

Е.В. Дубина¹, кандидат биологических наук;

П.И. Костылев², доктор сельскохозяйственных наук;

Л.В. Есаулова¹, кандидат биологических наук,

¹Всероссийский научно-исследовательский институт риса,

(г. Краснодар, пос. Белозёрный, 3; l.esaulova@mail.ru, lenakrug1@rambler.ru);

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт зерновых культур им. И.Г.

Калиненко,

(347740, г. Зерноград, Научный городок, д.3; vniizk30@mail.ru, p-kostylev@mail.ru)

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К *MAGNAPORTHE GRISEA* (HERBERT) BARR. И СОЗДАНИЕ НОВЫХ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМ (ДОНОРОВ) *ORYZA SATIVA* L. К ПАТОГЕНУ

Несовершенный гриб *Magnaporthe grisea* является фитопатогеном широкого спектра действия, охватывающего большинство семейств сельскохозяйственных культур, в том числе и рис. Экономический ущерб, наносимый заболеванием, значителен во всех зонах мирового рисосеяния и достигает высоких цифр.

Целью нашей научной работы является создание устойчивых сортов и линий риса с тремя и более генами устойчивости к пирикулярриозу с использованием методов молекулярного маркирования.

Нами проведено введение и пирамидирование генов резистентности к пирикулярриозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* в высокопродуктивные отечественные сорта риса для придания им длительной устойчивости к заболеванию.

ДНК-маркерный анализ позволил выявить устойчивые к болезни образцы риса, несущие 5 целевых генов в гомозиготном состоянии. Результаты фитопатологического тестирования показали их устойчивость к смеси изолятов патогена *M. grisea*, выделенных на территории Краснодарского края.

Для повышения экономической эффективности маркерной селекции нами разработана система мультиплексной ПЦР, позволяющая идентифицировать одновременно три гена *Pi-1+Pi-2+Pi-33* резистентности к *M. grisea* в геномной ДНК гибридных растений при постановке одной ПЦР. Её использование позволит значительно сократить затраты расходных материалов и время на выполнение анализа образцов риса.

Ключевые слова: рис, гены устойчивости к пирикулярриозу, SSR- маркеры, мультиплексная ПЦР.

E.V. Dubina¹, Candidate of Biology;

P.I. Kostylev², Doctor of Agricultural Sciences;

L.V. Esaulova¹, Candidate of Biology,

¹All-Russian Research Institute of Rice

(Krasnodar, v. Belozerny, 3; lesaulova@mail.ru, lenakrug1@rambler.ru)
²FSBSE All-Russian Research Institute of Grain Crops after I.G. Kalinenko
(347740, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3, vniizk30@mail.ru, p-kostylev@mail.ru)

DEVELOPMENT OF SYSTEMS OF MULTIPLEX PCR TO IDENTIFY GENES OF RESISTANCE TO MAGNAPORTHE GRISEA (HERBERT) BARR. AND SELECTION OF NEW RESISTANT FORMS (DONORS) ORYZA SATIVA L. TO PATHOGEN

Imperfect fungus *Magnaporthe grisea* is a phyto pathogen with a vast influence on most crops including rice. Economic damage of the disease is enormous in all rice cultivation zones of the world. The purpose of the work is to create some cultivars and lines of rice with tree and more genes resistant to pyriculariosis using the method of molecular marking. We introduced and pyramided of Pi-ta, Pi-b, Pi-1, Pi-2, Pi-33 genes resistant to pyriculariosis into domestic cultivars of rice to give them longer resistance to the disease. DNA-markers analysis allowed revealing disease resistant rice samples which possess 5 aimed genes in homozygous condition. The results of phyto pathological testing showed their resistance to a mixture of isolators of M.grisea pathogen, found in Krasnodar Krai. To increase economic efficiency of marker-assisted selection we developed a system of multiplex PCR which can simultaneously identify three Pi-1+Pi-2+Pi-33 genes resistant to M. grisea in a DNA genome of hybrids under one PCR. Its use allows reducing costs of material and time for analyzing of rice samples.

Keywords: rice, genes resistant to pyriculariosis, SSR-markers, multiplex PCR.

Введение. Несовершенный гриб *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr Yaegashi & Udagawa (анаморф *Pyricularia grisea*, пирикулярриоз) является фитопатогеном широкого спектра действия, охватывающего большинство семейств сельскохозяйственных культур, в том числе и рис. Экономический ущерб, наносимый заболеванием, значителен во всех зонах мирового рисосеяния и достигает высоких цифр (1).

Создание «иммунных» сортов риса - источников устойчивости к данному патогену - и быстрое внедрение их в производство является наиболее перспективным решением в борьбе с этим заболеванием. Их возделывание позволит сократить до минимума применение химикатов на рисовых полях и обеспечит пищевую безопасность продукции рисовой отрасли.

Однако создание устойчивости – одно из самых трудных направлений селекции. Вредители и особенно болезни имеют большой потенциал изменчивости, что в сочетании с их колоссальными способностями к размножению обеспечивает патогену высочайшие приспособительные возможности [2].

Объединение нескольких эффективных генов устойчивости на генетической основе элитных сортов - это результативная стратегия селекции на устойчивость к высоковариабельным грибным патогенам.

По многолетним исследованиям фитопатологов, гены расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу $Pi-z^t$, $Pi-ta^2$, $Pi-b$ и $Pi-ta$ являются эффективными для юга России [3]. Гены $Pi-ta$ и $Pi-b$ сиквенированы. Гены $Pi-1$, $Pi-2$, $Pi-33$ относят к генам широкого спектра резистентности риса к патогену [4]. Исследования показывают, что наибольший эффект перечисленные гены проявляют при совместном действии [5, 6].

Было установлено, что сорта риса, возделываемые на территории юга России, не обладают вышеуказанными эффективными генами устойчивости.

В связи с этим **целью** данной научной работы является создание на основе метода маркерной селекции сортов риса с разным типом устойчивости к пирикулярриозу в одном генотипе.

Исходя из поставленной цели, в ходе исследований предусматривалось выполнение следующих задач:

1. Выполнить программу по введению и пирамидированию генов устойчивости к пирикулярриозу $Pi-1$, $Pi-2$, $Pi-33$, $Pi-ta$, $Pi-b$ в отечественные высокопродуктивные сорта риса.
2. Выполнить оценку созданного селекционного материала на наличие в генотипе вышеуказанных генов методом ПЦР.
3. Разработать системы мультиплексной ПЦР для идентификации в гибридном потомстве одновременно несколько выше указанных генов.
4. Провести оценку созданного селекционного материала по комплексу морфологических признаков в условиях вегетационного и полевого опытов.

Материалы и методы. В качестве доноров переносимых генов устойчивости (отцовская форма) использовали линии зарубежной селекции С101-А-51 (донор гена $Pi-2$), С101-Лас($Pi-1$, $Pi-33$), IR-36 (донор гена $Pi-ta$), BL-1 (донор гена $Pi-b$). Предварительная оценка линий-доноров на чувствительность к местной популяции возбудителя пирикулярриоза, путём инокуляции растений риса культурой гриба, показала устойчивость тестируемых линий, но в условиях юга России данные линии-доноры проявили себя как позднеспелые с вегетационным периодом 140 - 155 дней и характеризовались низкой фертильностью. В местной зоне рисосеяния предпочтительно возделывание сортов, созревающих не более чем за 125 дней.

Материнской формой послужил высокопродуктивный районированный сорт риса Боярин.

При гибридизации растений использовали пневмокастрацию материнских форм и опыление «ТВЕЛЛ» - методом [2].

Из листовой пластинки гибридных растений ВС-популяций всех комбинаций были выделены образцы ДНК СТАВ-методом с модификациями [7]. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5M NaCl, 0.5M EDTA (pH 8.0), 10% SDS. Часть листа (2-3см) растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5 мл. Образцы инкубировали при 60° С в течение 3 часов. Затем охлаждали до комнатной температуры. Супернатант отделяли центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 250 мкл изопропанола, оставляли на 10 минут, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 250 мкл 70 % этанола, высушивали и растворяли в 50 мкл 0,1*TE. В ПЦР смесь добавляли по 3 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом.

ПЦР проводили по стандартной методике, но с предварительной оптимизацией её параметров.

При подборе комбинаций молекулярных маркеров, вносимых в реакционную смесь, учитывали их температуру отжига; разницу в размерах ПЦР-продуктов, синтезируемых в ходе амплификации с праймерными парами, и самокомплементарность их последовательностей.

В ПЦР смесь вносили как смесь ДНК сортов-стандартов с целевыми генами устойчивости, так и ДНК гибридных образцов, несущих комбинацию генов *Pi-1+Pi-2*, *Pi-33+Pi-ta*, *Pi-1+Pi-2+Pi-33*.

На начальном этапе нами были апробированы ДНК-маркеры на два гена *Pi-1+Pi-2* (рис.1), *Pi-33+Pi-ta*, а затем на три гена резистентности к патогену *Pi-1+Pi-2+Pi-33* (рис. 2). Для идентификации генов *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* использовали известные из литературных источников праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров RM224+RM527+SSR140+RM310+RM72 (сиквенс праймерных пар доступен на сайте gramene.com), а для идентификации гена *Pi-ta*—праймерные пары кодоминантного SSR-маркера PitaF1/PitaR1 и PitaF2/PitaR2, созданного в нашей лаборатории [8].

Мультиплексную ПЦР проводили с 40-50 нг ДНК, 0,1 μM dNTPs, 25mM KCL, 60 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,1% Тритон X-100б 10 mM 2-меркаптоэтанол, 1,5 mM MgCL₂, 1 единица Taq-полимеразы и 0,3 μM праймеров в конечном объёме 25 мкл. Амплификацию осуществляли в ДНК-амплификаторе «Терцик», оптимизировав при этом условия ПЦР.

Это позволяет получать высокий выход целевых амплифицированных фрагментов наряду с минимальным количеством неспецифичных амплификатов:

1. Начальная денатурация - 5 минут при 94°C -1 цикл.
2. 35 циклов: денатурация – 35 сек при 94°C; отжиг праймеров - 45 с при 60° C; синтез - 30 с при 72°C.
3. Синтез 5 мин при 72°C -1 цикл.

При электрофорезе использовали 8%-й полиакриламидный гель. После электрофореза гелевые пластины помещали на 20-30 минут в раствор бромистого этидия (5 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты использования технологии ДНК-маркерной селекции (marker assisted selection – MAS - селекция с применением ДНК маркеров к генам интереса. Нами совместно с Костылевым П.И. (ВНИИЗК им. И.Г. Калининко) проведено введение генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* в высокопродуктивные отечественные сорта риса, адаптированные к агроклиматическим условиям рисосеяния юга России. Эта стратегия была использована для придания этим сортам длительной устойчивости к заболеванию.

Серия проведенных скрещиваний позволила получить линии риса на основе сорта Боярин с пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* в гомозиготном состоянии (рис.1-3). В течение всех циклов возвратных скрещиваний перенос доминантных аллелей каждого такого гена в потомстве контролировался тесно сцепленными молекулярными маркерами. Растения, в генотипе которых аллели устойчивости не обнаруживали, выбраковывали.

Для повышения экономической эффективности маркерной селекции при проведении ПЦР-анализа нами разработана система мультиплексной (мультипраймерной) ПЦР, позволяющая определять одновременно последовательности двух (*Pi-1*+*Pi-2* (рис.1), *Pi-33*+*Pi-ta*) и трёх генов (*Pi-1*+*Pi-2*+*Pi-33*, рис.2) резистентности к *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr в геномной ДНК гибридных растений при постановке одной реакции, что существенно снижает себестоимость анализов в количество раз, равное количеству идентифицируемых генов за одну реакцию.

На рисунке 1 представлены результаты апробации комбинации пар праймеров, фланкирующих маркерные участки целевых генов *Pi-1*+*Pi-2*.

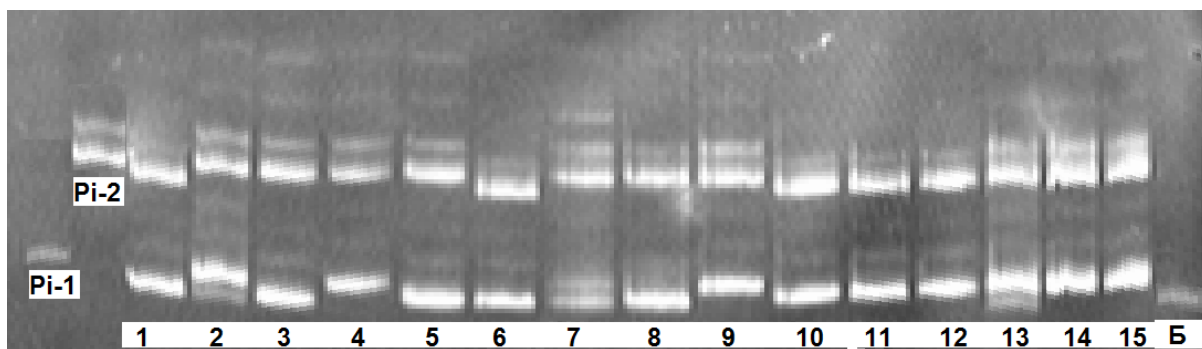


Рис. 1. Мультиплексная ПЦР на гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*:

1-15 – гибридные растения;

Pi-1- линия С101-Лас-стандарт на ген *Pi-1*;

Pi-2- линия С101А-51-стандарт на ген *Pi-2*; Б – сорт Боярин.

На первом этапе работы нам удалось отобрать комбинацию, позволяющую безошибочно проводить идентификацию генов устойчивости к патогену *Pi-1+Pi-2* при их одновременном присутствии в изучаемых гибридных образцах. У образцов под №№ 2, 4, 9,13-15, несущих доминантные аллели двух генов устойчивости, присутствуют специфичные для них ПЦР-продукты. Чёткость идентификации на электрофореграмме даёт возможность безошибочно определить наличие доминантных аллелей целевых генов.

В ходе дальнейшей работы была апробирована и отобрана комбинация пар праймеров, фланкирующих маркерные участки целевых генов *Pi-1+Pi-2+Pi-33* (рис.2).

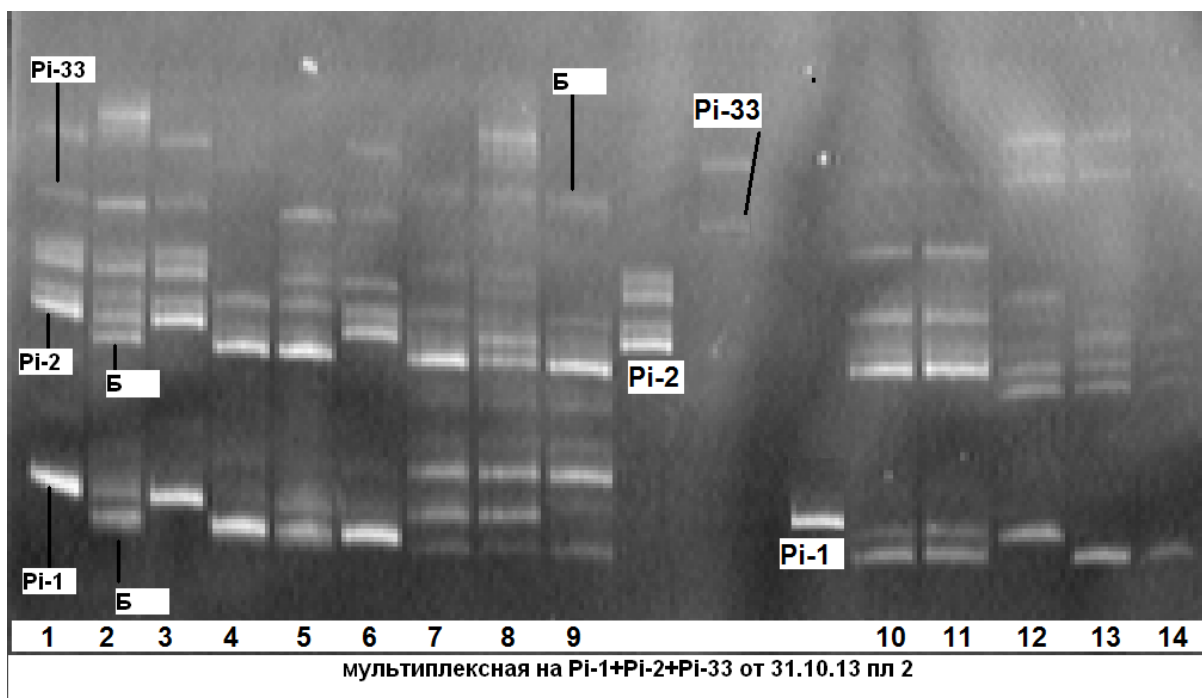


Рис.2. Мультиплексная ПЦР на гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2+Pi-33*:

1-14 – гибридные растения, несущие гены *Pi-1+Pi-2+Pi-33*;

Pi-1, Pi-33- линия С101Лас-стандарт на гены *Pi-1*, *Pi-33*;

Pi-2- линия С101А-51-стандарт на ген *Pi-2*;

Б – сорт Боярин.

Из электрофореграммы видно, что подобранная нами комбинация праймерных пар, фланкирующих маркерные участки генов *Pi-1+Pi-2+Pi-33*, позволяет также безошибочно проводить идентификацию этих генов при одновременном их присутствии в изучаемых образцах. У образцов под №№ 1, 3, несущих доминантные аллели указанных трёх генов устойчивости, присутствуют специфичные для них ПЦР-продукты. Образец под № 6 несёт гены устойчивости *Pi-2+Pi-33* в гомозиготном состоянии, ген *Pi-1* - в гетерозиготном.

Разработанная мультиплексная технология внедрена нами в систему маркерной селекции риса по созданию устойчивых к пирикулярриозу генресурсов данной культуры.

На рисунке 3 представлены результаты ПЦР-анализа на наличие в этих же анализируемых гибридных образцах гена *Pi-b*.

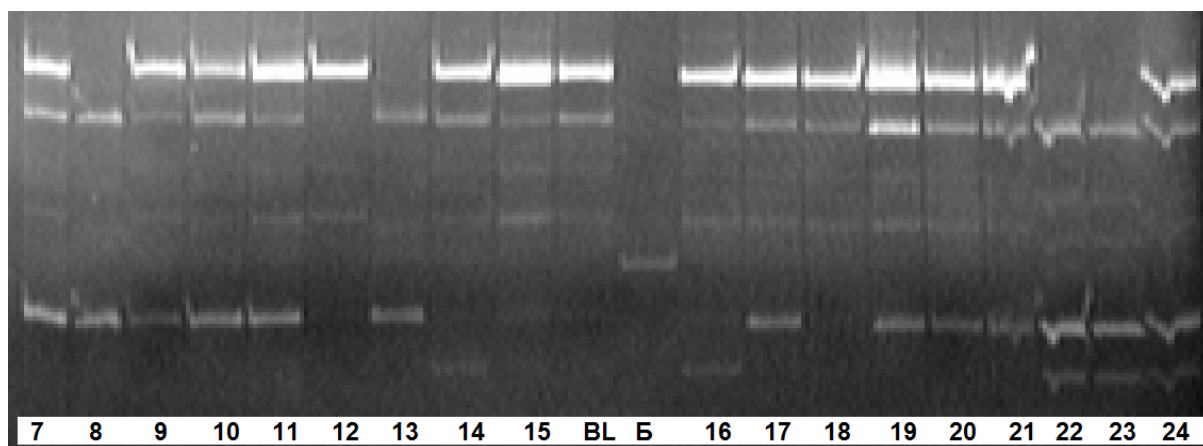


Рис. 3. ПЦР на ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b*:

7-24 – гибридные растения, несущие ген *Pi-b*;

BL – BL-1 донор гена *Pi-b*, стандарт;

Б – сорт Боярин.

Из электрофореграммы видно, что все проанализированные гибридные образцы несут доминантную аллель гена *Pi-b*.

Для селекции риса на современном этапе желательным является низкорослый тип растений с высокой интенсивностью первоначального роста, устойчивый к полеганию, с продуктивной метёлкой и неосыпающимися в фазу полной спелости колосками. Среди растений, которые по результатам ДНК-анализа, несли пирамидированные гены, удалось отобрать несколько форм, совмещающих в себе скороспелость, низкорослость, неосыпаемость и фертильность колосков.

Работа продолжается.

Выводы

1. В результате проведенных исследований с помощью современных биотехнологических методов (молекулярное маркирование на основе ПЦР) в сочетании с традиционной селекцией в короткие сроки получены линии риса, в генотипе которых собрано пять эффективных генов резистентности к пирикулярриозу (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b). Внедрение таких сортов в производство позволит избежать эпифитотийного развития болезни, сохранить биологическую урожайность риса и получать экологически чистую сельхозпродукцию.

2. Разработана схема мультиплексной ПЦР идентификации одновременно двух и трёх генов устойчивости к пирикулярриозу: *Pi-1+ Pi-2* и *Pi-1+Pi-2+Pi-33*. Её использование позволит значительно сократить затраты расходных материалов и времени на выполнение анализа образцов с указанными пирамидированными генами резистентности к патогену, что повышает экономическую эффективность ДНК-маркерной селекции.

Литература

1. Зеленский, Г.Л. Перспективы создания сортов риса с высокой продуктивностью и адаптивными качествами/Г.Л. Зеленский // Рисоводство.- 2003 г. – № 3.- С. 11.
2. Зеленский, Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, рисовой листовой нематоды и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: автореферат диссертации доктора с.-х. наук/ Г.Л. Зеленский. – Краснодар. - 1993. – 49 с.
3. Дьяков, Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология/Ю.Т. Дьяков, О.Л. Озерецковская, В.Г. Джавахия, С.Ф. Багирова.- М.: Общество фитопатологов, 2001. - 301 с.
4. Хавкин, Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур/ Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология.- 2003. - № 3. - С. 26-41.
5. Коваленко, Е.Д. Методические указания по оценке устойчивости сортов риса к возбудителю перикулярриоза /Е.Д. Коваленко, Ю.В. Горбунова, А.А. Ковалева и др. - М., 1988. – 30 с.
6. Коломиец, Т.М. Отбор исходного материала риса для селекции на иммунитет к пирикулярриозу:автореферат диссертации кандидата биологических наук/Т.М. Коломиец.- Голицыно, 1990.- 21 с.
7. Murray, M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA/M.G. Murray, Thompson Genomt.- V. 40.-p. 379-378.
8. [Мухина Ж.М., Токмаков С.В., Мягких Ю.А., Дубина Е.В. Создание внутригенных молекулярных маркеров риса для повышения эффективности селекционного и](#)

Literature

1. *Zelensky, G.L.* Perspectives of rice selection with high productivity and adaptive properties/G.L. Zelensky // Rice-growing. - 2003. – № 3. P. 11.
2. *Zelensky, G.L.* Selection of rice cultivars, resistant to pyriculariosis, rice blast disease and bacterial burn in the conditions of RF: synopsis on scientific degree of doctor of Agricultural sciences competition/ G.L. Zelensky.- Krasnodar. – 1993. – 49 p.
3. *Diakov, Yu.T.* General and Molecular Phytopathology/Yu.T. Diakov,O.L. Ozeretskovskaya, V.G. Dzhavakhiya,S.F. Bagirova.- M.:Society of Phytopathologists, – 2001. 301 p.
4. *Khavkin, E.E.* Molecular plant selection: DNA-technology for selection of new cultivars of crops/E.E. Khavkin // Agricultural Biology. - 2003. - № 3. - P. 26-41.
5. *Kovalenko, E.D.* Methodical instructions on assessment of rice resistance to pyriculariosis/E.D. Kovalenko,Yu.V. Gorbunova,A.A. Kovaleva and others. - M., 1988. – 30 p.
6. *Kolomiets, T.M.* Selection of initial material of rice for selection on immunity to pyriculariosis: synopsis on scientific degree of doctor of Biology competition/T.M. .- Golitsyno, 1990.- 21 p.
7. *Murray, M.G.* Rapid isolation of high molecular weight plant DNA/M.G. Murray, Thompson Genomt.- V. 40.-P. 379-378.
8. Mukhina Zh.M., Tokmakov S.V., Myagkikh Yu.A., Dubina E.V. Development of intragenic molecular markers of rice to increase efficiency of selection and seed-growing processes// Polythematic network e-journal of KubSAU. - 2011- № 67 (03).