

633.18:631.524.86:577.27(571.63)

**М.В. Илюшко**, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник;

**П.В. Фисенко**, кандидат биологических наук, научный сотрудник;

**Т.В. Суницкая**, младший научный сотрудник;

**С.С. Гученко**, младший научный сотрудник,

ФГБНУ «Приморский НИИСХ»

(692539, Приморский край, г. Уссурийск, п. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30,

email: [ilyushkoiris@mail.ru](mailto:ilyushkoiris@mail.ru), 89502840983);

**Чжан Цзюймэй**, кандидат биологических наук, директор Китайско-Российского центра по научно-техническому сотрудничеству в области сельского хозяйства

Хейлунцзянской академии сельскохозяйственных наук,

(ХАСХН, КНР, г. Харбин);

**Дэн Линг-Вэй**, PhD, научный сотрудник Северного совместного научного центра

по молекулярной селекции риса Китайской академии наук,

(КНР, г. Харбин);

**П.И. Костылев**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник,

ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»

(347740, г. Зерноград, Научный городок, 3; email: [vniizk30@mail.ru](mailto:vniizk30@mail.ru))

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ В СОРТАХ РИСА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ**

Изучено наличие пяти генов устойчивости к пирикуляриозу в восьми сортах риса дальневосточной селекции методом ДНК-типирования. В шести сортах присутствует по одному из генов: *Pi-2* – в сортах Ханкайский 429 и Ханкайский 52; *Pi-ta* – в сортах Рассвет, Луговой и Долинный; *Pi-z* – в сорте Алмаз. Гены *Pi-1* и *Pi-b* не выявлены в изучаемых сортах. Предложена схема скрещивания между сортами и коллекционными образцами для пирамидирования генов устойчивости в гибридных образцах.

**Ключевые слова:** *Oryza sativa* L., гены устойчивости к пирикуляриозу, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-z*, *Pi-b*, *Pi-ta*, сорт

**M.V. Ilyushko**, Candidate of Biological Sciences, docent, senior research officer;

**P.V. Fisenko**, Candidate of Biological Sciences, research officer;

**T.V. Sunitskaya**, junior research officer;

**S.S. Guchenko**, junior research officer,

FSBSI 'Primorsky RIA'

(692539, Primorsky Krai, Ussuriysk, Timiryazevsky p., St. Volozhenina, 30, email:

[ilyushkoiris@mail.ru](mailto:ilyushkoiris@mail.ru), tel.: 89502840983);

**Chzhan TszuyMei**, Candidate of Biological Sciences, the head of the China-Russian Center for science-technical cooperation in agriculture of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,  
(HAAS, CNR, Kharbin);

**Dan Ling-Wei**, PhD, research officer of the Northern Research Center for molecular breeding of rice of the Chinese Academy of Sciences (CNR, Kharbin);

**P.I. Kostylev**, Doctor of Agricultural Sciences, main research officer  
FSBSI Agricultural Research Center 'Donskoy'  
(347740, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; email: vniizk30@mail.ru)

## **IDENTIFICATION OF RICE BLAST RESISTANCE GENES IN THE RICE VARIETIES DEVELOPED WITH DNA-MARKERS ASSISTANCE**

Eight rice varieties of the Far East breeding have been studied by the method of DNA-typing to establish the presence of rice blast resistance genes. Six varieties possess one gene each: the varieties 'Khankaysky 429' and 'Khankaysky 52' possess the gene *Pi-2*, the varieties 'Rassvet', 'Lugovoy' and 'Dolinnyy' possess the gene *Pi-ta*, the variety 'Almaz' possesses the gene *Pi-z*. The genes *Pi-1* и *Pi-b* have not been found in the studied varieties. The scheme of crossing among the varieties and collection samples has been suggested for pyramiding resistance genes in the hybrids.

**Keywords:** *Oryzasativa L.*, rice blast resistance genes, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-z*, *Pi-b*, *Pi-ta*, variety.

Пирикулярриоз – наиболее распространенная и вредоносная болезнь риса в Приморском крае, поскольку муссонный климат дальневосточного региона благоприятен для развития возбудителя этого заболевания – гриба *Magnaporthe grisea* (Hebert) Var. (*Pyricularia oryzae* Cavar (L.)). В годы эпифитотий отмечаются значительные потери урожая [2, 3]. Приморская популяция гриба характеризуется высоким генетическим разнообразием. Известно несколько десятков рас этого гриба в крае, зафиксировано большинство известных генов его вирулентности [2, 6].

Селекция на устойчивость риса к пирикулярриозу на Дальнем Востоке – одно из ключевых направлений. Длительное бесменное использование сортов в производстве приводит к потере их устойчивости [2]. Более того, новые сорта, получившие в результате селекции устойчивый тип реакции к пирикулярриозу, из-за длительных сроков создания и испытания частично утрачивают иммунитет с появлением и накоплением в популяции новых штаммов патогена [3].

Одна из ведущих стратегий получения резистентных сортов риса – пирамидирование (объединение) в одном генотипе нескольких генов устойчивости со значительным вкладом в фенотипическое варьирование по данному признаку.

Пирамидированные линии, обладающие комбинацией из трех или четырех генов устойчивости, обеспечивают увеличение и расширение спектра резистентности и позволяют создать сорта с длительной устойчивостью к патогену [1, 5]. Важно подобрать гены, детерминирующие устойчивость широкого спектра к пирикуляриозу. Эта стратегия успешно реализована в зоне рисоводства в западной части РФ [4].

Цель исследования – определение наличия генов устойчивости к пирикуляриозу в районированных сортах риса с помощью ДНК-маркеров для последующего пирамидирования их в дальневосточных генотипах.

**Материалы и методы.** Объектом изучения послужили семь сортов риса (Каскад, Рассвет, Дарий 23, Луговой, Ханкайский 429, Ханкайский 52, Долинный) селекции Приморского НИИСХ, включенных в Государственный реестр селекционных достижений РФ [8], и перспективный сорт Алмаз. В работе использовано по три растения каждого сорта в фазе трех-четырёх листьев.

В качестве позитивного контроля для генов *Pi-1* и *Pi-2* использовали растения сорта Магнат (ВНИИ зерновых культур им. И.Г. Калининко), который является носителем трех генов устойчивости [4], для гена *Pi-z* использован сорт Марателли 5А (Франция) – носитель данного гена [7], для гена *Pi-b* – сорт Окси 2х (США), для гена *Pi-ta* – регенерантная линия 9\*D(1), полученная в культуре пыльников *in vitro* в лаборатории с.-х. биотехнологии Приморского НИИСХ. Наличие гена *Pi-b* в сорте Окси 2х и гена *Pi-ta* в линии 9\*D(1) выявлено в ходе предварительного анализа в Китайско-Российском центре по научно-техническому сотрудничеству в области сельского хозяйства Хейлунцзянской академии сельскохозяйственных наук (КНР, г. Харбин) в сравнении с китайскими образцами риса.

ДНК выделяли из лиофильно высушенных листьев ЦТАБ-методом набором фирмы «ДНК-технология». Концентрацию ДНК определяли в объеме 1 мкл на спектрофотометре BioSpec-nano.

Для контроля наличия у растений генов устойчивости к пирикуляриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-z*, *Pi-b*, *Pi-ta* проводили анализ на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием внутригенных молекулярных маркеров или маркеров, фланкирующих участки ДНК, тесно сцепленные с целевыми генами (таблица 1).

1. Характеристика последовательностей молекулярных маркеров для идентификации генов устойчивости риса к пирикуляриозу семейства *Pi*

Ген устойчивости	Маркер	Сиквенс праймера		Размер продукта, пар нуклеотидов	Температура отжига праймера, °С	Источник литературы
<i>Pi-1</i>	Rm224	F	ATCGATCGATCTTCACGAGG	124, 158	56	[1, 5]
		R	TGCTATAAAAAGGCATTCGGG			
<i>Pi-2</i>	Rm527	F	GGCTCGATCTAGAAAATCCG	233	56	[1, 5]
		R	TTGCACAGGTTGCGATAGAG			
<i>Pi-z</i>	<i>Pi-z</i>	F	GGACCCGCGTTTTCCACGTGTAA	292	60	[7]
		R	AGGAATCTATTGCTAAGCACGAC			
<i>Pi-b</i>	<i>Pi-b</i>	F	GCATTAGATAGTGAAAGCCGG	218	60	[7]
		R	AAGGACTGGTGTTCATCCAGGC			
<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-ta</i>	F <sub>1</sub>	GCCGTGGCTTCTATCTTTACCTG	270, 563	60	[1]
		R <sub>2</sub>	ATCCAAGTGTTAGGGCCAACATTC			
		F <sub>2</sub>	TTGACACTCTCAAAGGACTGGGAT			
		R <sub>2</sub>	TCAAGTCAGGTTGAAGATGCATAGA			

ПЦР проводили в 25мкл реакционной смеси, содержащей 1X ПЦР буфера (ThermoScientific), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5mM dNTP, по 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров, 1 единицу активности Taq ДНК полимеразы (Синтол) и 50-60 нг ДНК исследуемых образцов. Контрольная проба содержала полную амплификационную смесь без добавления ДНК. Амплификацию осуществляли в трехкратной повторности в термоциклере фирмы «BioRad».

Условия ПЦР для генов *Pi-1* и *Pi-2*: начальная денатурация – 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при температуре 56 °С, элонгация – 35 с при 72 °С; заключительная элонгация – 3 мин при 72 °С. Условия ПЦР для генов *Pi-z*, *Pi-b* и *Pi-ta*: начальная денатурация – 1 мин при 96 °С; 35 циклов: денатурация – 15 с при 94 °С, отжиг – 30 с при температуре 60 °С, элонгация – 2 мин при 72 °С; заключительная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 1,4%-ом агарозном геле на основе 0,5xTBE буфера и визуализировали в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документации «BioRad», предварительно окрашивая 1%-ым раствором бромистого этидия (5 мкл на 100 мл геля).

**Результаты.** С использованием технологии молекулярного маркирования проведен анализ наличия пяти генов устойчивости к пирикулярриозу семейства *Pi* в восьми сортах риса дальневосточной селекции (таблица 2).

2. Наличие генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi* в сортах риса дальневосточной селекции

Сорт	Наименование гена				
	<i>Pi-1</i>	<i>Pi-2</i>	<i>Pi-z</i>	<i>Pi-b</i>	<i>Pi-ta</i>
Каскад	–	–	–	–	–
Рассвет	–	–	–	–	+
Дарий 23	–	–	–	–	–
Луговой	–	–	–	–	+
Алмаз	–	–	+	–	–
Ханкайский 429	–	+	–	–	–
Ханкайский 52	–	+	–	–	–
Долинный	–	–	–	–	+

Примечание. + наличие гена устойчивости в сорте; – отсутствие гена устойчивости в сорте.

Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов показало наличие гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1* у донорного сорта ростовской селекции Магнат и отсутствие его у дальневосточных сортов (рис. 1). Анализ наличия гена *Pi-2* позволил выявить его, кроме донора, у сортов Ханкайский 429 и Ханкайский 52 (рис. 2). Растения четырех других сортов обладают по одному из генов устойчивости: ген *Pi-ta* идентифицирован в сортах Рассвет, Луговой и Долинный (рис. 3), а ген *Pi-z* – в сорте Алмаз (рис. 4). Два сорта риса (Каскад и Дарий 23) не имеют указанных генов. Ген *Pi-b* не выявлен в изучаемых сортах (рис. 5).

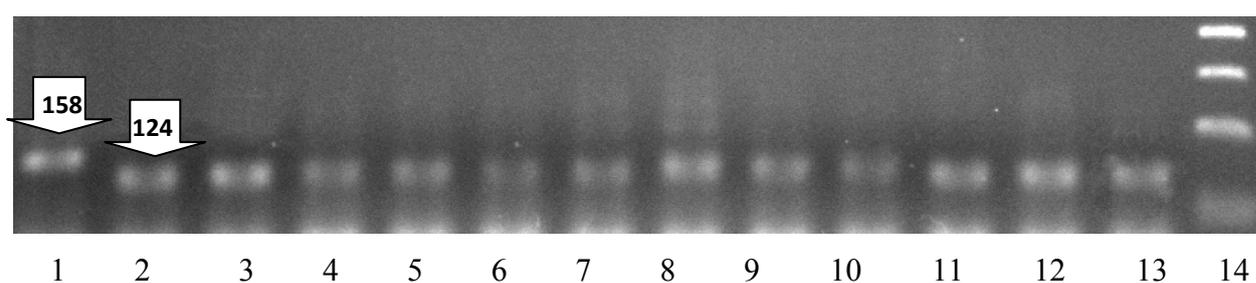


Рис. 1. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1* у сортов риса: 1 – позитивный контроль 158 п.н. (Магнат); 2-4 – Каскад; 5-7 – Рассвет; 8-10 – Дарий 23; 11-13 – Луговой – сорта с восприимчивой аллелью гена 124 п.н.; 14 – маркер молекулярной массы

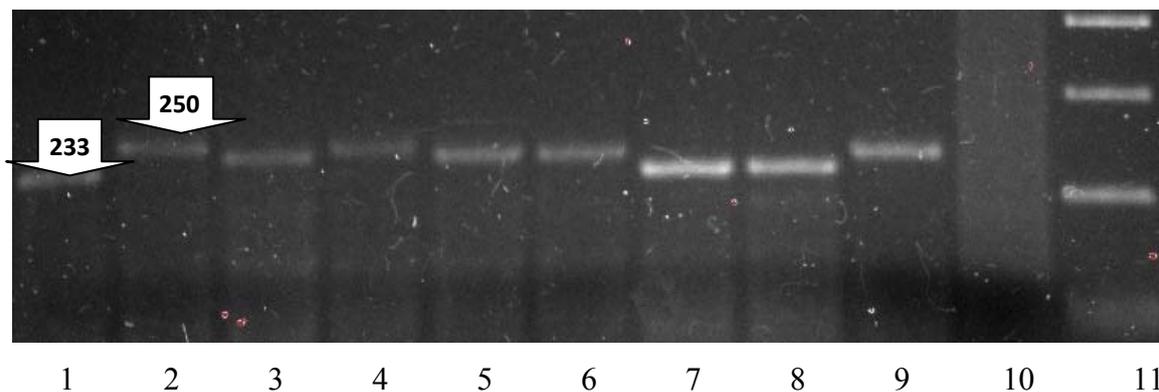


Рис.2. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-2* у сортов риса: 1 – положительный контроль 233 п.н. (Магнат); 2 – Каскад; 3 – Рассвет; 4 – Дарий 23; 5 – Луговой; 6 – Алмаз; 9 – Долинный – сорта с восприимчивой аллелью гена ~250 п.н.; 7 – Ханкайский 429, 8 – Ханкайский 52 – сорта с устойчивой аллелью гена 233 п.н.; 10 – негативный контроль; 11 – маркер молекулярной массы

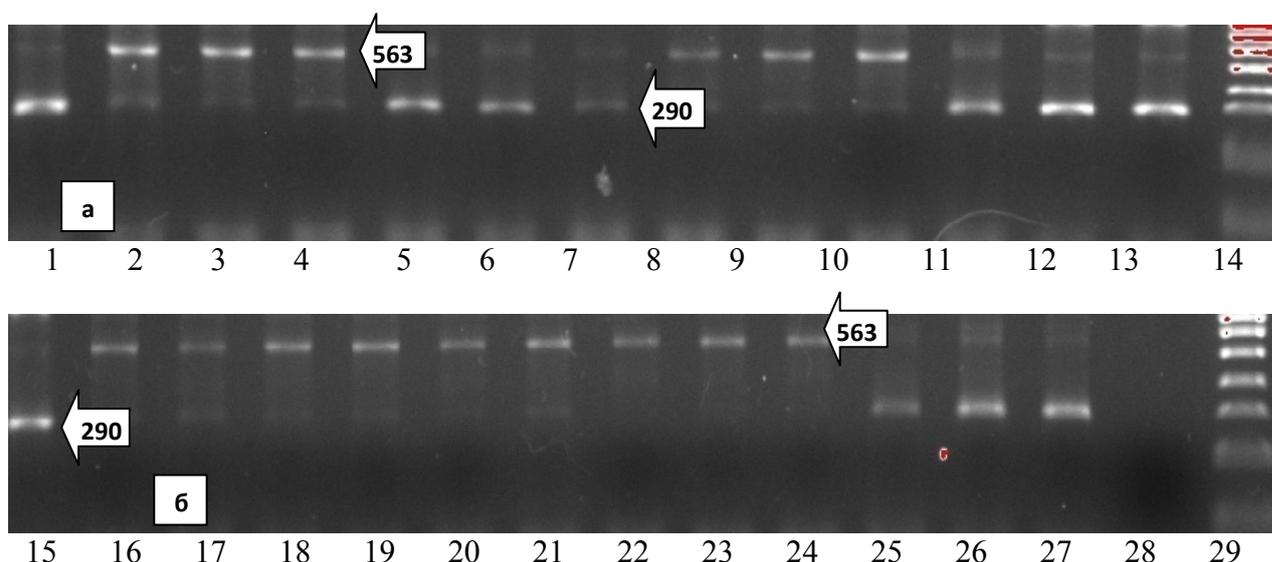


Рис. 3. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* у сортов риса (а, б): 1, 15 – положительный контроль 290 п.н. (регенерантная линия 9\*D(1)); 5-7 – Рассвет; 11-13 – Луговой; 25-27 – Долинный – сорта с устойчивой аллелью гена 290 п.н.; 2-4 – Каскад; 8-10 – Дарий 23; 16-18 – Алмаз; 19-21 – Ханкайский 429; 22-24 – Ханкайский 52 – сорта с восприимчивой аллелью гена 563 п.н.; 28 – негативный контроль; 14, 29 – маркер молекулярной массы

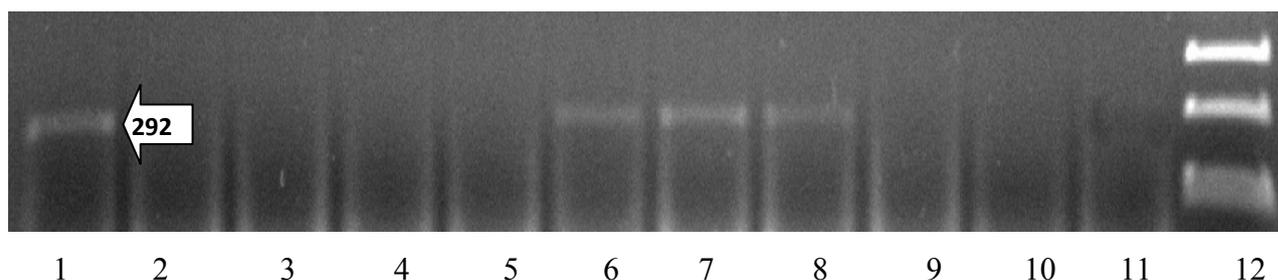


Рис. 4. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-z* у сортов риса: 1 – позитивный контроль 292 п.н. (Марателли 5А); 6-8 – Алмаз – сорт с геном устойчивости 292 п.н.; 2 – Каскад; 3 – Рассвет; 4 – Дарий 23; 5 – Луговой; 9 – Ханкайский 429; 10 – Ханкайский 52; 11 – Долинный – сорта без гена устойчивости; 23 – маркер молекулярной массы

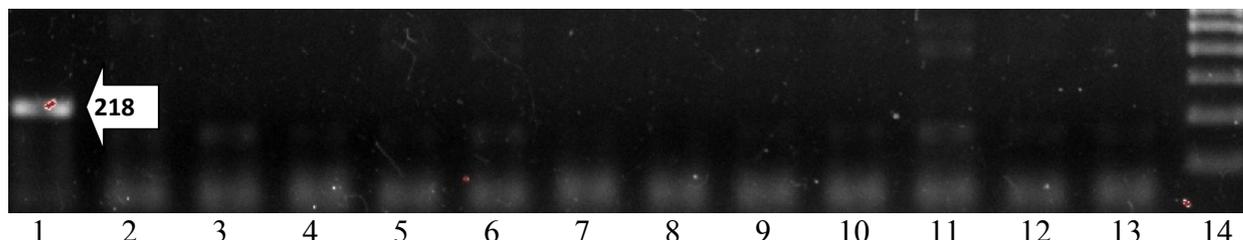


Рис. 5. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b* у сортов риса: 1 – позитивный контроль 218 п.н. (Окси 2х); 2-4 – Каскад; 5-7 – Рассвет; 8-10 – Дарий 23; 11-13 – Луговой – сорта без гена устойчивости; 23 – маркер молекулярной массы

Полученные результаты хорошо согласуются с данными по устойчивости указанных сортов риса. На искусственном инфекционном поле Дарий 23 восприимчив к пирикуляриозу на уровне стандартного сорта Дальневосточный, а сорта Рассвет, Луговой и Долинный в большей степени устойчивы [3]. Кроме этого, они являются новыми сортами, годы их районирования 2010-2013, что является преимуществом благодаря устойчивости к пирикуляриозу [3]. Однако сорт Каскад, самый последний из них (год районирования 2014), но из-за отсутствия, по крайней мере, изученных генов устойчивости, не обладает резистентностью к пирикуляриозу и поражается в полевых условиях. По данным отчета Дальневосточного научно-исследовательского института защиты растений (неопубликованные данные), в 2016 году сорт Марателли 5А был менее устойчив (VI группа устойчивости), чем сорт-стандарт Дальневосточный (V), а сорта Долинный и Окси 2х – среднеустойчивы (III), сорт Алмаз попал в IV группу устойчивости. Можно прогнозировать, что сорт Алмаз будет поражаться в отдельные годы, поскольку обладает только одним геном устойчивости *Pi-z*, таким же, как и сорт Марателли 5А, но, возможно, он имеет другие гены устойчивости к пирикуляриозу, которые нами не изучались.

Требуется поиск иных генов, детерминирующих устойчивость широкого спектра к пирикуляриозу в сортах и коллекционных образцах риса на Дальнем Востоке.

Для пирамидирования генов устойчивости к пирикуляриозу в сортах риса селекции Приморского НИИСХ предлагается следующая схема скрещивания:

Алмаз (*Pi-z*) x Магнат (*Pi-1+ Pi-2*)      Окси 2х (*Pi-b*) x Рассвет (*Pi-ta*)

$$\begin{array}{ccc}
 \downarrow & & \downarrow \\
 F_1 (Pi-1+ Pi-2 + Pi-z) & \times & F_1 (Pi-b + Pi-ta) \\
 & \downarrow & \\
 & Pi-1+Pi-2+Pi-z+Pi-b+Pi-ta & 
 \end{array}$$

В процессе пирамидирования произойдет объединение в одном генотипе пяти генов устойчивости при молекулярно-генетическом контроле наличия генов в гибридах.

Таким образом, в результате исследования были сделаны следующие выводы:

1. Изученные восемь сортов дальневосточной селекции имеют небольшое количество генов устойчивости к пирикулярриозу риса. В шести сортах присутствует по одному из генов: *Pi-2* – в сортах Ханкайский 429 и Ханкайский 52; *Pi-ta* – Рассвет, Луговой и Долинный; *Pi-z* – Алмаз. В сортах Каскад и Дарий 23 не идентифицированы гены *Pi*. Гены *Pi-1* и *Pi-b* не выявлены в изучаемых сортах.

2. Для пирамидирования генов устойчивости к пирикулярриозу в сортах риса селекции Приморского НИИСХ возможны следующие схемы скрещивания: Алмаз x Магнат, Окси 2x x Рассвет (Луговой, Долинный) с последующим объединением их в одном генотипе при молекулярно-генетическом контроле наличия генов в гибридах.

Работа поддержана грантами «Программа фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» №15-I-6-005 и «Программа совместной лаборатории Китая, стран СНГ и центрально-восточной Европы в рамках концепции «Один пояс и один путь».

### Литература

1. Дубина, Е.В. Создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса с использованием ДНК-маркерных технологий / Е.В. Дубина, Ж.М. Мухина, Е.М. Харитонов // Генетика. – 2015. –Т. 51.– № 8.– С. 881-886.
2. Ковалевская, В.А. На пути к решению проблемы пирикулярриоза риса / В.А. Ковалевская // Защита и карантин растений. – 2004.–№ 12.– С. 29-30.
3. Ковалевская, В.А. Устойчивость риса к пирикулярриозу в Приморском крае / В.А.Ковалевская, В.Н. Лелявская, А.А. Ковалева // Защита и карантин растений.– 2013.– № 5.– С. 24-26.
4. Костылев, П.И. Сорт риса Магнат, созданный с помощью биотехнологии / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Н.В. Репкина, Ж.М. Мухина, Е.В. Дубина // Достижения науки и техники АПК.– 2015.– Т. 29.– № 3.– С. 10-12.
5. Костылев, П.И. Создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса с помощью ДНК-маркеров / П.И. Костылев, А.А. Редькин, Е.В. Краснова, Е.В. Дубина, Е.Т. Ильницкая, Л.В. Есаулова, Ж.М. Мухина, Е.М. Харитонов // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук.– 2014. – № 1.– С. 26-28.

6. Малахова, Н.М. Возбудитель пирикулярноза риса / Н.М. Малахова, М.В. Пестерева, А.А. Ковалева, В.А. Ковалевская, Н.М. Мылъников // Защита и карантин растений. – 1998.– № 1. – С. 26.
7. Wang J.C., Correll J.C., Jia Y. Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays // Crop protection, 2015, V. 72, p. 132-138.
8. [www.gossort.com](http://www.gossort.com)

### **Literature**

1. Dubina, E.V. The development of rice varieties resistant to blast with DNA-markers assistance / E.V. Dubina, Zh.M. Mukhina, E.M. Kharitonov // Genetics. – 2015.– V. 51.– № 8.– PP. 881-886.
2. Kovalevskaya, V.A. Trying to solve the problems of rice blast / V.A. Kovalevskaya // Protection and quarantine of plants.– 2004.– № 12.– PP. 29-30.
3. Kovalevskaya, V.A. Rice tolerance to blast in the Primorsky Krai / V.A. Kovalevskaya, V.N. Lelyavskaya, A.A. Kovaleva // Protection and quarantine of plants.– 2013.– № 5.– PP. 24-26.
4. Kostylev, P.I. Rice variety ‘Magnat’, developed by biotechnologies / P.I. Kostylev, E.V. Krasnova, A.A. Redkin, N.V. Repkina, Zh.M. Mukhina, E.V. Dubina // Achievements of science and technique of AIC.– 2015.– V. 29.– № 3. – P. 10-12.
5. Kostylev, P.I. The development of rice varieties resistant to blast by DNA-markers assistance / P.I. Kostylev, A.A. Redkin, E.V. Krasnova, E.V. Dubina, E.T. Ilnitskaya, L.V. Esaulova, Zh.M. Mukhina, E.M. Kharitonov // The Newsletter of the Russian Academy of Agricultural Sciences. – 2014.– № 1.– PP. 26-28.
6. Malakhov, N.M. Rice blast causative agent / N.M. Malakhova, M.V. Pestereva, A.A. Kovaleva, V.A. Kovalevskaya, N.M. Mylnikov // Protection and quarantine of plants.– 1998.– № 1. PP. 26.
7. Wang J.C., Correll J.C., Jia Y. Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays // Crop protection, 2015, V. 72, p. 132-138.
8. [www.gossort.com](http://www.gossort.com)