

П.И. Костылев, доктор сельскохозяйственных наук, профессор;
Е.В. Краснова, кандидат сельскохозяйственных наук;
А.А. Редькин, кандидат сельскохозяйственных наук;
*ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
зерновых культур им. И.Г. Калининко
(347740, г. Зерноград, Научный городок, 3; p-kostylev@mail.ru);*
Ж.М. Мухина, доктор биологических наук;
Е.В. Дубина, кандидат биологических наук,
*ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса,
(350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3; agroplazma@gmail.com)*

ВЫВЕДЕНИЕ СОРТОВ РИСА С ПИРАМИДИРОВАННЫМИ ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ

Рис может значительно снизить урожайность зерна при поражении опасным грибковым заболеванием – пирикулярриозом. Единичные гены устойчивости к этому патогену часто не эффективны. Поэтому актуальным является создание урожайных сортов риса, резистентных к пирикулярриозу, имеющих в одном генотипе несколько генов со своим вкладом по данному признаку. Использование молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами, обеспечивающими устойчивость растений к этому патогену, значительно облегчает селекционную работу в данном направлении. Целью нашей работы является создание линий риса с пятью генами устойчивости к пирикулярриозу с помощью метода молекулярного маркирования. В качестве доноров переносимых генов устойчивости использовали линии зарубежной селекции, реципиентов – отечественные сорта Боярин и Вираз. В работе использованы микросателлитные маркеры на гены устойчивости к пирикулярриозу. Визуализацию результатов проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофореза.

На первом этапе работы получены 6 гибридов от скрещивания сортов Боярин и Вираз с донорами генов Pi-1, Pi-2, Pi-33. На втором этапе работы в процессе пирамидирования удалось получить формы с этими тремя генами вместе. На третьем этапе проведена их гибридизация с донорами генов Pi-ta и Pi-b для объединения 5 генов. В результате многолетней работы по интрогрессии генов резистентности к пирикулярриозу с помощью маркерной селекции и ПЦР-анализа были получены линии риса, совмещающие в себе пять эффективных генов устойчивости к этому патогену Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b.

Ключевые слова: рис, гибрид, пирикулярриоз, устойчивость, пирамидирование генов, маркерная селекция, ПЦР-анализ.

P.I. Kostylev, Doctor of Agricultural Sciences, professor;

E.V. Krasnova, Candidate of Agricultural Sciences;
A.A. Redkin, Candidate of Agricultural Sciences,
FSBSI All-Russian Research Institute of Grain Crops after I.G. Kalinenko
(347740, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3, p-kostylev@mail.ru)
Zh.M. Mukhina, Doctor of Biology;
E.V. Dubina, Candidate of Biology,
FSBSI All-Russian Research Institute of Rice
(350921, Krasnodar, v.Belozerny, 3, agroplazma@gmail.com)

BREEDING OF RICE VARIETIES WITH PYRAMIDING GENES TOLERANT TO DISEASES

Rice can significantly decrease the harvest of grain when it's damaged with a dangerous fungus 'Pyricularia grisea' (rice blast). Single genes resistant to the pathogen are usually inefficient. That's why it's necessary to breed productive rice varieties, resistant to rice blast, having several genes possessing resistance in one genotype. Using molecular markers closely connected with genes which make the plants resistant to the pathogen, significantly facilitates the breeding. The purpose of the work is to breed a line of rice with five genes resistant to rice blast using a molecular marking method. We used the lines of foreign breeding as donors of resistant genes and domestic varieties 'Boyarin' and 'Virazh' as recipients. In the work there were used micro satellite markers on genes resistant to rice blast. The results were visualized by polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis.

At the first stage we received 6 hybrids from a cross breeding of recipients 'Boyarin' and 'Virazh' and donors Pi-1, Pi-2, Pi-33. At the second stage during the process of pyramiding we managed to receive the varieties with these three genes together. At the third stage we carried out the hybridization with donors Pi-ta and Pi-b to combine 5 genes.

As a result of long-term work in introgression of the genes resistant to rice blast with the help of marking selection and PCR-analysis we obtained rice lines, combining five genes Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b resistant to the pathogen.

Keywords: *rice, hybrid, rice blast (Pyricularia grisea), resistance, pyramiding of genes, marking breeding (selection), PCR-analysis.*

Введение. Болезни риса могут нанести значительный ущерб его производству. Наиболее опасной из них является пирикуляриоз, потери урожая от которого в годы эпифитотий достигают 100%. Поэтому необходимо выращивание устойчивых к пирикуляриозу сортов, имеющих в одном генотипе несколько генов со своим вкладом по данному признаку. Линии, совмещающие в себе 3-5 генов Pi, показывают значительное увеличение степени резистентности к пирикуляриозу и полезны для создания сортов. В разных странах проведены селекционные программы, в которых объединение генов Pi-1,

Pi-2, Pi-33 в одном генотипе использовали как стратегию селекции. Например, в Колумбии комбинация этих трех главных генов была высокоэффективной при создании сортов риса с длительной устойчивостью к пирикулярриозу [1].

Резистентность к патогену – это классическая система ген-на-ген, где главный ген устойчивости эффективен против образцов *M. grisea*, содержащих соответствующий ген авирулентности [2]. Двадцать генов устойчивости были идентифицированы обширными генетическими исследованиями [3-5].

Два крупных гена устойчивости, Pi-b и Pi-ta, интрогрессированные от сортов подвита *indica*, были изучены на молекулярном уровне [6-8]. Эти гены кодируют белки, которые обеспечивают устойчивость к пирикуляррии [9].

Процесс создания новых форм растений базируется на генетическом разнообразии и методах его использования селекционерами. Успехи в молекулярной биологии риса (*Oryza sativa* L.) – благоприятная среда для активного использования маркерных технологий для этой культуры. Секвенирование генома риса и клонирование генов позволяют создавать ДНК-маркеры, эффективные в работе практической селекции. Применение ДНК-технологий позволяет существенно расширить возможности традиционной селекции растений. Использование молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами, обеспечивающими устойчивость растений к этому патогену, значительно облегчает селекционную работу в данном направлении. Проявление молекулярных маркеров нейтрально по отношению к фенотипу, не является тканеспецифичным, и их можно обнаружить на любой стадии развития растений. Методы ДНК-генотипирования и селекции при помощи молекулярных маркеров (marker assisted selection – MAS) позволяют ускорить перенос хозяйственно ценных генов в процессе селекции и обеспечить создание новых сортов с целым комплексом заданных свойств [10, 11].

Поэтому актуальным является создание с помощью молекулярного маркирования урожайных сортов риса, резистентных к пирикулярриозу.

Целью нашей работы является создание линий риса с 5-ю генами устойчивости к пирикулярриозу: Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b – с помощью метода молекулярного маркирования.

Материал и методы. В качестве доноров переносимых генов устойчивости (материнская форма) использовали линии зарубежной селекции C104-Lac (донор гена Pi-1), C101-A-51 (донор гена Pi-2), C101-Lac (Pi-1, Pi-33), IR-58 (донор гена Pi-ta), Мороберекан (донор гена Pi-b), реципиентов – отечественные сорта Боярин и Вираз. В

работе использованы микросателлитные маркеры на гены устойчивости к пирикулярриозу (табл. 1).

1. Локализация генов устойчивости к пирикулярриозу

Ген	Хромосома	Сцепленный ДНК-маркер	Исследователь
Pi-1	11	Rm 224, Rm 144	Yu Z.H. et al 1996
Pi-2	6	Rm 527, SSR 140	Yu Z.H. et al 1991
Pi-33	8	Rm 72, Rm 310	Chen D.H. et al 1999
Pi-b	2	Rm 208	Miyamoto M. et al 1996
Pi-ta	12	XNpb 088	Rybka K. et al 1997

Визуализацию результатов проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофореза. Для анализа ДНК использовали отрезки листьев.

Результаты. В результате исследований на первом этапе работы в 2005 году были получены 6 гибридов от скрещивания сортов Боярин и Вираз с тремя донорами устойчивости к пирикулярриозу, несущими гены Pi-1, Pi-2, Pi-33:.

- | | | |
|-----------------------|---|--------|
| 1. C104-Lac (Pi-1) | x | Боярин |
| 2. C104-Lac (Pi-1) | x | Вираз |
| 3. C101-A-51 (Pi-2) | x | Боярин |
| 4. C101-A-51 (Pi-2) | x | Вираз |
| 5. C101-Lac (Pi-1+33) | x | Боярин |
| 6. C101-Lac (Pi-1+33) | x | Вираз |

Поскольку донорные линии зацветали на один месяц позже сорта Боярин, гибриды первого поколения характеризовались позднеспелостью, а также большой степенью стерильности (90-95%), что свидетельствует о значительных генетических различиях между родительскими формами, относящимися к разным подвидам риса: индика и японика.

Во втором поколении в каждой комбинации было выращено по 300-700 растений. Из огромного спектра расщепления по многим признакам удалось отобрать по 22-30 растений, совмещающих в себе скороспелость, низкорослость, неосыпаемость и фертильность колосков. После ДНК-анализа среди 62 лучших линий во ВНИИ риса выделены гомозиготные формы по доминантным аллелям устойчивости.

В ходе работы было установлено отсутствие ожидаемого моногенного расщепления в соотношении 1:2:1. Формы, имеющие доминантный ген в гомозиготном состоянии, были выявлены только у 7 растений из 62, т.е. меньше 25%. Это связано со

сцеплением генов Pi с генами, детерминирующими нежелательные признаки, такие как позднеспелость, высокорослость, осыпаемость и остистость колосков. В третьем поколении гибридов удалось отобрать значительное количество гомозиготных образцов с доминантными генами устойчивости, в том числе и совмещающие два гена $Pi\ 1$ и $Pi\ 33$.

На втором этапе работы (2008) после скрещивания между собой гибридов ($Pi\text{-}1+33$ х Боярин) и ($Pi\text{-}2$ х Боярин) удалось получить формы с тремя пирамидированными генами одновременно ($Pi\text{-}1$, $Pi\text{-}2$, $Pi\text{-}33$) в гомозиготном состоянии. Это линии Ил.13, Ил.14 и Ил.28. Однако они не были пригодны для использования в качестве сортов, т.к. были позднеспелыми и недостаточно продуктивными. Поэтому их использовали в следующих циклах скрещиваний.

На третьем этапе работы (2010), когда появились доноры генов $Pi\text{-}ta$ (IR58 х Кубань 3) и $Pi\text{-}b$ (Аметист х Мороберекан), проведена гибридизация с ними для объединения 5 генов. Скрещивания были двух типов: [$(Pi\text{-}1+2+33)$ х $Pi\text{-}ta$] х $Pi\text{-}b$ и $Pi\text{-}1+2+33$ х ($Pi\text{-}ta$ х $Pi\text{-}b$). Гибриды, показавшие гетерозиготность по всем пяти аллелям, были высеяны на F_2 в 2012 году в ФГУП «Пролетарское», где с 93-х лучших гибридных растений отобрали листья для анализа ДНК. Во ВНИИСБ и ВНИИ риса (г. Краснодар) проанализировали растения с использованием одного маркера по каждому из 5 генов [12, 13].

У всех гибридов расщепление по маркерам не укладывалось в рамки менделевского соотношения 1:2:1. Это связано с влиянием отбора, так как для анализа отбирали лучшие в селекционном отношении растения с безостыми фертильными колосками и хорошо вызревшим зерном.

По результатам анализа удалось выделить два образца риса, которые были гомозиготными по всем пяти доминантным аллелям. Эти гибриды были выращены в селекционном питомнике 2013 года на делянках площадью 1 м^2 под номерами 1225/13 и 1396/13. Повторный анализ листьев этих образцов в 2014 году подтвердил результаты прошлого года, т.е. гомозиготность по доминантным аллелям всех пяти локусов $Pi\text{-}1+2+33+ta+b$.

На рисунке 1 показаны электрофореграммы двух линий 1225/13 и 1396/13 с номерами проб №2 и №19, которые показывают наличие пяти генов Pi .

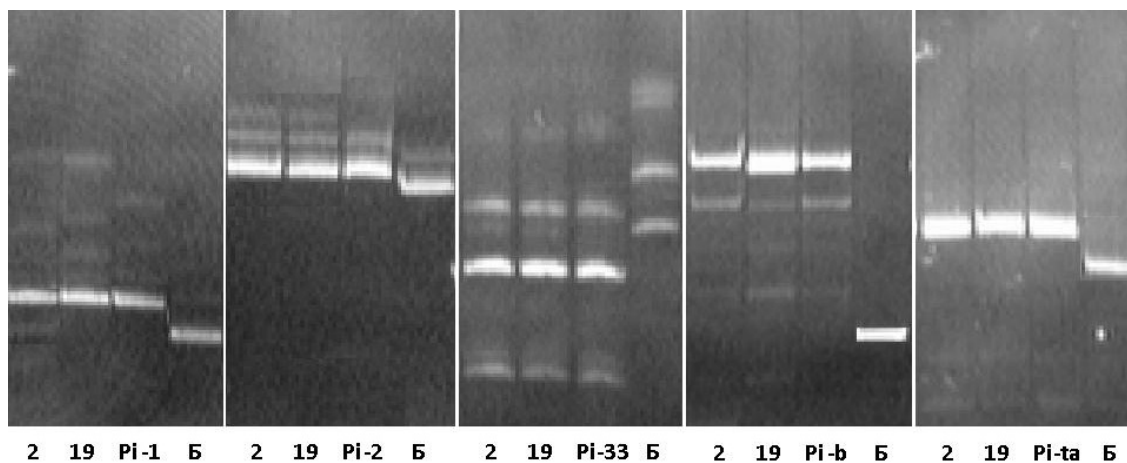


Рис. 1. Фореграммы образцов риса по маркерам пяти генов Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b, Pi-ta. Линии 2 и 19 несут доминантные аллели в пяти локусах в гомозиготном состоянии, сорт Боярин (Б) – рецессивные

Первая линия 1225/13 скороспелая, созревает за 110 дней, низкорослая (80 см), с небольшой метелкой (15 см).

Вторая линия 1396/13 – среднеспелая, период до созревания 120 дней, более высокорослая (100 см), с крупной длинной метелкой (22 см).

Кроме того, выделены 12 линий, имеющих все 5 генов, но некоторые из них в гетерозиготном состоянии. Из этих гибридов в последующие годы значительно легче и вероятней отобрать полные гомозиготные по доминантным аллелям устойчивости формы. Эти линии изучены в селекционном питомнике 2014 года на урожайность, качество и устойчивость к пирикулярриозу. Проведен очередной цикл отборов лучших форм и их ПЦР-анализ. Более перспективную линию 1396/13 планируется размножить в 2015 году на площади 100 м², чтобы изучить ее продуктивность и качество.

Выводы. В результате многолетней работы по интрогрессии генов устойчивости к пирикулярриозу были получены пирамидированные линии риса. С помощью маркерной селекции и ПЦР-анализа созданы формы, совмещающие в себе пять эффективных генов устойчивости к опасному патогену Pi-l, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b.

Литература

1. *Correa-Victoria, F.J.* Gene combinations in rice for the development of durable resistance to *Pyricularia grisea* in Colombia / Correa-Victoria F.J., Tharreau D., Martinez C., Vales M. et al. // Proc. 3rd Int. Temperate Rice Conference, Punta del Este, 2003.
2. *Silue, D.* Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa* - *Magnaporthe grisea* pathosystem/ Silue, D., Nottoghem J.L., Tharreau D. // *Phytopathology*, 1992. –82. – P.577-580.

3. *Chao, C.T.* Genetic analysis of resistance/susceptibility in individual F3 families of rice against strains of *Magnaporthe grisea* containing different genes for avirulence/ C.T. Chao, K.A. Moldenhauer, A.H. Ellingboe // *Euphytica*, 1999. –109. – P.183-190.
4. *Mackill, D.J.* Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice/ D.J.Mackill, J.M. Bonman // *Phytopathology*, 1992. –82. – P.746-749.
5. *Yu, Z.H.* Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.)/ Z.H. Yu, D.J. Mackill, J.M. Bonman, S.R. McCouch, E. Guideroni, J.L. Nottoghem, S.D. Tanksley// *Theor. Appl. Genet.*, 1996. – 93. – P.859-863.
6. *Bryan, G.T.* A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta/ G.T. Bryan, K. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H.P. Hershey, S. McAdams, R. Tarchini, G. Donaldson, K. Faulk, B. Valent// *Plant Cell*, 2000. – 12. – P.2033-2045.
7. *Inukai, T.* Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice/ T. Inukai, R.J. Nelson, R.S. Zeigler, S. Sarkarung, D.J. Mackill, J.M. Bonman, T. Takamure, T. Kinoshita // *Phytopathology*, 1994. – 84. – P.1278-1283.
8. *Wang, Z.X.* The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes / Z.X. Wang, M. Yano, U.Yamanouchi, M.Iwamoto, L. Monna, H. Hayasaka, Y. Katayose, T. Sasaki// *Plant J.*, 1999. – 19. – P.55-64.
9. *Wise, R.P.* Disease resistance: What's brewing in barley genomics/ R.P. Wise // *Plant Dis.*, 2000. – 84. – P.1160-1170.
10. *Jena, K.K.* Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding/ K.K. Jena, H.P. Moon, D.J. Mackill // *Korean J. Breed.*, 2003. – V.35. – P. 133-140.
11. *Хавкин, Э.Е.* Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур/ Э.Е. Хавкин// *Сельскохозяйственная биология*, 2003. – №3. – С.26-41.
12. *Костылев, П.И.* Объединение в одном генотипе риса пяти генов устойчивости к пирикулярриозу с помощью ДНК-маркеров/ П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Ж.М. Мухина, Е.В. Дубина//8-я Междунар. научно-практ. конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем», г. Краснодар, 2014. – С.25-28.
13. *Костылев, П.И.* Перенос пяти генов устойчивости риса к пирикулярриозу с помощью ДНК-маркеров/ П.И. Костылев, И.А. Шилов, Ж.М. Мухина // *Вестник РАСХН.*– 2014. – 1. – С.33-35.

Literature

1. *Correa-Victoria, F.J.* Gene combinations in rice for the development of durable resistance to *Pyricularia grisea* in Colombia / Correa-Victoria F.J., Tharreau D., Martinez C., Vales M. et al. // Proc. 3rd Int. Temperate Rice Conference, Punta del Este, 2003.
2. *Silue, D.* Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa* - *Magnaporthe grisea* pathosystem/ Silue, D., Notteghem J.L., Tharreau D. // *Phytopathology*, 1992. –82. – P.577-580.
3. *Chao, C.T.* Genetic analysis of resistance/susceptibility in individual F3 families of rice against strains of *Magnaporthe grisea* containing different genes for avirulence/ C.T. Chao, K.A. Moldenhauer, A.H. Ellingboe // *Euphytica*, 1999. –109. – P.183-190.
4. *Mackill, D.J.* Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice/ D.J.Mackill, J.M. Bonman // *Phytopathology*, 1992. –82. – P.746-749.
5. *Yu, Z.H.* Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.)/ Z.H. Yu, D.J. Mackill, J.M. Bonman, S.R. McCouch, E. Guideroni, J.L. Notteghem, S.D. Tanksley// *Theor. Appl. Genet.*, 1996. – 93. – P.859-863.
6. *Bryan, G.T.* A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*/ G.T. Bryan, K. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H.P. Hershey, S. McAdams, R. Tarchini, G. Donaldson, K. Faulk, B. Valent// *Plant Cell*, 2000. – 12. – P.2033-2045.
7. *Inukai, T.* Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice/ T. Inukai, R.J. Nelson, R.S. Zeigler, S. Sarkarung, D.J. Mackill, J.M. Bonman, T. Takamure, T. Kinoshita // *Phytopathology*, 1994. – 84. – P.1278-1283.
8. *Wang, Z.X.* The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes / Z.X. Wang, M. Yano, U.Yamanouchi, M.Iwamoto, L. Monna, H. Hayasaka, Y. Katayose, T. Sasaki// *Plant J.*, 1999. – 19. – P.55-64.
9. *Wise, R.P.* Disease resistance: What's brewing in barley genomics/ R.P. Wise // *Plant Dis.*, 2000. – 84. – P.1160-1170.
10. *Jena, K.K.* Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding/ K.K. Jena, H.P. Moon, D.J. Mackill // *Korean J. Breed.*, 2003. – V.35. – P. 133-140.
11. *Khavkin, E.E.* Molecular plant breeding: DNA-technologies of breeding of new crops/ E.E. Khavkin // *Agricultural biology*, 2003. - №3. – P. 26-41.
12. *Kostylev, P.I.* Combination of five genes tolerant to rice blast in one genotype with the help of DNA-markers/ P.I. Kostylev, E.V. Krasnova, A.A. Redkin, Zh.M. Mukhina, E.V. Dubina//

The VIII-th International science practical conference “Biological protection of plants as a basis of agro eco system stabilization”, Krasnodar, 2014. – P. 25-28.

13. *Kostylev, P.I.* Transfer of five genes tolerant to rice blast with the help of DNA-markers/ P.I. Kostylev, P.I. Shilov, Zh.M. Mukhina //Vestnik of RAAS, 2014. – №1. – P.33-35.