

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНА ТОЛЕРАНТНОСТИ К ЗАТОПЛЕНИЮ (SUB-1A) В СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦАХ РИСА

Н. Н. Вождова, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, nvozhzh@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-2046-4000;

О. С. Жогалева, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, os.zogaleva@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-1477-3285;

А. Ю. Дубина, техник-исследователь лаборатории клеточной селекции, angel.myshastaja@yandex.ru, ORCID ID: 0000-0002-1432-7616;

П. И. Костылев, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории селекции и семеноводства риса, p-kostylev@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4371-6848
ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»,
347740, Ростовская обл., г. Зерноград, Научный городок, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

Культура риса относится к важнейшим сельскохозяйственным растениям мирового производства. Урожай риса обеспечивают питанием большое количество жителей регионов Азии и Тихого океана. В России производство этой культуры сосредоточено в нескольких регионах, к одному из которых относится Ростовская область. Тренд на экологизацию земледелия во всем мире и России становится все более устойчивым. Для борьбы с сорными растениями по экологичной безгербицидной технологии необходимо увеличение слоя воды при одновременном выживании растений риса. Чтобы такая стратегия срабатывала, необходимо создание сортов, устойчивых к затоплению. Целью нашего исследования являлось определение аллельного состояния гена устойчивости к затоплению Sub1A в селекционных образцах риса. Объект исследования – 90 образцов риса шестого поколения, выделенных из гибридов от скрещивания российских сортов с сортами-донорами гена. Анализ проводился следующими методами: выделения ДНК коммерческим набором «ДНК-Экстран-3» (Синтол, Россия), постановки классической ПЦР со специализированным диагностическим маркером Sub1A203, разделения ампликонов электрофорезом в 2 % агарозных гелях, анализа электрофореграмм в программном обеспечении Bio-Rad ImageLab 6.0.1. В результате проведенных анализов было идентифицировано аллельное состояние гена Sub1A у 90 образцов риса. Значительное количество образцов несло нефункциональный рецессивный аллель, у 19 образцов наличие гена не было установлено. В гетерозиготном состоянии ген Sub1A находился у 9 образцов. У 5 селекционных образцов идентифицировано наличие функционального доминантного аллеля целевого гена. Рекомендуется использование данных образцов в селекционной работе, направленной на создание новых сортов риса, устойчивых к длительному затоплению.

Ключевые слова: Sub-1, затопление, ген устойчивости, селекционные образцы, рис.

Для цитирования: Вождова Н. Н., Жогалева О. С., Дубина А. Ю., Костылев П. И. Определение аллельного состояния гена толерантности к затоплению (Sub-1A) в селекционных образцах риса // Зерновое хозяйство России. 2022. Т. 14, № 5. С. 15–19. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-82-5-15-19.



IDENTIFICATION OF THE ALLELIC STATE OF THE FLOOD TOLERANCE GENE (SUB-1A) IN RICE BREEDING SAMPLES

N. N. Vozhzhova, Candidate of Agricultural Sciences, senior researcher of the laboratory for cell breeding, nvozhzh@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-2046-4000;

O. S. Zhogaleva, junior researcher of the laboratory for cell breeding, os.zogaleva@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-1477-3285;

A. Yu. Dubina, research technician of the laboratory for cell breeding, angel.myshastaja@yandex.ru, ORCID ID: 0000-0002-1432-7616;

P. I. Kostylev, Doctor of Agricultural Sciences, professor, main researcher of the laboratory for rice breeding and seed production, p-kostylev@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4371-6848

FSBSI "Agricultural Research Center "Donskoy",
347740, Rostov region, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

Rice is one of the most important crops in the world. Rice crops provide food for many people in Asia and the Pacific. In Russia, the production of this crop is concentrated in several regions, one of which is the Rostov region. The trend towards the greening of agriculture throughout the world and in Russia is becoming more and more stable. In order to combat weeds using an environmentally friendly herbicide-free technology, it is necessary to increase the water layer on simultaneous surviving rice plants. For such a strategy to work, it is necessary to develop varieties that are resistant to flooding. The purpose of the current study was to identify the allelic state of the Sub1A flood resistance gene in breeding rice samples. The objects of the study were 90 rice samples of the sixth generation, identified in hybrids obtained from crossing Russian varieties with gene donor varieties. The analysis was carried out by such methods as DNA extraction using the "DNA-Extran-3" commercial kit (Sintol, Russia), classical PCR with the specialized diagnostic marker Sub1A203, separation of amplicons by electrophoresis in 2 % agarose gels, analysis of electrophoregrams in the software Bio-Rad ImageLab 6.0.1. As a result of the analysis, there was identified the allelic state of the Sub1A gene in 90 rice samples. A significant number of samples carried a non-functional recessive allele, the presence of the gene was not established in 19 samples. The Sub1A gene was in the heterozy-

gous state in 9 samples. The presence of a functional dominant allele of the target gene was identified in 5 breeding samples. There has been recommended to use these samples in breeding work aimed at developing new rice varieties resistant to prolonged flooding.

Keywords: *Sub-1, flooding, resistance gene, selection samples, rice.*

Введение. Рис относится к одной из важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Благодаря сборам его урожая ежегодно обеспечивается питанием большинство жителей Азиатского и Тихоокеанского регионов (Panda D. et al., 2021). В России производство риса сосредоточено в нескольких ареалах, таких как Дальний Восток, Краснодарский край, Ростовская область и др. (Силаева и Полутина, 2018).

С возникновением мирового тренда на экологизацию производства сельскохозяйственной продукции все более модным и прибыльным становится получение продовольственной продукции без применения химических средств (Ковальчук и Милорадов, 2021). Для того чтобы по такой экологичной технологии выращивать рис, не засоренный гигрофитными сорными растениями, необходимо значительно увеличивать слой воды для борьбы с ними. При этом растения риса также могут погибнуть, если не обладают одним из вариантов ухода от абиотического стресса – глубокого затопления.

В настоящее время известно о двух стратегиях борьбы растений риса с глубоким водным слоем (Oladosu et al., 2020). Первая – растения с высокой энергией роста стеблей все время держат над водой кончики своих листьев, тем самым продолжая нормальное развитие. Вторая – растения способны некоторое время проводить под слоем воды, а затем при уходе стресс-фактора продолжать свой рост.

Ген устойчивости к затоплению Sub1A входит в состав главного QTL Sub1 на хромосоме 9, который управляет устойчивостью риса к затоплению (по второму типу стратегии ухода от стресса), и имеет низкую рекомбинационную активность. Сиквенс региона Sub1 в сорте-источнике FR13A выявил 3 гена, предположительно связанных с кодированием факторов этилен-реагирования (ERF), Sub1A, Sub1B и Sub1C, которые идентифицированы как главные детерминанты устойчивости к затоплению (Xu et al., 2006).

Согласно проведенным за рубежом исследованиям ген Sub1A оказывает наибольшее влияние на формирование признака устойчивости к неблагоприятным условиям затопления (Septiningsih et al., 2009).

Цель нашего исследования – определение аллельного состояния гена устойчивости к затоплению Sub1A в селекционных образцах риса, полученных от скрещивания иностранных сортов-доноров с сортом российской селекции.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследования использовали 90 селекционных образцов риса F6, полученных от скрещивания иностранных сортов-доноров (Inbara 3 (Вьетнам), IR-64 (Sub-1)

(Филиппины), TDK-1 (Лаос), BR-11 (Бангладеш), CR-1009 (Индия)) с сортом российской селекции Новатор (ФНЦ риса, Краснодар). Эти образцы выращивались в чеках Обособленного подразделения «Пролетарское» ФГБНУ «АНЦ «Донской» в 2019 г. в КСИ (на делянках площадью 20 м²), на темно-каштановых почвах с малым содержанием гумуса, солонцеватых и тяжелосуглинистых. С каждой делянки производили отбор 10 лучших по хозяйственно ценным признакам образцов для последующего молекулярно-генетического анализа. Всего изучали растения с 9 делянок. Из них 5 делянок (Дон 7270, Дон 7272, Дон 7273, Дон 7275, Дон 7278) относились к комбинации скрещивания BR-11 × Новатор. Другие 4 делянки были представлены одной комбинацией скрещивания (Дон 7287 – CR-1009 × Новатор, Дон 7295 – с IR-64 × Новатор, Дон 7303 – TDK-1 × Новатор, Дон 7293 – Inbara 3 × Новатор).

Лабораторные анализы проводили в 2020 г. в лаборатории маркерной селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» (в настоящее время – лаборатория клеточной селекции). Семена образцов риса проходили процедуру измельчения с помощью гомогенизатора Bertin Precellys 24 в пробирках объемом 2,0 мл с наполнением из керамических шариков диаметром 28 мм. Для выделения ДНК из образцов использовали методику Murray (Murray and Thompson, 1980) и коммерческие наборы «ДНК-Экстран-3» (Синтол, Россия).

Для идентификации гена Sub1A нами использовался диагностический SSR-маркер Sub1A203 (праймеры: F 5' – CTT CTT GCT CAA CGA CAA CG – 3' и R 5' – AGG CTC CAG ATG TCC ATG TC – 3') (Septiningsih et al., 2009). Молекулярный размер ампликона маркера составляет 203 пары нуклеотидов.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Bio-Rad T-100. Условия амплификации: 94 °C – 5 мин, 35 циклов (94 °C – 60 с, 55 °C – 60 с, 72 °C – 2 мин), 72 °C – 5 мин. Состав реакционной смеси: общий объем 25 мкл, геномная ДНК – 3 мкл; 10x PCR-буфер – 2,5 мкл; MgCl₂ (25mM) – 2 мкл; смесь dNTPs (25mM) – 0,2 мкл; по 1 мкл каждого праймера (1 μmol); Taq-полимераза (5 U) – 0,5 мкл; деионизированная вода – 14,8 мкл.

Полученные продукты амплификации разделяли на 2-процентных агарозных гелях в течение 1 ч при напряжении 130 В. После окончания электрофореза все гели окрашивали в 0,1%-м растворе этидиум бромид в 0,5-кратном TBE-буфере. Детекцию электрофореграмм выполняли в ультрафиолете при помощи прибора Bio-Rad GelDoc XR+ и анализировали в приложении ImageLab 6.0.1.

В качестве контроля наличия генов устойчивости к глубокому затоплению использова-

ли иностранные сорта-доноры BR-11 и Inbara 3, а сорта Боярин и Вираж – в качестве контролей нефункционального аллеля. Для оценки размера выявленных ампликонов использовали маркер молекулярного веса Thermo Scientific GeneRuler 50 bp (50–1000 bp).

Математическую обработку данных выполняли в программе Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. По результатам наших исследований, проведенных в 2019–2020 гг., было оценено 90 селекционных линий риса на наличие аллелей гена устойчивости к затоплению Sub1A. В ходе анализов были получены электрофореграммы распределения целевых и нецелевых фрагментов ДНК, одна из них представлена на рисунке 1.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

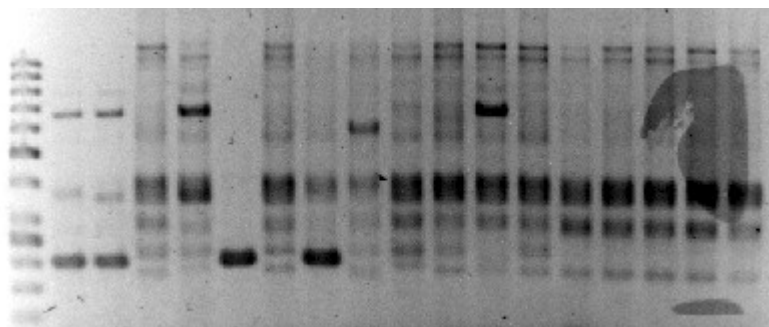


Рис. 1. Электрофореграмма скрининга образцов риса на наличие гена устойчивости к затоплению Sub1A на агарозном геле, 2020 г.: 1 – маркер молекулярного веса ThermoScientific GeneRuler 50+ bp (размеры полос снизу вверх – 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 п.н.); 2 – BR-11 (донор доминантного аллеля); 3 – Inbara 3 (донор доминантного аллеля); 4 – Дон 7287/1, 5 – Дон 7287/2, 6 – Дон 7295/1, 7 – Дон 7287/4, 8 – Дон 7303/1, 9 – Дон 7287/6, 10 – Дон 7287/7, 11 – Дон 7287/8, 12 – Дон 7287/9, 13 – Дон 7287/10, 14 – Дон 7295/1, 15 – Дон 7295/2, 16 – Дон 7295/3, 17 – Дон 7295/4, 18 – Дон 7295/5

Fig. 1. Electrophoregram of rice samples' screening for the presence of the Sub1A flood resistance gene on agarose gel, 2020: 1 – molecular weight marker ThermoScientific GeneRuler 50+ bp (band sizes from bottom to top – 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp); 2 – BR-11 (donor of the dominant allele); 3 – Inbara 3 (donor of the dominant allele); 4 – Дон 7287/1, 5 – Дон 7287/2, 6 – Дон 7295/1, 7 – Дон 7287/4, 8 – Дон 7303/1, 9 – Дон 7287/6, 10 – Дон 7287/7, 11 – Дон 7287/8, 12 – Дон 7287/9, 13 – Дон 7287/10, 14 – Дон 7295/1, 15 – Дон 7295/2, 16 – Дон 7295/3, 17 – Дон 7295/4, 18 – Дон 7295/5

Доминантный (функциональный) аллель гена устойчивости к затоплению размером 203 пары нуклеотидов выявлен у образцов № 6 (Дон 7295/1) и № 8 (Дон 7303/1), поскольку их ампликоны находятся на уровне ампликонов сортов-доноров этого гена.

У остальных образцов, представленных на рисунке 1, идентифицировано гетерозиготное аллельное состояние гена Sub1A или наличие нетипичных размеров аллелей.

На рисунке 2 представлена еще одна электрофореграмма скрининга образцов риса с маркером гена устойчивости к затоплению Sub1A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

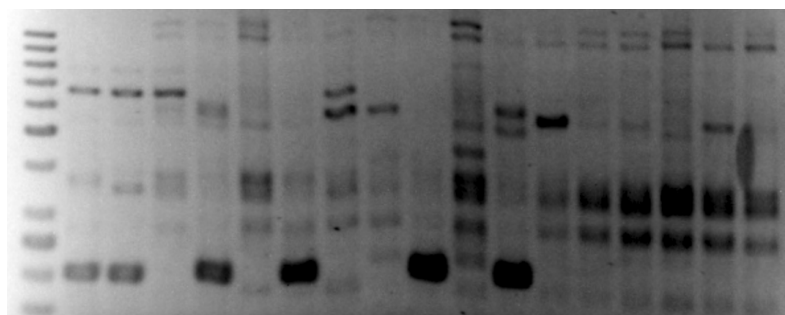


Рис. 2. Электрофореграмма скрининга образцов риса на наличие гена устойчивости к затоплению Sub1A на агарозном геле, 2020 г.: 1 – маркер молекулярного веса ThermoScientific GeneRuler 50+ bp (размеры полос снизу вверх – 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 п.н.); 2 – BR-11 (донор доминантного аллеля); 3 – Inbara 3 (донор доминантного аллеля); 4 – Дон 7275/1, 5 – Дон 7275/2, 6 – Дон 7275/3, 7 – Дон 7275/4, 8 – Дон 7275/5, 9 – Дон 7275/6, 10 – Дон 7275/7, 11 – Дон 7275/8, 12 – Дон 7275/9, 13 – Дон 7275/10, 14 – Дон 7293/1, 15 – Дон 7293/2, 16 – Дон 7293/3, 17 – Дон 7293/4, 18 – Дон 7293/5

Fig. 2. Electrophoregram of rice samples' screening for the presence of the Sub1A flood resistance gene on agarose gel, 2020: 1 – molecular weight marker ThermoScientific GeneRuler 50+ bp (band sizes from bottom to top – 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp); 2 – BR-11 (donor of the dominant allele); 3 – Inbara 3 (donor of the dominant allele); 4 – Дон 7275/1, 5 – Дон 7275/2, 6 – Дон 7275/3, 7 – Дон 7275/4, 8 – Дон 7275/5, 9 – Дон 7275/6, 10 – Дон 7275/7, 11 – Дон 7275/8, 12 – Дон 7275/9, 13 – Дон 7275/10, 14 – Дон 7293/1, 15 – Дон 7293/2, 16 – Дон 7293/3, 17 – Дон 7293/4, 18 – Дон 7293/5

В этом случае доминантный (функциональный) аллель гена устойчивости к затоплению размером 203 пары нуклеотидов выявлен у образцов № 5 (Дон 7275/2), № 7 (Дон 7275/4) и № 12 (Дон 7275/9), так как их ампликоны имеют размер, аналогичный таковому у сортов-контролей.

У образцов № 10 (Дон 7275/7) и № 11 (Дон 7275/8) идентифицированы нетипичные

аллели с размерами 212 и 220 пар нуклеотидов соответственно. Остальные образцы, представленные на рисунке 2, искомым ген не несли.

Распределение всех образцов риса, проанализированных по аллельному состоянию гена устойчивости к затоплению Sub1A, представлено в таблице.

Аллельное состояние гена устойчивости к затоплению Sub1A у образцов риса, 2020 г.
Allelic state of the Sub1A flood resistance gene in rice samples, 2020

Наименование аллельного состояния гена	Количество образцов, шт.
Функциональный доминантный аллель Sub1A в гомозиготном состоянии	5
Гетерозиготное состояние аллелей, Sub1A+sub1A	9
Нефункциональный рецессивный аллель sub1A в гомозиготном состоянии	57
Ген не выявлен	19

Всего в результате скрининга 90 образцов селекционного материала риса нами было выявлено 5 образцов (5,56 %) с функциональным аллелем гена устойчивости к затоплению Sub1A, имеющих ампликон размером 203 пары нуклеотидов (Дон 7295/1, Дон 7303/1, Дон 7275/2, Дон 7275/4 и Дон 7275/9). Гетерозиготное аллельное состояние гена Sub1A было выявлено у 9 образцов (10 %). Нefункциональный аллель sub1A был идентифицирован у 57 образцов (63,33 %). У 19 образцов (21,11 %) ген устойчивости к затоплению Sub1A не был идентифицирован, наблюдалась неамплифицированная ДНК на агарозных гелях.

Выявленные образцы с функциональным аллелем гена Sub1A рекомендуются к исполь-

зованию в качестве источников устойчивости к затоплению.

Выводы. В результате проведенного исследования идентифицированы селекционные образцы риса, имеющие функциональный аллель гена устойчивости к затоплению Sub1A – Дон 7295/1 (IR-64 × Новатор), Дон 7303/1 (TDK-1 × Новатор), Дон 7275/2 (BR-11 × Новатор), Дон 7275/4 (BR-11 × Новатор) и Дон 7275/9 (BR-11 × Новатор).

Рекомендуем использовать эти выявленные образцы риса с функциональным аллелем гена Sub1A в селекционной программе лаборатории селекции и семеноводства риса на устойчивость к затоплению.

Библиографические ссылки

1. Силаева Л. П., Полутина Т. Н. Специализированные зоны производства риса // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. № 7. С. 172–177. EDN PIQNTD.
2. Ковальчук А. П., Милорадов К. А. Производство чистых продуктов в условиях экологизации аграрного сектора экономики // Продовольственная политика и безопасность. 2021. Т. 8, № 3. С. 249–262. DOI: 10.18334/ppib.8.3.112312. EDN DAFZNC.
3. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8. P. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
4. Oladosu Y., Rafii M. Y., Arolu F., Chukwu S. C., Muhammad I., Kareem I., Salisu M. A., Arolu I. W. Submergence tolerance in rice: Review of mechanism, breeding and, future prospects. // Sustainability. 2020. Vol. 12. P. 1632. DOI: 10.3390/su12041632.
5. Panda D., Barik J. Flooding Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches // Rice Science. Vol. 28, Is. 1. 2021. P. 43–57. DOI: 10.1016/j.rsci.2020.11.006.
6. Xu K., Xu X., Fukao T., Canlas P., Maghirang-Rodriguez R., Heuer S., Ismail A. M., Bailey-Serres J., Ronald P. C., Mackill D. J. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice // Nature. 2006. Vol. 442, Is. 7103. P. 705–708.
7. Septiningsih E. M., Pamplona A. M., Sanchez D. L., Neeraja C. N., Vergara G. V., Heuer S., Ismail A. M., Mackill D. J. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond // Ann. Bot. 2009. Vol. 103. P. 151–160. DOI: 10.1093/aob/mcn206.

References

1. Silaeva L. P., Polutina T. N. Spetsializirovannye zony proizvodstva risa [Specialized rice production zones] // Vestnik Kurskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii. 2018. № 7. S. 172–177. EDN PIQNTD.
2. Koval'chuk A. P., Miloradov K. A. Proizvodstvo chistyykh produktov v usloviyakh ekologizatsii agrarnogo sektora ekonomiki [Production of clean products in the conditions of greening the «Agricultural sector of the economy»] // Prodovol'stvennaya politika i bezopasnost'. 2021. T. 8, № 3. S. 249–262. DOI: 10.18334/ppib.8.3.112312. EDN DAFZNC.
3. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8. P. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
4. Oladosu Y., Rafii M. Y., Arolu F., Chukwu S. C., Muhammad I., Kareem I., Salisu M. A., Arolu I. W. Submergence tolerance in rice: Review of mechanism, breeding and, future prospects. // Sustainability. 2020. Vol. 12. P. 1632. DOI: 10.3390/su12041632.

5. Panda D., Barik J. Flooding Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches // *Rice Science*. Vol. 28. I. 1. 2021. P. 43–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2020.11.006>.
6. Xu K., Xu X., Fukao T., Canlas P., Maghirang-Rodriguez R., Heuer S., Ismail A. M., Bailey-Serres J., Ronald P. C., Mackill D. J. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice // *Nature*. 2006. Vol. 442, Is. 7103. P. 705–708.
7. Septiningsih E. M., Pamplona A. M., Sanchez D. L., Neeraja C. N., Vergara G. V., Heuer S., Ismail A. M., Mackill D. J. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond // *Ann. Bot.* 2009. Vol. 103. P. 151–160. DOI: 10.1093/aob/mcn206.

Поступила: 15.09.22; доработана после рецензирования: 10.10.22; принята к публикации: 13.10.22.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют равные права на статью и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Вожжова Н. Н. – концептуализация исследования, сбор и анализ данных, подготовка рукописи; Жогалева О. С. – выполнение лабораторных опытов, Дубина А. Ю. – выполнение лабораторных опытов; Костылев П. И. – выполнение полевых опытов, концептуализация исследования.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.