаков в условиях селекционного питомника.

В дальнейшем нами планируется выполнить пирамидирование генов *Pi-b*, *Pi-z*, *Pi-ta* и *Pi-40* для получения форм риса с высокой степенью устойчивости к пирикуляриозу. На данный момент с этой целью выполнено скрещивание линии на основе сорта Янтарь, несущей доминантный аллель гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b* в

гомозиготном состоянии и гибридного растения  $BC_1F_3$  из комбинации Хазар/IR 83260-1-1-1-5-В с идентифицированным геном *Pi-40*. ДНК - маркерный анализ позволит выявить образцы, несущие оба указанных гена.

Таким образом, в результате выполненной работы, с применением ДНК-маркерного отбора, получены селекционные формы риса на генетической основе отечественных сортов и несущие ген широкого спектра устойчивости к пирикулярриозу. Наряду с этим начата селекционная программа по пирамидированию данного гена устойчивости с генами *Pi-b*, *Pi-z* и *Pi-ta*. Комбинирование нескольких генов с разным типом устойчивости позволит создать сорта, обладающие длительной устойчивостью к данному заболеванию риса.

***Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 11-04-96596-р\_юг\_ц.***

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Система рисоводства Краснодарского края: Рекомендации / Под общ. ред. Е.М.Харитоновой.- Краснодар: ВНИИ риса, 2005.- 340 с.
- 2 Зеленский Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, рисовой листовой нематодой и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: Автореф. дис....д-ра с.-х. наук.- Краснодар.- 1993.-48 с.
- 3 Leach J.E., Davidson R., Liu B., Manosalva P., Mauleon R., Carrillo G., Bruce, M., Stephens J., Diaz M. G., Nelson R., Vera Cruz C., Leung H. Understanding broad-spectrum durable resistance in rice // Rice Genet. 2007. V. 191-207.
- 4 Deng Y., Zhu X., Shen Y., He Z. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety // Theor. Appl. Genet. 2006. №113. P. 705–713.
5. Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур // Сельскохозяйственная биология.- 2003.- №3.- С.26-41.
- 6 Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding // Korean J. Breed.- 2003.- V.35.- P. 133-140
- 7 Suh J. P., Roh J. H., Cho Y. C., Han S. S., Kim Y. G., and Jena K. K. The *Pi40* Gene for Durable Resistance to Rice Blast and Molecular Analysis of *Pi40*-Advanced Backcross Breeding Lines // Phytopathology. 2009. №3. V. 99

8 Супрун И. И. Оценка линий риса с генами Pi-b, Pi-z и Pi-40 на устойчивость к Краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза (*Pyricularia oryza*) / Супрун И.И., Харченко Е. С.; Серая Л. И.; Ковалев В. С. // Электронный политематический научный журнал КубГАУ.- № 76(02).-2012. – режим доступа онлайн: <http://ej.kubagro.ru/2012/02/pdf/57.pdf>, шифр информрегистра: 0421200012\0105.

9 J. U. Jeung, B. R. Kim, Y. C. Cho et al. A novel gene, Pi-40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice // Theoretical and Applied Genetics 2007. V. 115. P. 1163–1177

10 Супрун И.И., Ильницкая Е.Т., Мухина Ж.М. Создание внутригенного ДНК-маркера гена устойчивости к пирикулярриозу риса Pi-b и его использование в практической селекции // Сельскохозяйственная биология. 2007. - № 5.- С. 63-66.

11 Лось Г.Д., Третьяков А.Р. Создание исходного материала для селекции риса // Рисоводство.- 2003.- №3.- С.12-13.

12 Шибата Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // Молекулярная клиническая диагностика.- М.: Мир, 1999.- С. 395-427.