

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ РИСА PI-1, PI-2, PI-33, PI-40, PI-TA, PI-B

О. В. Шумская, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, oksana-shumskaya@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-7285-5580;

Н. Н. Вожжова, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, nvzhzh@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, агроном лаборатории клеточной селекции, Lina.Dybina@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, ул. Научный городок, д. 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

Рис является ценной культурой, используемой для питания во всем мире. Для создания современных урожайных и устойчивых к болезням сортов риса необходимо ускорение селекционного процесса при помощи методов молекулярной биологии. Целью наших исследований являлась идентификация аллелей шести генов устойчивости к пирикулярриозу (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-40, Pi-ta и Pi-b) у селекционных образцов риса при помощи методов MAS (маркер-ассоциированной селекции). Объектом исследования служили 446 селекционных образцов риса, переданных в лабораторию клеточной селекции для анализа селекционерами из лаборатории селекции и семеноводства риса ФГБНУ «АНЦ «Донской». Идентификация генов в них проводилась дифференцированно и была обусловлена родословной образцов. Для определения аллелей генов устойчивости к пирикулярриозу Pi-1, Pi-2 и Pi-33 были изучены все 446 образцов, для гена Pi-40 – 20 образцов, для гена Pi-ta – 316 шт. Для экстракции ДНК использовали набор «ДНК-Экстран-3» российского производства. ПЦР проводили с помощью специфических праймеров целевых генов. Идентификацию продуктов реакции выполняли на агарозных гелях после фотографирования в ультрафиолете. В результате проведенного исследования были выделены образцы риса, которые несут от 1 до 5 генов устойчивости к пирикулярриозу в различных сочетаниях. Идентифицировано 14 образцов, которые обладают набором из 5 генов устойчивости, таких как 2723, 2724, 2727, 2728, 2729, 2730, 2733, 2735, 2736, 5007, 5671, 5673, 5450/2 и 2450/2. Информация, полученная по результатам проведенных нами исследований, далее может быть применена селекционерами для использования ценных генотипов в качестве доноров при скрещиваниях, а также для отбора перспективного селекционного материала, устойчивого к пирикулярриозу.

Ключевые слова: рис, идентификация генов, пирикулярриоз, устойчивость, молекулярные маркеры.

Для цитирования: Шумская О. В., Вожжова Н. Н., Жогалева О. С., Дубина А. Ю., Костылев П. И. Идентификация генов устойчивости к пирикулярриозу риса Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-40, Pi-ta, Pi-b // Зерновое хозяйство России. 2023. Т. 15, № 5. С. 30–38. DOI: 10.31367/2079-8725-2023-88-5-30-38.



IDENTIFICATION OF RICE BLAST RESISTANCE GENES PI-1, PI-2, PI-33, PI-40, PI-TA, PI-B

O. V. Shumskaya, junior researcher of the laboratory for cell breeding, oksana-shumskaya@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-7285-5580;

N. N. Vozhzhova, Candidate of Agricultural Sciences, senior researcher of the laboratory for cell breeding, nvzhzh@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, agronomist of the laboratory for cell breeding, Lina.Dybina@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 a valuable crop used for food throughout the world. To develop modern, productive and disease resistant rice varieties, it is necessary to accelerate the breeding process using molecular biology methods. The purpose of the current study was to identify alleles of six blast resistance genes (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-40, Pi-ta and Pi-b) in the selected rice samples using MAS (marker-associated selection method). The objects of the study were 446 breeding rice samples sent to the laboratory of cell breeding for analysis by breeders from the laboratory for rice breeding and seed production of the FSBSI "ARC "Donskoy". Identification of genes in them was carried out differentially and was determined by the pedigree of the samples. In order to determine the alleles of the blast resistance genes Pi-1, Pi-2 and Pi-33, all 446 samples were studied, for the Pi-40 gene there were studied 20 samples, for the Pi-ta gene there were studied 316 samples. For DNA extraction, there was used a Russian-made kit 'DNA-Extran-3'. PCR was performed using specific primers of the target genes. Identification of reaction products was performed on agarose

gels after photographing in ultraviolet light. As a result of the study, there were identified the rice samples which carried from 1 to 5 blast resistance genes in various combinations. There have been identified 14 samples that possess a set of 5 resistance genes, such as 2723, 2724, 2727, 2728, 2729, 2730, 2733, 2735, 2736, 5007, 5671, 5673, 5450/2 and 2450/2. The information obtained from the results of the study could then be used by breeders to use valuable genotypes as donors in crosses, as well as to select promising breeding material resistant to blast disease.

Keywords: rice, gene identification, rice blast, resistance, molecular markers.

Введение. По мере роста населения мира нехватка продовольствия и скрытый голод становятся все более актуальными проблемами. Эффективность повышения продовольственной безопасности возможна при увеличении урожайности сельскохозяйственных культур или путем расширения площади их посевов.

Рис посевной (*Oryza sativa*) как сельскохозяйственная культура имеет очень большое значение, является важным продуктом питания для значительной части населения в мире и входит в ежедневный рацион жителей Африки, Азии и стран Ближнего Востока. В России рис также весьма популярный продукт, который массово производится на юге страны. Для поддержания и увеличения его урожайности нужно создавать новые, в том числе устойчивые к болезням сорта.

Болезни риса – один из лимитирующих факторов получения качественного зерна и высоких урожаев. Самая вредоносная болезнь риса – пирикулярриоз, который вызывается несовершенным грибом *Pyricularia oryzae*. Ежегодно он наносит значительный ущерб в рисосеющих районах во всем мире (Asibi et al., 2019; Yulensri et al., 2020; El-Abbasi et al., 2020). Потеря урожая может составить до 70–80 % (Sahu et al., 2022). Основными признаками являются пятна на листьях, стеблевом узле, семенах, метелке, листовом влагалище различной формы и окраски. Заболевание приводит к отмиранию листьев, ломке стеблей, преждевременному высыханию метелок, щуплости зерна, гибели всходов. Наибольший процент вреда наносится пирикулярриозом в фазах колошения и цветения, что сказывается на качестве семян. Возбудитель болезни сохраняется на стерне и соломе риса, а также в семенах и способен к перезимовыванию (Asibi et al., 2019).

Для создания современных высокоурожайных, с высоким качеством зерна сортов риса необходимо использование методов молекулярной биологии. ПЦР-анализ в селекционном процессе позволяет ускорить процесс отбора форм с желаемыми генами, проводить подбор подходящих родительских форм, детектировать перенос целевых генов в селекционный материал, изучать взаимосвязи между наличием генов и проявлением желаемого признака. Хороший результат в борьбе с пирикулярриозом дает введение генов устойчивости к заболеванию в высокоурожайные сорта риса отечественной селекции. Выявление желаемых генотипов с использованием молекулярных маркеров ускоряет и удешевляет селекционный процесс.

В последние годы во многих селекционных учреждениях проводят исследования по выяв-

лению образцов, которые бы обладали устойчивостью к пирикулярриозу риса (Илюшко и др., 2019; Костылев и др., 2018; Дубина и др., 2018; Коротенко и др., 2018). В странах СНГ также ведется интенсивная селекционная работа с включением молекулярных маркеров для создания новых высококачественных сортов, устойчивых к болезням, обладающих продуктивностью и качеством (Рсалиев и др., 2015; Khayitov et al., 2021).

Таким образом, применение ДНК-маркеров для поиска источников и доноров эффективных генов устойчивости является своевременной задачей при создании устойчивых к пирикулярриозу сортов риса.

В связи с этим целью наших исследований являлась идентификация аллелей генов устойчивости к пирикулярриозу Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-40, Pi-ta и Pi-b у селекционных образцов риса методами MAS (маркер-ассоциированной селекции).

Материалы и методы исследований. Объектом исследования служили 446 селекционных образцов риса, переданных в лабораторию клеточной селекции для анализа селекционерами из лаборатории селекции и семеноводства риса ФГБНУ «АНЦ «Донской».

Исследования проводили в 2022 г. в лаборатории клеточной селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской». Образцы риса изучали на наличие в их генотипе 6 генов устойчивости к пирикулярриозу: эффективных Pi-1 и Pi-ta, а также Pi-2, Pi-33, Pi-40, и Pi-b. Идентификация аллелей генов в них проводилась дифференцированно и была обусловлена родословной образцов. Так, для определения генов Pi-1, Pi-2, Pi-33 были изучены все 446 образцов, для гена Pi-40 – 20 образцов, для гена Pi-ta – 316 образцов.

Выделение геномной ДНК осуществляли методом СТАВ, суть которого заключается в способности нуклеиновых кислот образовывать растворимые комплексы с детергентом СТАВ (цетилтриэтилбромид аммония) в условиях высокой концентрации соли (Yadav et al., 2021).

При экстракции ДНК использовали набор «ДНК-Экстран-3» российского производства. Для идентификации генов положительным контролем служили образцы риса с наличием генов устойчивости к пирикулярриозу (Pi-1 и Pi-33 – C104-LAC, для Pi-2 – C101-A-51, для Pi-ta – IR36, для Pi-b – BL-1). Для молекулярных маркеров кодоминантного типа в качестве контроля рецессивного аллеля использовали родительские сорта Боярин (ФГБНУ «АНЦ «Донской») и Новатор (ФНЦ Риса). Отрицательный контроль опыта – деионизированная вода.

Для проведения реакции амплификации при скрининге генов устойчивости к пирику-

ляриозу риса применяли микросателлитные SSR-маркеры и разработанные для них составы реакционных смесей и условия реакции. Использовали объем реакции 25 мкл, включающий в себя 3 мкл геномной ДНК образцов риса, по 2,5 мкл 10 х PCR буфера, от 1 до 2,5 мкл MgCl₂ (25mM), от 0,25 до 0,4 мкл смеси dNTPs (25mM), от 2 до 3 мкл каждого специфического для анализируемого гена праймера в концентрации 1 μ mol, Taq-полимераза (5 U) от 0,25 до 0,3 мкл, а также деионизированную воду – от 8,45 до 12,95 мкл в зависимости от определяемого гена (Mullis et al., 1986; Fuentes et al., 2008; Jiang et al., 2015; Sharma et al., 2007; Мухина и др., 2008; Супрун и др., 2007; Супрун и др., 2013).

ПЦР проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler (BioRad, США).

Результаты амплификации визуализировали методом электрофореза в 2-процентном агарозном геле.

Для окрашивания геля применяли этидий бромид, фотодокументирование прибором Bio-Rad Molecular Imager GelDoc XR+. Для обработки полученных результатов использовали программы Bio-Rad GelDoc Lab Image 5.1 и Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. В результате проведения анализа селекционных образцов риса по гену устойчивости к пирикулярриозу Pi-1 были получены электрофореграммы, визуализирующие его аллельное состояние.

На рис. 1 представлен фрагмент одной из электрофореграмм продуктов амплификации с маркером Rm224.

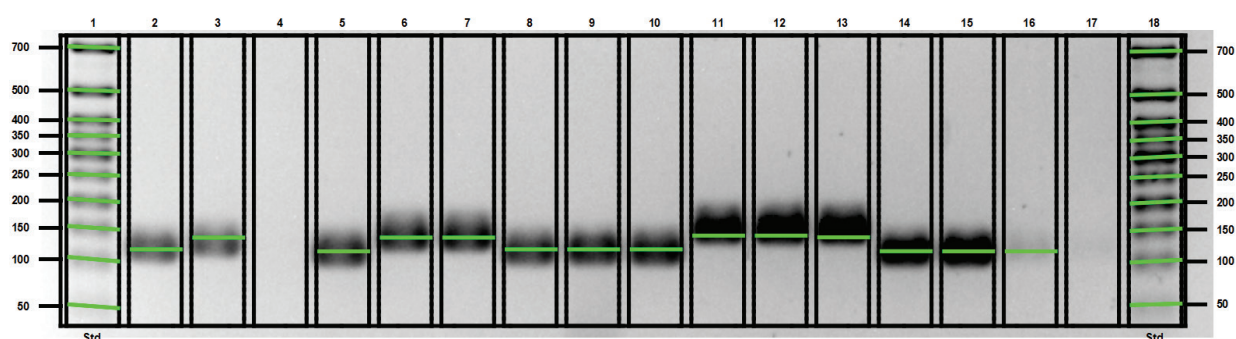


Рис. 1. Электрофореграмма анализа образцов риса по определению гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-1: 1, 18 – маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder Евроген (размер ампликонов снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 и 700 пар нуклеотидов), 2 – Боярин (контроль не функционального аллеля), 3 – C104-LAC (положительный контроль), 4 – H₂O (отрицательный контроль опыта), 5 – 2791, 6 – 2826, 7 – 2827, 8 – 2828, 9 – 2829, 10 – 2830, 11 – 2831, 12 – 2832, 13 – 2833, 14 – 3138, 15 – 3141, 16 – 3145, 17 – 3146

Fig. 1. Electropherogram of analysis of rice samples to identify the blast resistance gene Pi-1: 1, 18 – DNA length marker 50+ bp DNA Ladder Evrogen (amplicon size from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 700 pairs of nucleotides), 2 – Boyarin (control of non-functional allele), 3 – C104-LAC (positive control), 4 – H₂O (negative control), 5 – 2791, 6 – 2826, 7 – 2827, 8 – 2828, 9 – 2829, 10 – 2830, 11 – 2831, 12 – 2832, 13 – 2833, 14 – 3138, 15 – 3141, 16 – 3145, 17 – 3146

В образцах 6, 7, 11, 12 и 13 были идентифицированы фрагменты ДНК, аналогичные по размеру ампликону сорта C104-LAC (положительный контроль), – 137 п. н. (пар нуклеотидов). Это свидетельствует о том, что у них есть функциональный аллель гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-1.

Ампликон меньшего размера, чем у контрольного сорта (115 п. н.), выявлен у образцов 5, 8, 9, 10, 14, 15 и 16, что показывает наличие нефункционального (рецессивного) аллеля гена устойчивости к пирикулярриозу pi-1. У образца 17 амплификация бэнда не зафиксирована.

Всего было идентифицировано 283 селекционных образцов риса с функциональным аллелем гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-1 (2752, 2756, 2768, 2769, 2792, 2793 и др.). Установлено наличие гетерозиготного аллельного состояния у трех образцов риса (5050, 5133, 5633). Нефункциональный аллель гена pi-1 идентифицирован у 133 образцов риса. У 27 образцов не выявлено ни одного аллеля гена Pi-1.

В результате анализа образцов риса на наличие гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-2 с использованием маркера Rm527 были получены электрофореграммы агарозных гелей. На рис. 2 представлен фрагмент одной из электрофореграмм продуктов амплификации образцов риса на 2 %-м агарозном геле.

У образцов 8 и 12 выявлен ампликон размером 233 пар нуклеотидов, аналогичный ампликону сорта-донора гена устойчивости к пирикулярриозу C101-A-51. У остальных образцов, представленных на рис. 2, выявлены ампликоны, аналогичные по размеру рецессивному аллелю сорта Боярин (220 п. н.).

Всего в результате проведенных анализов 446 селекционных образцов риса был идентифицирован 181 образец с функциональным аллелем гена Pi-2 (2798, 2814, 3295, 3298, 3301, 5446/1 и др.). Гетерозиготное аллельное состояние гена Pi-2 было выявлено у одного образца (5654). Нефункциональный гомозиготный аллель pi-2 идентифицирован у 250 образцов. У 14 образцов не идентифицировано ни одного аллеля гена Pi-2.

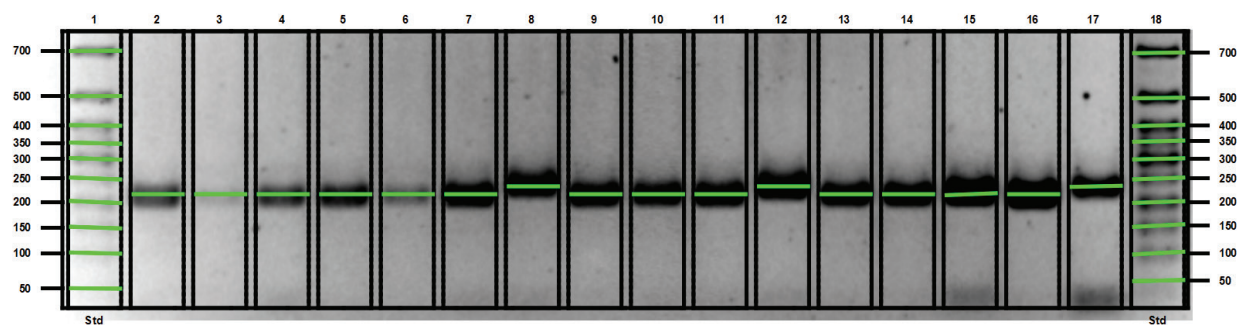


Рис. 2. Электрофореграмма анализа образцов риса по определению гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-2: 1, 18 – маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder Евrogen (размер ампликонов снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 и 700 п.н.), 2 – 5628/3, 3 – 5631/1, 4 – 5631/2, 5 – 5631/3, 6 – 5667, 7 – 5683, 8 – 5690, 9 – 5691, 10 – 5735, 11 – 5736, 12 – 5744, 13 – 5745, 14 – 5746, 15 – 5747, 16 – Боярин (контроль нефункционального аллеля), 17 – C101-A-51 (положительный контроль)

Fig. 2. Electropherogram of analysis of rice samples to identify the blast resistance gene Pi-2: 1, 18 – DNA length marker 50+ bp DNA Ladder Evrogen (amplicon size from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 700 p. of n.), 2 – 5628/3, 3 – 5631/1, 4 – 5631/2, 5 – 5631/3, 6 – 5667, 7 – 5683, 8 – 5690, 9 – 5691, 10 – 5735, 11 – 5736, 12 – 5744, 13 – 5745, 14 – 5746, 15 – 5747, 16 – Boyarin (control of non-functional allele), 17 – C101-A-51 (positive control)

В результате скрининга образцов риса с использованием маркера Rm310 на наличие аллелей гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-33

нами были получены электрофореграммы амплификатов. На рис. 3 приведен фрагмент одной из таких электрофореграмм.



Рис. 3. Электрофореграмма анализа образцов риса по определению гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-33: 1, 18 – маркер молекулярного веса 50+ bp DNA Ladder Евrogen (размер ампликонов снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 и 700 п.н.), 2 – C101-A-51 (донор гена Pi-2, положительный контроль), 3 – Боярин (контроль нефункционального аллеля), 4 – H₂O (отрицательный контроль опыта), 5 – 5683, 6 – 5690, 7 – 5691, 8 – 5735, 9 – 5736, 10 – 5744, 11 – 5745, 12 – 5746, 13 – 5747, 14 – 5751, 15 – 5753/1, 16 – 5753/2, 17 – 5753/3

Fig. 3. Electropherogram of analysis of rice samples to identify the blast resistance gene Pi-33:

1, 18 – Molecular weight marker 50+ bp DNA Ladder Evrogen (amplicon size from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 700 p. of n.), 2 – C101-A-51 (donor of the gene Pi-2, positive control), 3 – Boyarin (control of non-functional allele), 4 – H₂O (negative control), 5 – 5683, 6 – 5690, 7 – 5691, 8 – 5735, 9 – 5736, 10 – 5744, 11 – 5745, 12 – 5746, 13 – 5747, 14 – 5751, 15 – 5753/1, 16 – 5753/2, 17 – 5753/3

Ампликон образца 13 находится в ожидаемом районе и составляет 95 пар нуклеотидов, следовательно, у него имеется доминантный ген устойчивости к пирикулярриозу Pi-33.

У образцов 5, 7, 10, 12, 15, 16, 17 идентифицирован аллель, аналогичный аллелю сорта Боярин (120 п. н.), следовательно, у них имеется нефункциональный аллель гена pi-33.

У остальных образцов, представленных на рис. 3, ампликоны аллелей гена Pi-33 не были идентифицированы, амплификация не происходила.

В результате проведенного анализа было идентифицировано 88 селекционных образцов с функциональным алллем гена Pi-33 (2798, 5558/4, 5747, 5753/4, 2621 и др.). Гетерозигота

выявлена у 5 образцов риса (2628, 5133, 5425/3, 5435/3 и 5570/4). Нефункциональный аллель гена *pi-33* идентифицирован у 167 образцов. У 186 образцов риса не выявлено ни одного аллеля гена *Pi-33*.

В результате изучения 316 селекционных образцов риса на наличие аллелей гена *Pi-ta* были получены рабочие электрофореграммы гелей, пример одной из которых показан на рисунке 4.

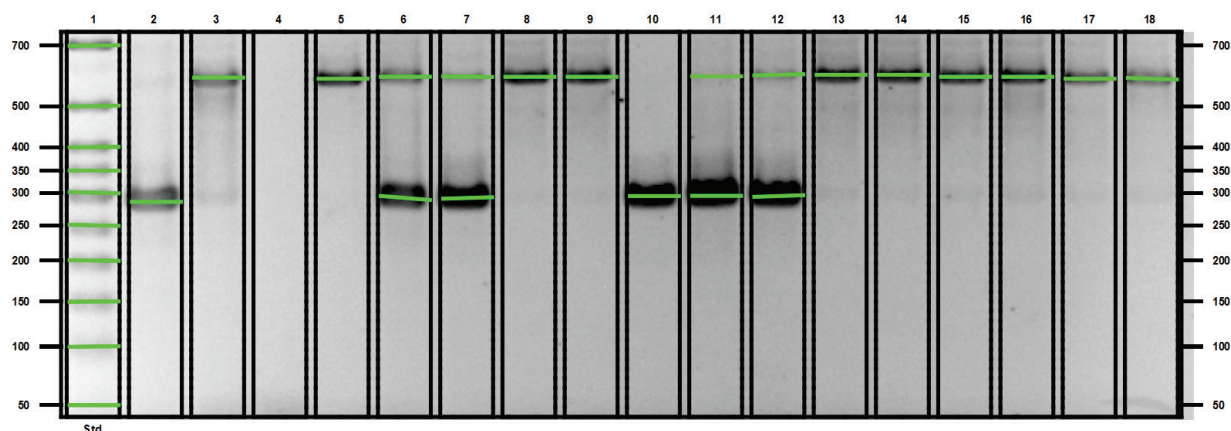


Рис. 4. Электрофореграмма анализа образцов риса по определению гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*: 1 – маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder Евроген (размер ампликонов снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 и 700 пар нуклеотидов), 2 – IR36 (контроль функционального аллеля), 3 – Боярин (контроль нефункционального аллеля), 4 – H₂O (внутренний контроль), 5 – 2650, 6 – 2657, 7 – 2658, 8 – 2662, 9 – 2669, 10 – 2670, 11 – 2682, 12 – 2684, 13 – 2686, 14 – 2691, 15 – 2692, 16 – 2697, 17 – 2698, 18 – 2702

Fig. 4. Electropherogram of analysis of rice samples to identify the blast resistance gene *Pi-ta*:

1 – DNA length marker 50+ bp DNA Ladder Evrogen (amplicon size from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 700 p. of n.), 2 – IR36 (functional allele control), 3 – Boyarin (control of non-functional allele), 4 – H₂O (internal control), 5 – 2650, 6 – 2657, 7 – 2658, 8 – 2662, 9 – 2669, 10 – 2670, 11 – 2682, 12 – 2684, 13 – 2686, 14 – 2691, 15 – 2692, 16 – 2697, 17 – 2698, 18 – 2702

У образца под номером десять был выявлен бэнд 270 п. н., аналогичный ампликону положительного контроля (сорта IR36), следовательно, у него имеется доминантный аллель гена *Pi-ta*. У образцов 6, 7, 11 и 12 идентифицировано гетерозиготное аллельное состояние гена *Pi-ta*. У остальных образцов, показанных на рис. 4, видны ампликоны, которые ассоциированы с нефункциональным гомозиготным аллелем гена *pi-ta* (563 п. н.).

В результате проведенного анализа было идентифицировано 64 образца с функциональным аллелем гена *Pi-ta* (2595, 2596, 2658, 2670, 2682 и др.). Гетерозиготное аллельное состоя-

ние гена *Pi-ta* идентифицировано у 29 образцов (2601, 2607, 2608, 2610, 2611, 2657, 2658, 2682, 2684 и др.). Нефункциональный гомозиготный аллель *pi-ta* выявлен у 213 образцов. У 10 образцов не идентифицирован ни один аллель гена *Pi-ta*

В результате проведения анализа 323 образцов риса на наличие аллелей гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b* были получены рабочие электрофореграммы. На рис. 5 показана электрофореграмма амплификации ДНК селекционных образцов риса в присутствии маркера *Pi-b* F4R5R6.

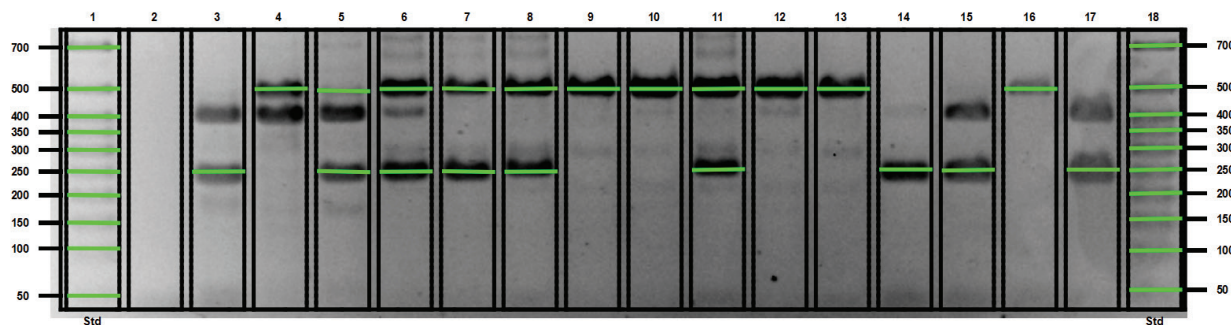


Рис. 5. Электрофореграмма анализа образцов риса по определению гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b*: 1, 18 – маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder Евроген (размер ампликонов снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 и 700 п.н.), 2 – H₂O (внутренний контроль), 3 – Боярин (контроль нефункционального аллеля), 4 – BL-1 (донор гена *Pi-b*, положительный контроль), 5 – 2657, 6 – 2658, 7 – 2662, 8 – 2669, 9 – 2670, 10 – 2682, 11 – 2684, 12 – 2686, 13 – 2691, 14 – 2692, 15 – 2715, 16 – 2721, 17 – 2722

Fig. 5. Electropherogram of analysis of rice samples to identify the blast resistance gene *Pi-b*:

1, 18 – DNA length marker 50+ bp DNA Ladder Evrogen (amplicon size from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 700 p.n.), 2 – H₂O (internal control), 3 – Boyarin (control of non-functional allele), 4 – BL-1 (donor of the gene *Pi-b*, positive control), 5 – 2657, 6 – 2658, 7 – 2662, 8 – 2669, 9 – 2670, 10 – 2682, 11 – 2684, 12 – 2686, 13 – 2691, 14 – 2692, 15 – 2715, 16 – 2721, 17 – 2722

Доминантный аллель гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-b размером 490 пар нуклеотидов выявлен у образцов 9, 10, 12, 13, 16. Нефункциональный аллель гена pi-b (249 п. н.) идентифицирован у образцов 14, 15, 17. У остальных образцов, представленных на рис. 5, выявлено гетерозиготное аллельное состояние гена Pi-b.

У ряда образцов выявлен ампликон размером 400 пар нуклеотидов, который отличается от описанных авторами молекулярного маркера размеров устойчивого и восприимчивого аллелей гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-b. Это может быть связано как с различными изменениями в геноме образцов, так и с проявлением неспецифической амплификации при ПЦР.

В результате проведенного анализа было идентифицировано 116 образцов риса с функциональным аллелем гена Pi-b (2595, 2596, 2658, 2670, 2682 и др.). Гетерозиготное аллельное состояние гена Pi-b было идентифицировано у 20 образцов риса (2657, 2658, 2662, 2669, 2684 и др.). Нефункциональный гомозиготный аллель гена pi-b выявлен у 181 образца. У 6 образцов риса амплификация не происходила, аллели гена Pi-b не были выявлены.

На наличие гена Pi-40 анализировалось 34 селекционных образца риса. В результате проведенного скрининга было сфотографировано несколько электрофореграмм. На рисунке 6 показана одна из них. В проведенной реакции использовался маркер Rm3330.



Рис. 6. Электрофореграмма анализа образцов риса по определению гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-40: 1 – маркер молекулярного веса 50+ bp Евроген (50–700 п.н.), 2 – H₂O (внутренний контроль), 3 – K8223 (контроль функционального аллеля), 4 – Боярин (контроль нефункционального аллеля), 5 – 2834, 6 – 2835, 7 – 2836, 8 – 2837, 9 – 2450/1, 10 – 5450/2, 11 – 2450/2, 12 – 5450/3, 13 – 2772, 14 – 2774, 15 – 2775, 16 – 2776, 17 – 2777, 18 – 2778

Fig. 6. Electropherogram of analysis of rice samples to identify the blast resistance gene Pi-40:

1 – Molecular weight marker 50+ bp DNA Ladder Evrogen (amplicon size from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 700 p. of n.), 2 – H₂O (internal control), 3 – K8223 (control of functional allele), 4 – Boyarin (control of non-functional allele), 5 – 2834, 6 – 2835, 7 – 2836, 8 – 2837, 9 – 2450/1, 10 – 5450/2, 11 – 2450/2, 12 – 5450/3, 13 – 2772, 14 – 2774, 15 – 2775, 16 – 2776, 17 – 2777, 18 – 2778

У образцов 5–12, показанных на рисунке 6, выявлен бэнд размером 145 пар нуклеотидов, а значит, и доминантный аллель гена устойчивости к пирикулярриозу Pi-40. У остальных образцов, с 13-го по 18-й, идентифицирован нефункциональный аллель гена pi-40 (130 п. н.).

Всего в результате скрининга селекционных образцов риса нами был выявлен доминантный аллель гена устойчивости к пирикулярриозу у 19 образцов риса (2834, 2835, 2836, 2837, 2450/1 и др.). Нефункциональный аллель был идентифицирован у 14 образцов. Один об-

разец не обладал ни одним из аллелей гена Pi-40.

Идентификация сочетаний генов устойчивости к пирикулярриозу у риса. В результате анализа полученной базы данных (общее число записей составило 678 единиц) были выявлены образцы, несущие сочетания нескольких генов устойчивости к пирикулярриозу.

У 99 образцов риса не было выявлено ни одного из изучаемых в данном исследовании генов, что составило 20,67 % от суммарного числа (рис. 7).

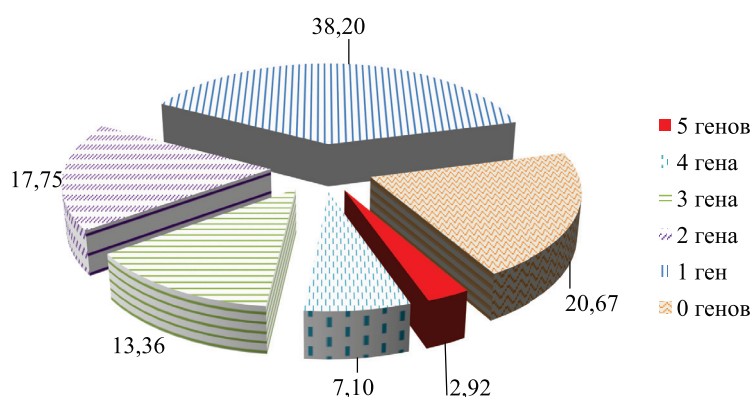


Рис. 7. Число сочетаемых генов устойчивости к пирикулярриозу в селекционных образцах риса, %
Fig. 7. Number of combined blast resistance genes in rice breeding samples, %

Один ген устойчивости к пирикулярриозу выявлялся у 38,20 % образцов (183 шт.). Два гена устойчивости в той или иной комбинации – у 17,75 % образцов (85 шт.).

Три гена устойчивости к пирикулярриозу было определено у 13,36 % образцов риса (64 шт.).

Четырьмя генами устойчивости к пирикулярриозу в различных сочетаниях обладали 7,10 % образцов (34 шт.).

Наибольшее количество, 5 генов устойчивости, в нескольких вариациях идентифицировалось у 2,92 % образцов риса (14 шт.).

В таблице показаны образцы риса, которые обладают сочетанием 4 и 5 генов устойчивости к пирикулярриозу.

Селекционные образцы риса, обладающие сочетанием 4 и 5 генов устойчивости к пирикулярриозу
Breeding rice samples with a combination of 4 and 5 blast resistance genes

Наименование генов устойчивости	Число образцов	Номер селекционных образцов риса
Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta	5 шт.	5005, 5017, 5024, 5656, 5663
Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b	22 шт.	2726, 2731, 2737, 2738, 2787, 2831, 5006, 5068, 5102, 5110, 5113, 5116, 5123, 5124, 5125, 5126, 5131, 5421/3, 5643, 5664, 5668, 5350/1
Pi-1, Pi-2, Pi-ta, Pi-b	3 шт.	2682, 3282, 5669
Pi-1, Pi-33, Pi-ta, Pi-b	2 шт.	5108, 5641
Pi-1, Pi-33, Pi-b, Pi-40	1 шт.	5450/3
Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b	1 шт.	3275
Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b	12 шт.	2723, 2724, 2727, 2728, 2729, 2730, 2733, 2735, 2736, 5007, 5671, 5673
Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b, Pi-40	2 шт.	5450/2, 2450/2

Выводы. В результате проведенных исследований среди образцов лаборатории селекции и семеноводства риса нами были выделены образцы, несущие в себе гены с функциональными аллелями генов устойчивости к пирикулярриозу. Ген Pi-1 идентифицирован у 283 образцов (2752, 2756, 2768, 2769, 2792, 2793 и др.). Ген устойчивости риса к пирикулярриозу Pi-2 выявлен у 181 образца (2798, 2814, 3295, 3298, 3301, 5446/1 и др.). Ген Pi-33 установлен у 88 образцов (2798, 5558/4, 5747, 5753/4, 2621 и др.). Ген Pi-ta выявлен у 64 образцов (2595, 2596, 2658, 2670, 2682 и др.). Ген Pi-b идентифицирован у 116 образцов (2595, 2596, 2658, 2670, 2682

и др.). Ген Pi-40 установлен в 19 образцах (2834, 2835, 2836, 2837, 2450/1 и др.).

Идентифицировано сочетание 5 генов устойчивости к пирикулярриозу у 14 селекционных образцов риса – 2723, 2724, 2727, 2728, 2729, 2730, 2733, 2735, 2736, 5007, 5671, 5673, 5450/2 и 2450/2.

Информация, полученная по результатам проведенных нами исследований, далее может быть применена селекционерами для использования ценных генотипов в качестве доноров при скрещиваниях, а также для отбора перспективного селекционного материала, устойчивого к пирикулярриозу.

Библиографические ссылки

- Дубина Е. В., Шиловский В. Н., Рубан М. Г., Оглы А. М., Пищенко Д. А., Балясный И. В., Макуха Ю. А., Максименко Е. П., Никитина И. Б. ДНК-технологии в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу // Рисоводство. 2018. № 3 (40). С. 6–12.
- Илюшко М. В., Ромашова М. Р., Фисенко П. Ф., Суницкая Т. С., Гученко С. Г., Лелявская В. Л. Идентификация гена устойчивости риса к пирикулярриозу Pi-ta2 в коллекционных образцах и дальневосточных сортах риса методом молекулярного маркирования // Вестник защиты растений. 2019. № 1(99). С. 36–39. DOI: 10.31993/2308-6459-2019-1(99)-36-39
- Коротенко Т. Л., Брагина О. А., Супрун И. И., Мухина Ж. М., Епифанович Ю. В., Петрухненко А. А., Хорина Т. А. Резистентность к возбудителю пирикулярриоза и морфобиологические осо-

бенности генотипов коллекции *Oryza sativa* L. из разных экологогеографических групп в условиях Кубанской зоны рисосеяния // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. № 22(1). С. 69–78. DOI: 10.18699/VJ18.333

4. Костылев П.И., Краснова Е.И., Тесля Ю.П., Аксенов А.В., Костылева Л.М., Дубина Е.В., Мухина Ж.М. Новый, устойчивый к пирикулярриозу сорт риса Пируэт // Рисоводство. 2018. № 1 (38). С. 28–34.

5. Мухина Ж.М., Мяких Ю.А., Богомаз Д., Матвеева Т.В., Токмаков С.В. Создание кодоминантного молекулярного ПЦР-маркера для идентификации гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу риса Pi-ta // Рисоводство. 2008. № 7. С. 3–4.

6. Рсалиев А.С., Пахратдинова Ж.У., Амирханова Н.Т., Ыскакова Г.Ш. Идентификация источников устойчивости риса к пирикулярриозу // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. 2015. Т. 5, № 311. С. 84–91.

7. 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.

8. Супрун И.И., Ковалев В.С., Шиловский В.Н. Разработка мультиплексной ДНК-маркерной системы идентификации генов устойчивости риса к пирикулярриозу Pi-40 и Pi-b [Электронный ресурс] // Научный журнал КубГАУ. 2013. № 94(10). 2013. URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/19.pdf> (дата обращения: 31.03.2023).

9. Asibi A.E., Chai Q., Coulter J.A. Rice Blast: a disease with implications for global food security // Agronomy. 2019. Vol. 9, Iss. 8. P. 451. DOI: 10.3390/agronomy9080451

10. El-Abbasi I.H., Khalil A.A., Awad H.M., Shoala T. Nano-diagnostic technique for detection of rice pathogenic fungus *Pyricularia oryzae* // Indian Phytopathology. 2020. Vol. 73, P. 673–682. DOI: 10.1007/s42360-020-00254-7

11. Fuentes J.L., Correa-Victoria F.J., Escobar F., Prado G., Aricapa G., Dukue M.C., Tohme J. Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene Pi-1(t) in rice. // Euphytica. 2008. Vol. 160, P. 295–304. DOI: 10.1007/s10681-007-9497-0.

12. Jiang J., Mou T., Yu H., Zhou F. Molecular breeding of thermo-sensitive genic male sterile (TGMS) lines of rice for blast resistance using Pi2 gene. // Rice. 2015. Vol. 8(1), Article number: 11. DOI: 10.1186/s12284-015-0048-3

13. Khayitov M.Y., Qalandarov B.I., Ergashev M.A., Axtamov M.A. Study of rice genotypes and their use in the process of selection // E3S Web Conferences. 2021. Vol. 244, Article number: 02001. DOI: 10.1051/e3sconf/202124402001

14. Mullis K., Faloona F., Scharf S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1986. Vol. 51, Iss. 2. P. 263–273. DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032

15. Yadav A., Sharma A., Kumar A., Yadav R., Kumar R. SSR based molecular profiling of elite cultivars of basmati rice (*Oryza sativa* L.) // Research Journal of Biotechnology. 2021. Vol. 16, № 12. P. 55–63. DOI: 10.25303/1612rjbt5563

16. Yulensri Y., Noveri A. Efektifitas formulasi cair konsorsium bakteri sebagai pengendali hama dan penyakit pada padi sawah organik // Jurnal Ilmiah Inovasi. 2020. Vol. 20, Iss. 3. P. 35–40. DOI: 10.25047/jii.V 20i3.2366

17. Sahu P.K., Sao R., Choudhary D.K., Thada A., Kumar V., Mondal S., Das B.K., Jankuloski L., Sharma D. Advancement in the Breeding, Biotechnological and Genomic Tools towards Development of Durable Genetic Resistance against the Rice Blast Disease // Plants. 2022. Vol. 11, Iss.18. Article number: 2386. DOI: 10.3390/plants11182386

18. Sharma R.C., Shrestha S.M., Pandey M.P. Inheritance of Blast Resistance and Associated Microsatellite Markers in Rice Cultivar 'Laxmi' // Journal of Phytopathology. 2007. Vol. 155, Iss. 11–12. P. 749–753. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01298.x

References

1. Dubina E.V., Shilovskii V.N., Ruban M.G., Ogly A.M., Pishchenko D.A., Balyasnyi I.V., Makukha Yu.A., Maksimenko E.P., Nikitina I.B. DNK-tehnologii v selektsii risa na ustoichivost' k pirikulyariozu [DNA technology in rice breeding for blast resistance] // Risovodstvo. 2018. № 3 (40). С. 6–12.

2. Ilyushko M.V., Romashova M.R., Fisenko P.F., Sunitskaya T.S., Guchenko S.G., Lelyavskaya V.L. Identifikatsiya gena ustoichivosti risa k pirikulyariozu Pi-ta2 v kollektсионnykh obraztsakh i dal'nevostochnykh sortakh risa metodom molekulyarnogo markirovaniya [Identification of the rice blast resistance gene Pi-ta2 in collection samples and Far Eastern rice varieties using the molecular labeling method] // Vestnik zashchity rastenii. 2019. № 1(99). С. 36–39. DOI: 10.31993/2308-6459-2019-1(99)-36-39

3. Korotenko T.L., Bragina O.A., Suprun I.I., Mukhina Zh. M., Epifanovich Yu. V., Petrukhnenko A.A., Khorina T.A. Rezistentnost' k vzbuditelyu pirikulyarioza i morfobiologicheskie osobennosti genotipov kolleksii *Oryza sativa* L. iz raznykh ekologogeograficheskikh grupp v usloviyakh Kubanskoi zony risoseyaniya [Resistance to the blast pathogen and morphobiological characteristics of genotypes of the *Oryza sativa* L. collection from different ecological and geographical groups in the conditions of the Kuban rice growing zone] // Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii. 2018. № 22(1). С. 69–78. DOI: 10.18699/VJ18.333

4. Kostylev P.I., Krasnova E.I., Teslya Yu. P., Aksenov A.V., Kostyleva L.M., Dubina E.V., Mukhina Zh. M. Novyi, ustoichivyi k pirikulyariozu sort risa Piruet [New blast resistant rice variety 'Piruet'] // Risovodstvo. 2018. № 1 (38). С. 28–34.

5. Mukhina Zh. M., Myagkikh Yu. A., Bogomaz D., Matveeva T. V., Tokmakov S.V. Sozdanie kodominantnogo molekulyarnogo PTsR-markera dlya identifikatsii gena rasoetspitsificheskoi ustoichivosti

k pirikulyariozu risa Pi-ta [Development of a codominant molecular PCR marker to identify the gene for race-specific resistance to rice blast Pi-ta] // Risovodstvo. 2008. № 7. S. 3–4.

6. Rsaliev A. S., Pakhratdinova Zh. U., Amirkhanova N. T., Yskakova G. Sh. Identifikatsiya istochnikov ustoichivosti risa k pirikulyariozu [Identification of rice blast resistance sources] // Izvestiya Natsional'noi akademii nauk Respubliki Kazakhstan. 2015. T. 5, № 311. S. 84–91.

7. Suprun I. I., Il'nitskaya E. T., Mukhina Zh. M. Sozdanie vnutrigennogo DNK-markera gena ustoichivosti k pirikulyariozu risa Pi-b i ego ispol'zovanie v prakticheskoi selektsii [Development of an intragenic DNA marker for the rice blast resistance gene Pi-b and its use in practical breeding] // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. 2007. № 5. S. 63–66.

8. Suprun I. I., Kovalev V. S., Shilovskii V. N. Razrabotka mul'tipleksnoi DNK-markernoi sistemy identifikatsii genov ustoichivosti risa k pirikulyariozu Pi-40 i Pi-b [Development of a multiplex DNA marker system for identifying rice blast resistance genes Pi-40 and Pi-b] [Elektronnyi resurs] // Nauchnyi zhurnal KubGAU. 2013. № 94(10). 2013. URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/19.pdf> (data obrashcheniya: 31.03.2023).

9. Asibi A. E., Chai Q., Coulter J. A. Rice Blast: a disease with implications for global food security // Agronomy. 2019. Vol. 9, Iss. 8. R. 451. DOI: 10.3390/agronomy9080451.

10. El-Abbasi I. H., Khalil A. A., Awad H. M., Shoala T. Nano-diagnostic technique for detection of rice pathogenic fungus *Pyricularia oryzae* // Indian Phytopathology. 2020. Vol. 73, P. 673–682. DOI: 10.1007/s42360-020-00254-7

11. Fuentes J. L., Correa-Victoria F. J., Escobar F., Prado G., Aricapa G., Dukue M. C., Tohme J. Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene Pi-1(t) in rice. // Euphytica. 2008. Vol. 160, P. 295–304. DOI: 10.1007/s10681-007-9497-0

12. Jiang J., Mou T., Yu H., Zhou F. Molecular breeding of thermo-sensitive genic male sterile (TGMS) lines of rice for blast resistance using Pi2 gene. // Rice. 2015. Vol. 8(1), Article number: 11. DOI: 10.1186/s12284-015-0048-3

13. Khayitov M. Y., Qalandarov B. I., Ergashev M. A., Axtamov M. A. Study of rice genotypes and their use in the process of selection // E3S Web Conferences. 2021. Vol. 244, Article number: 02001. DOI: 10.1051/e3sconf/202124402001

14. Mullis K., Faloona F., Scharf S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1986. Vol. 51, Iss. 2. P. 263–273. DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032

15. Yadav A., Sharma A., Kumar A., Yadav R., Kumar R. SSR based molecular profiling of elite cultivars of basmati rice (*Oryza sativa* L.) // Research Journal of Biotechnology. 2021. Vol. 16, № 12. P. 55–63. DOI: 10.25303/1612rjbt5563

16. Yulensri Y., Noveri A. Efektifitas formulasi cair konsorsium bakteri sebagai pengendali hama dan penyakit pada padi sawah organik // Jurnal Ilmiah Inovasi. 2020. Vol. 20, Iss. 3. P. 35–40. DOI: 10.25047/jii.v20i3.2366

17. Sahu P. K., Sao R., Choudhary D. K., Thada A., Kumar V., Mondal S., Das B. K., Jankuloski L., Sharma D. Advancement in the Breeding, Biotechnological and Genomic Tools towards Development of Durable Genetic Resistance against the Rice Blast Disease // Plants. 2022. Vol. 11, Iss. 18. Article number: 2386. DOI: 10.3390/plants11182386

18. Sharma R. C., Shrestha S. M., Pandey M. P. Inheritance of Blast Resistance and Associated Microsatellite Markers in Rice Cultivar 'Laxmi' // Journal of Phytopathology. 2007. Vol. 155, Iss. 11–12. P. 749–753. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01298.x

Поступила: 17.05.23; доработана после рецензирования: 26.09.23; принята к публикации: 27.09.23.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Шумская О. В. – сбор лабораторных данных, подготовка рукописи; Вождова Н. Н. – концептуализация исследования, анализ данных и их интерпретация, подготовка рукописи; Жогалева О. С., Дубина А. Ю. – сбор лабораторных данных; Костылев П. И. – концептуализация исследования.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.