УДК 633.18: 575.488.42

Е.В. Дубина [1], кандидат биологических наук, заведующая лабораторией;
П.И. Костылев[3], доктор биологических наук, заведующий лабораторией;
М.Г. Рубан [1], младший научный сотрудник;
Ю.В. Анискина[2], кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
И.А. Шилов[2], доктор биологических наук, заведующий лабораторией;
Н. С. Велишаева[2], кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
Л.В. Есаулова[1], кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
[1]ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» (350921, г. Краснодар, пос. Белозёрный, 3, тел.: 8-918-432-65-82, e-mail: lenakrug1@rambler.ru)
[2] ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, e-mail: ishilov@rambler.ru)
[3] ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»(347740, г. Зерноград, Научный городок, 3, тел.: 8-86359-43-0-50, e-mail: p-kostylev@mail.ru)

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ PYRICULARIA ORYZAE CAV. В РИСОСЕЮЩИХ ЗОНАХ ЮГА РОССИИ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ПЦР

На основе молекулярно-генетических подходов проведено изучение биоразнообразия фитопатогенного гриба Pyricularia oryzae Cav. на юге России. Проведен мониторинг и выделены изоляты патогена из поражённого гербарного материалы, собранного с полей шести рисосеющих зон Краснодарского края, обуславливающих разную степень вредоносности возбудителя пирикуляриоза риса. Составлены их ДНК-паспорта. Изученные изоляты возбудителя пирикуляриоза охарактеризованы по культурально-морфологическим признакам. На основе фитопатологического теста с использованием сортов-дифференциаторов риса выявлен количественный и качественный состав генов (а)вирулентности в грибных штаммах. Определены эффективные гены устойчивости к патогену на юге России, которые рекомендованы для селекционных программ по созданию резистентных сортов риса к пирикуляриозу.

***Ключевые слова**: рис, пирикуляриоз, изоляты, ПЦР, микросателлитные маркеры, ДНК-паспорта, гены (а)вирулентности.*

E.V. Dubina[1], Candidate of Biological Sciences, head of the laboratory;
P.I. Kostylev[3], Doctor of Biological Sciences, head of the laboratory;
M.G. Ruban[1], junior research officer;
Yu.V. Aniskina[2], Candidate of Biological Sciences, senior research officer;
I.A. Shilov[2], Doctor of Biological Sciences, head of the laboratory;
N.S. Velishaeva[2], Candidate of Biological Sciences, senior research officer;
L.V. Esaulova[1], Candidate of Biological Sciences, leading research officer,
[1]FSBSI "All-Russian Research Institute of Rice"

(350921, Krasnodar, v. of Belozerny, 3; tel.: 8-918-432-65-82; email: lenakrug1@rambler.ru)
[2]FSBSI "All-Russian Research Institute of agricultural biotechnology"
(127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; email: ishilov@rambler.ru)
[3]FSBSI Agricultural Research Center "Donskoy"
(347740, Zernograd, Rostov region, Nauchny Gorodok, 3; tel.: 8-86359-43-0-50; email: p-kostylev@mail.ru)

THE STUDY OF BIODIVERSITY OF *PYRICULARIA ORYZAE CAV.* IN THE RICE-GROWING AREAS OF THE SOUTH OF RUSSIA USING THE METHODS OF PCR

On the basis of molecular-genetic approaches there has been conducted the study of biodiversity of phyto pathogenic fungus *Pyricularia oryzae Cav.*in the south of Russia. We have conducted the monitoring and selected the isolates of the pathogen from the infected herbarium material, collected from the fields of six rice-growing areas of the Krasnodar Kray with various degree of harmfulness of rice blast pathogen. Their DNA-passports have been made. The studied isolates of the blast pathogen have been characterized in respect of their morphological traits. The phyto-pathological test with the application of varieties-differentiators of rice has established quantitative and qualitative composition of the virulent genes in fungus strains. The study has found the genes of pathogen tolerance, greatly efficient in the south of Russia, which can be recommended for the breeding programs for growing rice varieties resistant to rice blast.

Keywords: *rice, blast, isolates, PCR, microsatellite markers, DNA-passports, virulent genes.*

Введение. Пирикуляриоз, вызываемый несовершенным грибом *Pyricularia oryzae Cav. (Magnaporthe grisea (Herbert) Barr)* из порядка *Hyphomycetales,* – одно из самых вредоносных заболеваний риса, распространенное во всех регионах рисосеяния. В своём развитии гриб проходит вегетативную стадию (*Pyricularia oryzae Cav.),* представленную мицелием и конидиями, а также совершенную сумчатую стадию (*Magnaporthe oryzae (Herbert) Barr)*, наличие которых привело к использованию двух названий для обозначения этого возбудителя [1].

Помимо риса данный патоген вирулентен для более восьмидесяти видов культурных и дикорастущих растений. Контроль распространения пирикуляриоза риса через использование устойчивых сортов довольно сложен из-за высокой изменчивости патогена и благоприятных условий для развития заболевания в агроценозах.

Еще пару десятилетий назад фитопатологи для анализа вирулентности и генетической изменчивости возбудителей могли использовать только сорта –

дифференциаторы. Появление молекулярно-генетических методов дало возможность получать ДНК «отпечатки» возбудителя пирикуляриоза *Magnoporthe grisea (Herbert) Barr,* что открыло новую страницу в изучении его генетического разнообразия.

Целью исследования является изучение генетической структуры и биоразнообразия высоковариабельного грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae Cav.* юга России на основе методов ПЦР с использованием SSR-маркеров, а также идентификация эффективных генов резистентности к болезни. Такие знания представляют особый интерес, поскольку позволяют прогнозировать появление новых рас и патотипов *Pyricularia oryzae Cav.*, а также определять гены вирулентности в рисосеющих регионах России. Последнее является необходимой теоретической базой для создания генисточников с длительной устойчивостью к пирикуляриозу.

Создано несколько генетических карт этого патогена, включая, основанные на различных видах полиморфизма, такие как RAPD, RFLP, REMAP, изозимные, теломерные и т.д. [2-5]. Также создана физическая карта седьмой хромосомы с использованием BAC клонов и закрепленная на RFLP маркерную карту. Проведено сиквенирование всех 7 хромосом *Pyricularia grisea Sacc* [6, 7].

В 90-х годах прошлого века маркерный анализ *Pyricularia grisea* Sacc. в большинстве случаев основывался на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов и обычно анализировались дискретные клональные линии [8 ,9]. В 1993 году Bernardo с соавторами выполнен анализ популяции *Magnoporthe grisea* (Herbert) Barr при помощи метода RAPD и показана хорошая корреляция между основными группами выделяемыми RAPD и RFLP [10, 11]. Позднее были разработаны пары праймеров для амплификации мобильных элементов, присутствующих в геноме *Pyricularia grisea* Sacc. [12, 13]. На следующем этапе анализ изолятов *Magnoporthe grisea* (Herbert) Barr, выделенных с пораженных растений риса и элевзины, показал что изученные популяции возбудителей не имеют общих ДНК «отпечатков». На настоящий момент, для изучения возбудителя пирикуляриоза риса создано множество маркеров различного типа [14-16].

Полиморфизм простых, тандемно повторяющихся последовательностей ДНК (SSRs, микросателлитных повторов) обладает рядом преимуществ. Микросателлитные последовательности встречаются по всему эукариотическому геному. Они основаны на полимеразной цепной реакции, высоко репродуцибельны, кодоминантны и мультиаллельны [17]. При сравнении с другими маркерными системами показано, что микросателлитные маркеры давали лучшую генетическую характеристику для *Aspergillus fumigatus, Saccharomyces cerevisiae, Fusarium oxysporum и Fusarium circinatum* [18].

Материалы и методы. Для молекулярно-генетических исследований материалом послужили семидневные популяции (изоляты) патогена *Pyricularia oryzae Cav.*, выделенные из пораженного гербарного материала, собранного с рисовых полей 6 экологических зон рисосеяния Краснодарского края (Красноармейский, Темрюкский, Абинский, Калининский, Крымский, Северский), а также Ростовской области (Пролетарский район).

С использованием международного набора сортов-диференциаторов риса, полученного из Международного научно-исследовательского института риса (IRRI, Филиппины) методом фитопатологического тестирования [19] определяли гены вирулентности патогена для рисосеющей зоны юга России.

Сорта-дифференциаторы выращивали в поле в инфекционном питомнике ФГБНУ «ВНИИ риса». В фазе 5-6 листьев на растениях риса проводили инокуляцию суспензией конидий *Pyricularia oryzae Cav.* с прилипателем Твин-80 (0,0001%). Концентрация спор в суспензии – 10^5 конидий/мл, что соответствует 10-14 спорам в поле зрения микроскопа. Оценку реакции на инокуляцию суспензией *Pyricularia oryzae Cav.* проводили на седьмые сутки по методике, разработанной во ВНИИФ [19].

По результатам исследований проводили анализ вирулентности изолятов гриба по типу инфекции (величине пораженной листовой поверхности растений риса) [19], определяли патотип краснодарской популяции пирикулярии, расшифровывали количественное и качественное соотношение генов вирулентности.

Основным условием исследования любой патосистемы является возможность выделения чистой культуры патогена, которая основывается на методах получения изолятов и моноизолятов.

Культуру гриба выделяли из поражённых тканей риса (узлов стебля, листьев, частей метёлки), собранных в природе (рисовых полей), согласно методическим указаниям, разработанным во ВНИИ фитопатологии [1]. Образцы поражённой ткани промывали стерильной водой и помещали на стерильную морковно-сахарную агаризированную среду в чашки Петри во влажную (100%) камеру при оптимальной для образования конидий температуре 27±1°С.

Полученную чистую культуру культивировали в термостате до распределения колонии гриба по всей поверхности агаровой среды, затем проводили описание выделенных изолятов по культурально-морфологическим признакам. В результате выделенные изоляты *Pyricularia oryzae Cav.* распределяли в группы по признакам генетического родства.

Для молекулярно-генетических исследований возбудителя пирикуляриоза *Pyricularia oryzae Cav.* грибную ДНК выделяли из смеси мицелия и конидий моноконидиальной культуры гриба *Pyricularia oryzae Cav.* методом CTAB [20]. Метод заключается в использовании гексадецилтриметиламмония бромида в качестве детергента в лизирующем буфере.

Для идентификации изолятов возбудителя пирикуляриоза было синтезировано 30 пар праймеров со специфическими флюоресцентными красителями («Синтол», Россия). Использованные в работе SSR равномерно распределены по всем семи хромосомам *Pyricularia grisea Sacc* [21-23]. Их нуклеотидная последовательность взята из базы данных генетических ресурсов NCBI, доступной на web-странице http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. [24].

ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 1-х ПЦР-буфер, 1,25 ед. *Taq* ДНК-полимеразы, 100 мкмоль dNTP (ООО НПО ДНК-Технология, Россия), по 10 пкмоль каждого праймера, и по 5 мкл раствора ДНК. Амплификацию проводили в детектирующем термоциклере (CFX-BioRad, США) по программе: 95^{o}C – 10 мин, (94^{o}C – 30 с, 55^{o}C – 30 с, 72^{o}C - 30 с) 30 циклов. Фрагментный анализ проводили на автоматическом генетическом анализаторе «НАНОФОР-05» (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Работа выполнена при совместном сотрудничестве ВНИИСБ (г. Москва).

Данные маркеры высокополиморфны (73% локуса), что позволяет использовать их для геномного картирования, популяционного изучения и ДНК «паспортизации» возбудителя пирикуляриоза риса по всему миру[24].

Ранжирование выделенных изолятов патогена в группы по признаку генетического родства и коррелятивная зависимость между генотипом популяции *Pyricularia oryzae Cav.*, проводились на основе фитопатологического теста и её молекулярным (микросателлитным) «фингер-принтом».

Результаты. В результате обследования 14 рисосеющих хозяйств в шести экологических зонах Краснодарского края, а также ОС «Пролетарская» Ростовской области собран гербарный материал с признаками болезни. Из пораженных листьев, узлов, метелок растений риса выделено 11 штаммов (популяций) Magnaporthe grisea с различной спорулирующей способностью.

Изученные 16 штаммов патогена *Pyricularia oryzae Cav.*, выделенные из поражённого гербарного материала, по морфолого-культуральным признакам можно разделить на следующие группы:

- I – штаммы, имеющие порошистый характер роста колонии и цвет от светло до темно-серого;

- II – штаммы, имеющие войлочный характер роста и цвет колонии от светло-серого или светло-оливкового до серого или оливкового;

- III – штаммы, имеющие порошисто-лучистый характер роста колонии от темно-серого до бурого цвета;

-IV– штаммы, имеющие порошистую и клочковатую структуру от светло-серого до коричневого цвета.

К первой группе относятся штаммы №2 (Темрюкский район), № 38 (Абинский район), № 21 (Красноармейский район), № 50 (Калининский район). Ко второй группе – №5 (Абинский район), №8 (Ростовская область), №31 (Красноармейский район). К третьей группе – штамм №39 (Калининский район). К четвертой группе – штамм №37.

Для идентификации выделенных штаммов *Pyricularia oryzae Cav*. методом микросателлитного анализа были использованы ранее опубликованные последовательности 18 пар праймеров [20], на основе которых были разработаны две мультипраймерные системы для анализа в одной ПЦР-пробе одновременно 9 микросателлитных локусов.

В результате анализа генетического разнообразия изолятов были получены воспроизводимые результаты по всем 18 парам праймеров. Однако из них только 6 пар праймеров (Pyrms 07-08, Pyrms 37-38, Pyrms 77-78, Pyrms 101-102, Pyrms 233-234, Pyrms 409-410, Pyrms 453-454, Pyrms 533-34, Pyrms 657-658) оказались дискриминирующими для исследуемых штаммов *Pyricularia oryzae Cav.*

На основе этих шести SSR- праймеров была разработана мультипраймерная ПЦР – система (таблица 1), которая была использована для классификации штаммов грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae Cav.*, встречающихся в Краснодарском крае и Ростовской области.

1**.** Мультипраймерная ПЦР-система для генетического анализа изолятов возбудителя пирикуляриоза из разных экологических зон рисосеяния Краснодарского края и Ростовской области

№ пп	Праймеры	Флюоресцентный краситель	Генотип 1 Фрагмент ДНК, п.н.	Генотип 2 Фрагмент ДНК, п.н.	Генотип 3 Фрагмент ДНК, п.н.	Генотип 4 Фрагмент ДНК, п.н.
1	Pyrms 07-08	R6G	130	138	130	124
2	Pyrms 47-48	ROX	176	174	176	172
3	Pyrms 83-83	FAM	179	182	179	187

4	Pyrms 43-44	FAM	222	205	222	212
5	Pyrms 99-100	R6G	**223**	214	**220**	200
6	Pyrms 427-428	ROX	224	221	224	208

Примечание к таблице 3: синим цветом - флюоресцентный краситель FAM; зеленым - флюоресцентный краситель R6G; красным – флюоресцентный краситель ROX.

В результате анализа генетического разнообразия изолятов *Pyricularia oryzae Cav.* с использованием разработанной мультипраймерной системы были выявлены четыре группы, каждая из которых характеризуется уникальным генетическим профилем (рис. 1).

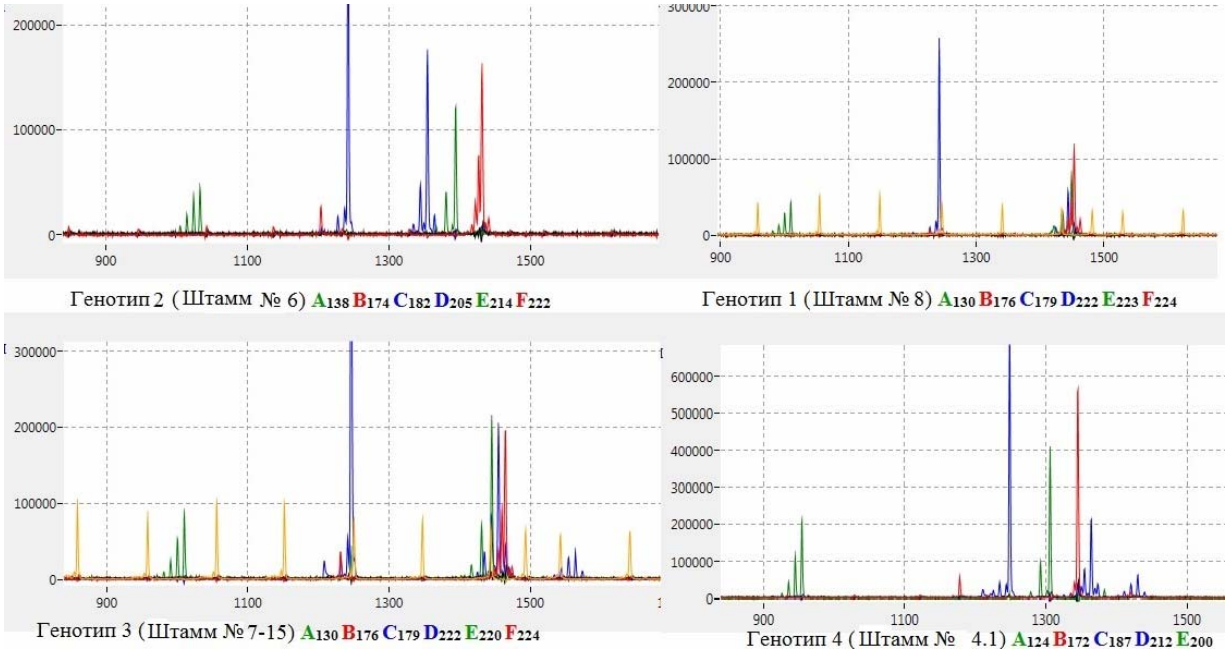

Рис. 1. Генетический профиль изученных изолятов *Pyricularia oryzae Cav*. 4 генотипов, выявленных на основе ДНК-анализа

В таблице 2 представлены «ДНК-паспорта», изученных в работе штаммов возбудителя пирикуляриоза.

2. Классификация штаммов возбудителя пирикуляриоза Pyricularia oryzae Cav. на основе полученных генетических профилей

Генотип	Формула	Название штамма
1	**A_{130} B_{176} C_{179} D_{222} E_{223} F_{224}**	2, V, 8
2	**A_{138} B_{174} C_{182} D_{205} E_{214} F_{222}**	5, 31, 39, 7, 6
3	**A_{130} B_{176} C_{179} D_{222} E_{220} F_{224}**	12, 21, 37, 38, 50, 11, 30, 31
4	**A_{124} B_{172} C_{187} D_{212} E_{200} F_{208}**	4

Из таблицы видно, что по результатам фрагментного анализа с использованием SSR-маркеров выявлены существенные различия между изученными в работе изолятами. Штаммы №№ 2, 8, V отнесены к генотипу 1, которые при описании по морфолого-культуральным признакам имеют одинаковый характер роста (порошистый) и цвет (от светло до темно-серого) колонии. Штаммы №№ 5, 31, 39, 7, 6 отнесены к генотипу 2. Они все, кроме штамма №39, при описании по морфолого-культуральным признакам имеют войлочный характер роста с цветом колонии от светло-серого или светло-оливкового до серого или оливкового. Штамм № 39 по культурально-морфологическим признакам имеет порошистый и лучистый характер роста колонии. В третью группу по результатам фрагментного анализа вошли штаммы №№ 12, 21, 37, 38, 50, 11, 30, 31, которые имеют некоторые отличия при описании по морфолого-культуральным признакам: часть штаммов имеют характер роста порошистый с войлочными зонами, а часть штаммов порошистый, но с низко клочковатым характером роста колонии (штаммы №№37, 50). К четвертому генотипу по результатам фрагментного анализа отнесен штамм № 4, имеющий войлочный характер роста и темно-серый цвет колонии, тогда как при описании по морфолого-культуральным признак в данную группу отнесен штамм №50, имеющий порошистый и клочковатый характер роста. На рисунке 2 представлены фотографии изолятов патогена четырех генотипов.

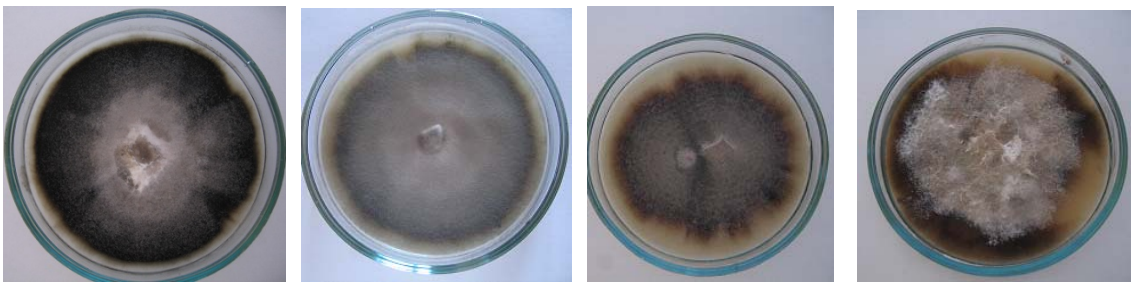

Рис. 2. Морфолого-культуральные признаки штаммов возбудителя пирикуляриоза (характер роста и цвет колонии)

Примечание к рисунку 2: А - штамм *Pyricularia oryzae Cav.* № 31, относящийся к генотипу I; Б - штамм № 2, относящийся к генотипу 2; В – штамм № 38, относящийся к генотипу III.

При сопоставлении результатов молекулярно-генетического анализа и описании штаммов *Pyricularia oryzae Cav.* по морфолого - культуральным признакам выявлены сходства по генотипам I, II и III. По генотипу IV при сопоставлении двух методов выявлены значительные отличия.

Таким образом, при ранжировании изолятов на группы метод ДНК-анализа и описание изучаемых изолятов по морфолого-культуральным признакам являются взаимодополняющими друг друга методами при изучении биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae Cav.*

Обсуждение. В результате проведенного исследования на основе морфолого-культуральных признаков, а также ДНК-профилей изученные в работе штаммы *Pyricularia oryzae Cav.* разделены на четыре генотипа. Выявленные на основе фрагментного анализа различия ДНК-профилей штаммов *Pyricularia oryzae Cav.* с их описанием по морфолого-культуральным признакам в генотипах III, IV можно отнести за счет того, что для молекулярно-генетических исследований использовались изоляты патогена, а не моноизоляты.

При выполнении работы по определению генов (а)вирулентности на основе фитопатологического тестирования с использованием набора сортов-дифферециаторов рас пирикулярии выявлены эффективные для юга России гены резистентности гриба *Pyicularia oryzae Cav.* Наличие такого большого количества эффективных генов можно объяснить тем, что более 20 лет в ВНИИ риса ведется направленная селекция по созданию устойчивых к пирикуляриозу сортов риса. Сорта Бластоник, Паритет, Витязь, Водолей, Талисман, Снежинка, Партнер, Патриот несут различные гены устойчивости к заболеванию. При сотрудничестве с «Аграрным научным центром «Донской» создан сорт риса Магнат с генами широкого спектра устойчивости *Pi-1*, *Pi-2* а также сорт Пентаген с пятью генами резистентности (*Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b)* [24-26]. Выявленные в проведенной работе эффективные гены устойчивости к пирикуляриозу рекомендуем использовать в селекционных программах по созданию резистентных к заболеванию сортов риса.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 16-44-230178 «Изучение генетической структуры популяции возбудителя Pyricularia oryzae Cav. и научное обоснование иммуногенетической защиты культуры риса» в лабораториях защиты риса, биотехнологии и молекулярной биологии Всероссийского научно-исследовательского института риса при совместном сотрудничестве с Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) и «Аграрным научным центром «Донской» (г. Зерноград).

Литература

1. Kovalenko, E.D. Methodical guidelines for assessing the resistance of rice cultivars to the causative agent of pyriculyariosis / E.D. Kovalenko, Yu.V. Gorbunova, A.A. Kovaleva and others - M., 1988. – 30 p.
2. Castiglioni P., Pozzi C., Heun M., Terzi V., Muller K. J., Rohde W., Salamini F. An AFLP-Based Procedure for the Efficient Mapping of Mutations and DNA Probes in Barley // Genetics.– 1998.– V. 149.– P. 2039-2056.
3. Kumar, J., R. и Zeigler (1995): Mating behaviour of Magnaporthe grisea from Central Himalayas of India. Phytopathology 85, 1201(Abstract).
4. Padmanabhan, S. Y., N. K. Chakrabarti, S. C. Mathur, J. Veerar-aghwan (1970): Identification of pathogenic races of Pyricularia o-ryzae in India. Phytopathology 60, 1574-1577.
5. Resurreccion A.P., Villareal C.P., Parco A., Second G., Juliano B.O. Classification of cultivated rices into indica and japonica types by the izozyme, RFLP, and two milled-rice methods // Theor. Appl. Genet.- 1994.- V.89.- P. 14-18.
6. Ahn S.N., Kim Y.K., Han S.S., Choi H.C., Moon H.P., McCouch S.R. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast // Rice Genet. Newsl.- 1996.- V.13.- P. 74-76.
7. Bryan G.T., Wu K.S., Farrall L., Jia Y., Hershley H.P. et al. tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta // The Plant Cell.– 2000.– V.12.– P. 2033-2045.
8. Lang N.T., Khush G.S., Huang N., Buu B. Fine mapping for blast resistance gene in rice (Oryza sativa L.) using bulked segregant analysis // Omonrice.– 2001.–V.1.– P. 1-8.
9. Launder E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural population // Genomics.– 1987.– V.1.– P. 174-181.
10. Arase S., Fujita K., Uehara T., Honda Y. and Isota J. Light-Enhanced Resistance to Magnaporthe grisea Infection in the Rice Sekiguchi Lesion Mutants // Journal of Phytopathology. – 2000. – Vol. 148. – P. 197-203.
11. Ayres N. M., McClung A. M., Larkin H. P. D. Bligh H.F. J., Jones C. A., Park W. D. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm // Theor. Appl. Genet.–1997.– V.94.– P. 773-781.
12. Jensen L.B., Courtous B., Shen L., Li Z., et al. Locating genes controlling allelopathic effects against barnyardgrass in upland rice // Agron. Journ.– 2001.– V.93.– P. 21-26.
13. Kaye C., Milazzo J., Rozenfeld S., Lebrun M.-H., Tharreau D. The development of simple sequence repeat (SSR) markers for Magnaporthe grisea and their integration into an established molecular linkage map // Fungal Genet Biol. – 2003. – Vol 40 (3). – P. 207-14.

14. Conaway-Bormans C.A., Marchetti M.A., Johnson C.W., McClung A.M., Park W.D. Molecular markers linked to the blast resistance gene Pi-z, in rice for use in marker-assisted selection // Theor. Appl. Genet.–2003.– V.107.– P. 1014-1020.;
15. Fuji K., Hayano-Saito Y., Sugiura N., Hayashi N., Saka N. et al. Gene analysis of panicle blast resistance in rice cultivars with rice stripe resistance // Breed. Res. 1999.– V.1.– P. 203-210.
16. Xia, J. Q., J. C. Corell, F. N., Lee, M. A. Marchetti, D. D. Rhoads (1993): DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in Magnaporthe grisea (Pyricularia grisea) population in two rice fields in Arkansas. Phytopathology 83, 1029-1035
17. Levy, M., F. J. Correa-Victoria, R. S. Zeigler, S. Shizong, J. E. Hamer (1993): Genetic diversity of rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. Phytopathology 83, 1427-1433.
18. Khush G.S., Brar D.S., Hardy B. Rice genetics VI.– Los Banos. 2001.– 488 p.
19. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research. – 1980. – №10. – P. 4321-4325.
20. Adreit, H. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea./* H. Adreit, D. Santoso, D. Andriantsimialona, W. Utami, J.L. Notteghem, M.H. Lebrun and D. Tharreau.// Journal compilation Molecular Ecology Notes, 2007, P. 667–670.
21. Li C. Y., Li J.B., LiuU L., Yang J., Su Y., Wang Y. Y., Xie Y., Ye M. and Zhu Y. Y. Development of minisatellite markers in phytopathogenic fungus, Magnaporthe grisea // Molecular Ecology Notes – 2007. – Vol.131. – P. 144-152.
22. Ahn S.N., Kim Y.K., Han S.S., Choi H.C., Moon H.P., McCouch S.R. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast // Rice Genet. Newsl.– 1996.– V.13.– P. 74-76.
23. Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.H., Tharreau, D., 2003. The development of simple sequence repeat markers for Magnaporthe grisea and their integration into an established genetic linkage map. Fungal Genet. Biol. 40, 207–214.
24. Usatov A.V., Kostylev P.I., Azarin K.V., Markin N.V., Makarenko M.S., Khachumova V.A., Bibov M.Yu. Introgression of the rice blast resistance genes Pi1, Pi2 and Pi33 into Russian rice varieties by marker-assisted selection / Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 2016. – T. 76. – № 1. – С.18-23.
25. Костылев П.И. Магнат – первый отечественны сорт риса, созданный на основе MAS-селекции / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редкин // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов», 15-17 марта 2016 г., Москва.

26. Костылев, П.И. Пентаген – новый сорт риса с пятью генами устойчивости к пирикуляриозу, созданный с помощью маркерной селекции / П.И. Костылев // Сборник Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС» 9-12 августа 2016 г. Том №2. С.113-121.

Literature

1. Kovalenko, E.D. Methodical guidelines for assessing the resistance of rice cultivars to the causative agent of pyriculyariosis / E.D. Kovalenko, Yu.V. Gorbunova, A.A. Kovaleva, et al. – M., 1988. – 30 p.

2. Castiglioni P., Pozzi C., Heun M., Terzi V., Muller K. J., Rohde W., Salamini F. An AFLP-Based Procedure for the Efficient Mapping of Mutations and DNA Probes in Barley // Genetics.– 1998.– V. 149.– P. 2039-2056.

3. Kumar, J., R. и Zeigler (1995): Mating behaviour of Magnaporthe grisea from Central Himalayas of India. Phytopathology 85, 1201(Abstract).

4. Padmanabhan, S. Y., N. K. Chakrabarti, S. C. Mathur, J. Veerar-aghwan (1970): Identification of pathogenic races of Pyricularia o-ryzae in India. Phytopathology 60, 1574-1577.

5. Resurreccion A.P., Villareal C.P., Parco A., Second G., Juliano B.O. Classification of cultivated rices into indica and japonica types by the izozyme, RFLP, and two milled-rice methods // Theor. Appl. Genet.– 1994.– V.89.– P. 14-18.

6. Ahn S.N., Kim Y.K., Han S.S., Choi H.C., Moon H.P., McCouch S.R. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast // Rice Genet. Newsl.– 1996.– V.13.– P. 74-76.

7. Bryan G.T., Wu K.S., Farrall L., Jia Y., Hershley H.P. et al. tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta // The Plant Cell.– 2000.– V.12.– P. 2033-2045.

8. Lang N.T., Khush G.S., Huang N., Buu B. Fine mapping for blast resistance gene in rice (Oryza sativa L.) using bulked segregant analysis // Omonrice.– 2001.–V.1.– P. 1-8.

9. Launder E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural population // Genomics.– 1987.– V.1.– P. 174-181.

10. Arase S., Fujita K., Uehara T., Honda Y. and Isota J. Light-Enhanced Resistance to Magnaporthe grisea Infection in the Rice Sekiguchi Lesion Mutants // Journal of Phytopathology. – 2000. – Vol.148. – P. 197-203.

11. Ayres N. M., McClung A. M., Larkin H. P. D. Bligh H.F. J., Jones C. A., Park W. D. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm // Theor. Appl. Genet.– 1997.– V.94.– P. 773-781.

12. Jensen L.B., Courtous B., Shen L., Li Z., et al. Locating genes controlling allelopathic effects against barnyardgrass in upland rice // Agron. Journ.– 2001.– V.93.– P. 21-26.

13. Kaye C., Milazzo J., Rozenfeld S., Lebrun M.-H., Tharreau D. The development of simple sequence repeat (SSR) markers for Magnaporthe grisea and their integration into an established molecular linkage map // Fungal Genet Biol. – 2003. – Vol 40 (3). – P. 207-14.

14. Conaway-Bormans C.A., Marchetti M.A., Johnson C.W., McClung A.M., Park W.D. Molecular markers linked to the blast resistance gene Pi-z, in rice for use in marker-assisted selection // Theor. Appl. Genet.– 2003.– V.107.– P. 1014-1020.;

15. Fuji K., Hayano-Saito Y., Sugiura N., Hayashi N., Saka N. et al. Gene analysis of panicle blast resistance in rice cultivars with rice stripe resistance // Breed. Res. 1999.– V.1.– P. 203-210.

16. Xia, J. Q., J. C. Corell, F. N., Lee, M. A. Marchetti, D. D. Rhoads (1993): DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in Magnaporthe grisea (Pyricularia grisea) population in two rice fields in Arkansas. Phytopathology 83, 1029-1035

17. Levy, M., F. J. Correa-Victoria, R. S. Zeigler, S. Shizong, J. E. Hamer (1993): Genetic diversity of rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. Phytopathology 83, 1427-1433.

18. Khush G.S., Brar D.S., Hardy B. Rice genetics VI.- Los Banos. 2001.– 488 p.

19. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. // Nucleic Acids Research. 1980. – №10. – P. 4321-4325.

20. Adreit H. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, Magnaporthe grisea / H. Adreit, D. Santoso, D. Andriantsimialona, W. Utami, J.L. Notteghem, M.H. Lebrun and D. Tharreau // Journal compilation Molecular Ecology Notes, 2007.– P. 667–670.

21. Li C. Y., Li J.B., LiuU L., Yang J., Su Y., Wang Y. Y., Xie Y., Ye M. and Zhu Y. Y. Development of minisatellite markers in phytopathogenic fungus, Magnaporthe grisea // Molecular Ecology Notes – 2007. – Vol.131. – P. 144-152.

22. Ahn S.N., Kim Y.K., Han S.S., Choi H.C., Moon H.P., McCouch S.R. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast // Rice Genet. Newsl.- 1996.– V.13.– P. 74-76.

23. Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.H., Tharreau, D., 2003. The development of simple sequence repeat markers for Magnaporthe grisea and their integration into an established genetic linkage map. Fungal Genet. Biol. 40, 207–214.

24. Usatov A.V., Kostylev P.I., Azarin K.V., Markin N.V., Makarenko M.S., Khachumova V.A., Bibov M.Yu. Introgression of the rice blast resistance genes Pi1, Pi2 and Pi33 into Russian rice varieties by marker-assisted selection / Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 2016. – T. 76. – № 1. – C.18-23.

25. Kostylev P.I., Krasnov E.V., Redkin A.A., et al. Magnate - the first domestic rice variety that is based on MAS-selection // The collection of materials of the International scientific and practical conference "Biotechnology in the comprehensive development of regions", 15-17 March 2016, Moscow. P. 63. (In Russian).

26. Kostylev PI, Krasnov EV, Redkin AA, et al. Pentagen - a new rice variety with five resistance genes to blast created by the selection marker // Collection of the International scientific-practical conference "Fundamental and applied research in bio-organic farming in Russia, CIS and the EU" on August 9-12. 2016. V.2. P.113-121. (In Russian).