

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ РИСА К ПИРИКУЛЯРИОЗУ *PI-TA*² В КОЛЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦАХ И ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ СОРТАХ РИСА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ

М.В. Илюшко^{1*}, М.В. Ромашова¹, П.В. Фисенко¹, Т.В. Суницкая¹,
С.С. Гученко¹, В.Н. Лелявская²

¹ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск

²Дальневосточный научно-исследовательский институт защиты растений, Камень-Рыболов

* ответственный за переписку, e-mail: ilyushkoiris@mail.ru

Пирикулярриоз – серьезный лимитирующий фактор получения стабильно высоких урожаев риса в Приморском крае. Использование устойчивых сортов считается одним из наиболее эффективных способов защиты растений от болезней. Для Приморского края определен круг наиболее важных генов в селекции на устойчивость к пирикулярриозу – это *Pi-9*, *Pi-ta*², *Pi-12(t)* и *Pi-zt*. Цель исследования – идентификация гена устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-ta*² с помощью молекулярно-генетических маркеров в дальневосточных сортах риса и коллекционных образцах китайского и корейского происхождения. В результате исследования ген *Pi-ta*² выявлен в сортах Рассвет, Долинный и Луговой. Сорт Дубрава оказался полиморфным по наличию данного гена, поскольку выведен методом отбора из китайской сортосмеси. Семь из 30 китайских коллекционных сортообразцов были носителями гена *Pi-ta*², и 14 из 21 образца корейской селекции обладали данным геном. В приморских сортах риса отсутствует ген *Pi-9*. Сочетание генов *Pi-9+Pi-ta*² обеспечивает абсолютную устойчивость риса к пирикулярриозу. Таким образом, следующим шагом в селекции на устойчивость к пирикулярриозу будет поиск сортообразцов риса с геном *Pi-9* с последующей интрогрессией его в сорта-носители гена *Pi-ta*².

Ключевые слова: *Oryza sativa*, пирикулярриоз, *Pi-ta*², молекулярный маркер

Поступила в редакцию: 25.12.2018

Принята к печати: 25.01.2019

Введение

Рисоводство в Приморском крае ведет свою историю с 1918 года (Чайка и др., 2004). В течение ста лет селекционеры успешно выводили и районировали сорта для дальневосточной зоны рисосеяния, характеризующейся сложными условиями выращивания теплолюбивой культуры (короткий период вегетации, маленькая сумма эффективных температур). На 2018 год в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию для 12 зоны, рекомендовано 12 сортов риса, и все они принадлежат исключительно селекционерам Приморского края (ФГБУ «Госсорткомиссия» ..., 2019).

После кризиса в рисосеянии края, связанного с экономическими трудностями в сельском хозяйстве, примерно 10–12 лет назад в качестве семенного материала стали использовать сортосмеси китайского происхождения и испытывать нетрадиционные для России технологии возделывания риса (рассадная, мокрый посев). Данные технологии имеют недостатки, такие как большой вклад ручного труда и существенный вынос гумуса при гидратационной планировке. Вместе с тем, у сортосмесей, привезенных из северных провинций Китая (Цзилиньской и Хейлунцзянской, в которых природно-климатические условия выращивания схожи с условиями в дальневосточной зоне рисосеяния), имеются некоторые очевидные преимущества – при значительных дозах минеральных удобрений они устойчивы к полеганию и пирикулярриозу (Лелявская В.Н., неопубликованные данные). Маловероятно, что они будут районированы в крае, так как не обладают должной выравненностью. Более того, незаконно ввезенные партии семян риса стали причиной значительного распространения пирикулярриоза на юге Дальнего

Востока России. Отечественные селекционеры успешно вели селекцию на устойчивость к данному заболеванию, которое было представлено на территории края четырьмя распространенными штаммами возбудителя заболевания *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Hebert Barr.)) (Малахова и др., 1998). Бесконтрольный ввоз партий семян риса привел к появлению новых штаммов *P. oryzae*, у которых зафиксированы практически все известные гены вирулентности (Ковалевская и др., 2013; Санкин и др., 2017). К этим штаммам районированные сорта оказались среднеустойчивы, поскольку ранее отбор на устойчивость проводили на ином инфекционном фоне (Ковалевская и др., 2013).

Таким образом, перед селекционерами края стоят прежние задачи (получение высокоурожайных скороспелых сортов риса, устойчивых к полеганию и пирикулярриозу), но в новых, несколько изменившихся условиях (применяемые высокие дозы удобрений и усилившаяся инфекционная нагрузка).

Для получения стабильно высоких урожаев риса в Приморском крае одним из серьезных лимитирующих факторов является пирикулярриоз (Ковалевская и др., 2013). Это заболевание риса встречается во всех зонах рисосеяния (Dean et al., 2012). Использование устойчивых сортов считается одним из наиболее эффективных способов защиты растений от болезней (Костылев, 2017).

На сегодня известно 96 генов, ответственных за устойчивость риса к пирикулярриозу (Костылев, 2017). Однако только некоторые гены могут быть эффективны против популяций рас патогенов, циркулирующих в том или ином районе. Поиск эффективных генов устойчивости к

пирикулярнозу – это одна из важных задач специалистов (Wang et al., 2015).

Для Приморского края определен круг наиболее важных генов в селекции на устойчивость к пирикулярнозу – это *Pi-9*, *Pi-ta²*, *Pi-12(t)* и *Pi-zt*. Приморские расы пирикулярнозу минимально поражают сорта-дифференциаторы с этими генами. Поражаемость составляет 2, 7, 9 и 12% соответственно, в то время как другие моногенные линии имеют меньший уровень устойчивости (Санкин и др., 2017). В северном Китае также большое внимание уделяют генам *Pi-9* и *Pi-ta²*, поскольку моногенные линии, несущие этот ген, демонстрируют наивысший спектр устойчивости к местным расам (изолятам) пирикулярноза – более 90%, и во многих тестах до 100% (Wang et al., 2013, Wang et al., 2015, Ma et al., 2015).

Материалы и методы

Объектом изучения послужили сорта риса (Каскад, Рассвет, Дарий 23, Луговой, Ханкайский 429, Ханкайский 52, Долинный, Приозерный 61) селекции ФГБНУ «ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки», находящихся в Государственном реестре селекционных достижений РФ, сорт Дубрава (автор В.А. Ковалевская), перспективный сорт Алмаз, 30 коллекционных сортообразцов китайской и 21 корейской селекции. В работе использовано по три растения каждого сорта в фазе трех-четырёх листьев.

ДНК выделяли из свежих листьев известным методом (Aljanabi, Martinez, 1997). Концентрацию ДНК определяли в объеме 1 мкл на спектрофотометре BioSpec-nano. Качество выделенной ДНК определяли методом электрофореза в 1.4% агарозном геле с использованием в качестве стандарта ДНК известной концентрации. Выявление наличия у растений гена устойчивости к пирикулярнозу *Pi-ta²* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Праймеры, амплифицирующие искомый ген, выбрали по литературным данным (Wang et al., 2015).

Результаты и обсуждение

В результате молекулярно-генетического маркирования дальневосточных сортов риса ген *Pi-ta²* идентифицирован в сортах Рассвет, Долинный и Луговой (рис. 1). Ранее в этих же сортах обнаружен ген *Pi-ta* и его отсутствие в большинстве других (Алмаз, Ханкайский 429, Ханкайский 52, Дарий 23 и Каскад) (Илюшко и др., 2017). Данные хорошо согласуются с гипотезой Wang et al. (2004) о том, что эти два гена аллельны, либо тесно сцеплены друг с

другом. В коллекционных образцах и сортах риса дальневосточной селекции с помощью молекулярных маркеров не обнаружено гена *Pi-9* (Илюшко и др., 2019). Однако, в трех сортах риса (Долинный, Луговой и Рассвет) выявлен ген *Pi-ta* (Илюшко и др., 2017), который рассматривается как сцепленный с геном *Pi-ta²*, либо как его другая аллель (Wang et al., 2004).

Цель исследования – идентификация гена устойчивости риса к пирикулярнозу *Pi-ta²* с помощью молекулярно-генетических маркеров в сортах риса, находящихся в Государственном реестре селекционных достижений по 12 зоне, и коллекционных образцах китайского и корейского происхождения.

Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси содержащей (×1) ПЦР буфера (Thermo Scientific), 3.6 mM MgCl₂, 1.5 mM dNTP, по 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров, 1 единицу активности Taq ДНК полимеразы (Синтол) и по 50–60 нг ДНК исследуемых образцов. Для контроля неспецифической гибридизации праймеров использовали полную реакционную смесь без добавления ДНК. Амплификацию осуществляли в трехкратной повторности в термоциклере фирмы BioRad. Использовали следующий температурный профиль реакции: начальная денатурация – 95 °С 5 мин., далее 35 циклов: денатурация – 94 °С 30 сек., отжиг праймеров – 60 °С 30 сек., элонгация – 72 °С 35 сек., заключительная элонгация – 72 °С 5 мин.

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1.4%-ном агарозном геле на основе (×0.5) TBE буфера и визуализировали в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документации «BioRad», предварительно окрашивая 1%-ным раствором бромистого этидия.

В качестве контроля использовали растения сорта-дифференциатора Pi №4, являющегося носителем гена *Pi-ta²*.

Оryzabase (Integrated Rice Science Database, 2018) рассматривает их, как один и тот же ген (размер гена 7281 нуклеотид), выявляемый с помощью разных праймеров методом ПЦР для разных участков гена. Изучен полиморфизм аллелей гена *Pi-ta* нескольких видов и сортов риса. Обнаружено, что аллели гена *Pi-ta* схожи по нуклеотидной последовательности на 99%, и имеют различную степень дивергенции (Ramkumar et al., 2014). Однако действие

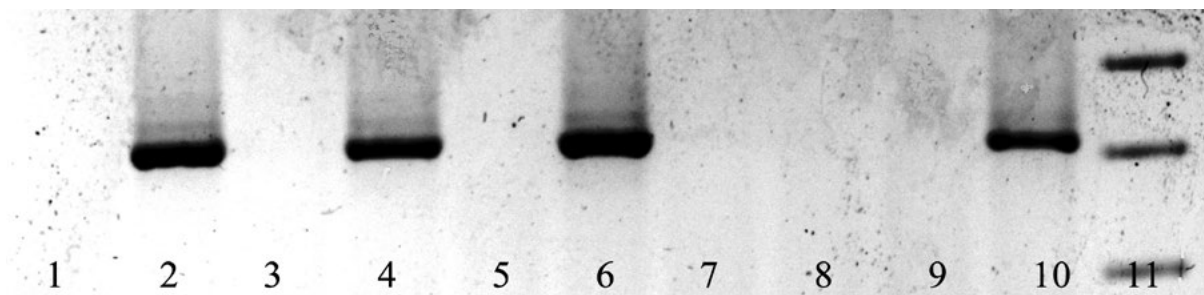


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении доминантной аллели гена устойчивости к пирикулярнозу *Pi-ta²* в дальневосточных сортах риса: 1 – Каскад, 3 – Ханкайский 429, 5 – Ханкайский 52, 7 – Дарий 23, 8 – Приозерный 61, 9 – Алмаз (доминантная аллель отсутствует); 2 – Долинный, 4 – Рассвет, 6 – Луговой (доминантная аллель присутствует); 10 – контроль 515 п.н. (Pi №4); 11 – маркер молекулярной массы

этих генов, изученное с помощью сортов-дифференциаторов, имеет очевидное фенотипическое различие. Образцы риса с геном *Pi-ta²* демонстрируют устойчивость к различным расам пирикуляррии в два-четыре раза выше, чем образцы с геном *Pi-ta* (Wang et al., 2015, Ma et al., 2015, Санкин и др., 2017).

При анализе трех растений сорта Дубрава у двух из них выявлено наличие гена *Pi-ta²*, а у одного – отсутствие. Для уточнения результата дополнительно проанализировали 15 растений данного сорта. Пять из них несли ген *Pi-ta²*, а у 10 растений характерный продукт амплификации не обнаружен. Таким образом, сорт риса Дубрава полиморфен

по наличию гена *Pi-ta²*. Он был выведен методом отбора из популяции №23-05 и заявителем характеризуется как устойчивый к пирикулярриозу (Государственный реестр ..., 2018). В дальневосточной зоне рисосеяния в качестве популяции можно рассматривать только китайские сортогосмеси, поэтому логично, что в ней выявлен полиморфизм, как минимум по одному гену.

Семь из 30 китайских коллекционных сортообразцов были носителями гена *Pi-ta²* (выборочные данные на рис. 2), и 14 из 21 образца корейской селекции (выборочные данные на рис. 3). Эти образцы могут быть использованы в селекции на устойчивость к пирикулярриозу.

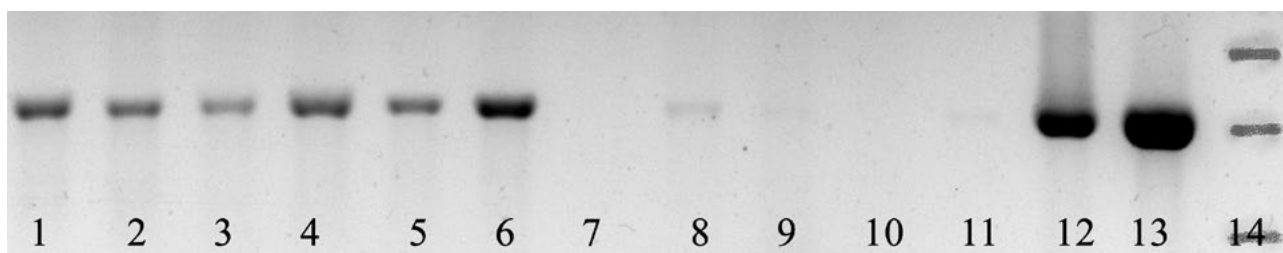


Рисунок 2. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении доминантной аллели гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta²* в китайских образцах риса: 7 – Х-Н-20-09, 8 – Х-Н-1-01, 9 – Му 07-1233, 10 – Му 07-1111, 11 – LJ 22 (доминантная аллель отсутствует); 1 – Му 07-1117, 2 – Му 07-1055, 3 – SJ 4, 4 – LJ 18, 5 – LJ 16, 6 – LJ 14 (доминантная аллель присутствует); 12, 13 – контроль 515 п.н. (Pi №4); 14 – маркер молекулярной массы

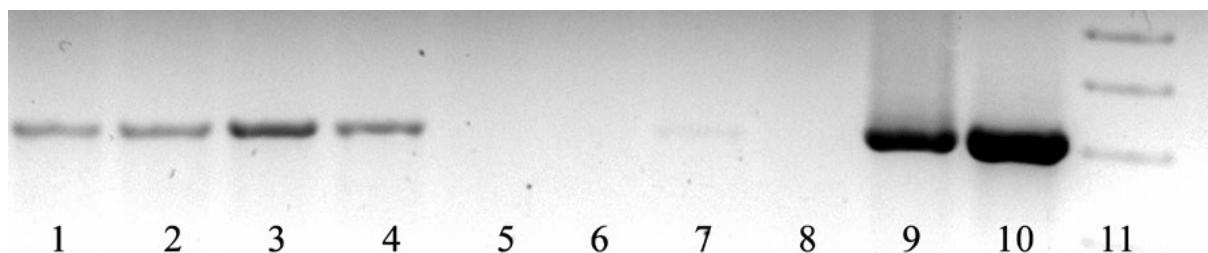


Рисунок 3. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении доминантной аллели гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta²* в корейских образцах риса: 5 – КУ-203, 6 – КМ-1709, 7 – КМ-1704, 8 – КМ-1703 (доминантная аллель отсутствует); 1 – КУ-204, 2 – КУ-201, 3 – КМ-1702, 4 – КМ-1701 (доминантная аллель присутствует); 9, 10 – контроль 515 п.н. (Pi №4); 11 – маркер молекулярной массы

Гены *Pi-9*, *Pi-b* и *Pi-ta²* относятся к генам широкого спектра действия. Два из них (*Pi-9* и *Pi-ta²*) наиболее актуальны для Приморского края в селекции на устойчивость к пирикулярриозу (Санкин и др., 2017). Ни в одном из образцов, представленных в этом исследовании, не обнаружено гена *Pi-9* (Илюшко и др., 2019). Ген *Pi-b* отсутствует в дальневосточных сортах, но выявлен в одном из

коллекционных образцов (Илюшко и др., 2017). Сочетание генов *Pi-9+Pi-ta²* либо *Pi-9+Pi-b* гарантирует абсолютную устойчивость риса к пирикулярриозу (Dai et al., 2012).

Таким образом, следующим шагом в селекционной работе должен стать поиск сортообразцов риса с геном *Pi-9* с последующей интрогрессией его в сорта риса Луговой, Долинный или Рассвет.

Библиографический список (References)

- Илюшко МВ, Фисенко ПВ, Суницкая ТВ и др (2017) Идентификация генов устойчивости к пирикулярриозу в сортах риса дальневосточной селекции с использованием ДНК-маркеров. *Зерновое хозяйство России* 52(4):41–45
- Илюшко МВ, Фисенко ПВ, Ромашова МВ и др (2019) Скрининг сортов риса дальневосточной селекции на наличие гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-9*. *Защита и карантин растений* (в печати).
- Ковалевская ВА, Лелявская ВН, Ковалева АА (2013) Устойчивость риса к пирикулярриозу в Приморском крае. *Защита и карантин растений* 5:24–26
- Костылев ПИ (2017) Гены устойчивости риса к пирикулярриозу и их маркеры. *Зерновое хозяйство России* 49(1-1): 34–39
- Малахова НМ, Пестерева МВ, Ковалева АА и др (1998) Возбудитель пирикулярриоза риса. *Защита и карантин растений* 1:26
- Санкин АЮ, Лелявская ВН, Сун И Таль (2017) Актуальные в селекционном процессе гены устойчивости к пирикулярриозу риса в условиях Приморского края. *Успехи современной биологии* 2(10):26–28
- ФГБУ «Госсорткомиссия». Сорта растений, включенные в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. URL: <https://reestr.gossort.com/reestr/l/15> (01.03.2019)
- Чайка АК, Ковалевская ВА, Корляков АС (2004) Проблемы и пути развития рисосеяния дальневосточного региона. Проблемы и перспективы развития мелиорации,

- водного и лесного хозяйства (к 75-летию Российской академии сельскохозяйственных наук). Сб. науч. трудов. М. 317–324
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25(22):44692–44693
- Dai X, Yan Y, Zhou L et al (2012) Distribution research of blast resistance genes *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-9* and *Pi-km* in blast-resistant rice resources. *Life Sci Res* 16(4):340–356. <http://www.doi.org/10.16605/j.cnki.1007-7847.2012.04.009>
- Dean R, Jan AL, Van Kan et al (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 14(4):414–430. <https://www.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00822.x>
- Integrated Rice Science Database. URL: <http://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/gene/detail/947> (30.08.2018)
- Ma J-T, Zhang G-M, Xin A-H et al (2015) Comparison of pathogenicity of *Pyricularia oryzae* under different genetic backgrounds. *Acta agronom sin* 41(12):1791–1801. <http://www.doi.org/10.3724/SP.J.1006.2015.01791>
- Ramkumar G, Madhav MS, Rama Devi SJS et al (2014) Nucleotide diversity of *Pi-ta*, a major blast resistance gene and identification of its minimal promoter. *Gene* 546(2):250–256. <https://www.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.001>
- Wang JC, Correll JC, Jia Y (2015) Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays. *Crop prot* 72:132–138. <https://www.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.014>
- Wang JC, Jia Y, Wen JW et al (2013) Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials. *Crop prot* 45:109–116. <https://www.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.020>
- Wang Z, Jia Y, Fjellstrom RG (2004) The relationship between the rice blast resistance genes *Pi-ta* and *Pi-ta²*. *J Zhejiang Wanly Uni* 17(2):91–92

Translation of Russian References

- Chaika AK, Kovalevskaya VA, Korlakov AS (2004) [Problems and ways of development of Far Eastern region rice-growing]. *Problemy i perspektivy razvitiya melioratsii, vodnogo i lesnogo khozyaystva (k 75-letiyu Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk)*. Sб. nauch. trudov [Problems and prospects for the development of land reclamation, water and forestry (to the 75th anniversary of the Russian Academy of Agricultural Sciences). coll. scientific works]. М. 317–324 (In Russian)
- Ilyushko MV, Fisenko PV, Romashova MV et al (2019) [Screening Far Eastern rice varieties to rice blast disease resistance gene *Pi-9*]. *Zashchita i karantin rasteniy* (In press, In Russian)
- Ilyushko MV, Fisenko PF, Sunitskaya TV et al (2017) [Identification of rice blast disease resistance genes in the rice varieties developed with DNA-markers assistance]. *Zernovoe khozyaystvo Rossii* 52(4):41–45 (In Russian)
- Kostylev PI (2017) [Blast resistance genes of rice and their markers (review)] *Zernovoe khozyaystvo Rossii* 49(1-1):34–39 (In Russian)
- Kovalevskaya VA, Lelyavskaya VN, Kovaleva AA (2013) [Rice tolerance to blast in the Primorsky Krai]. *Zashchita i karantin rasteniy* 5:24–26 (In Russian)
- Malakhova NM, Pestereva MV, Kovaleva AA et al (1998) [Rice blast causative agent]. *Zashchita i karantin rasteniy* 1:26 (In Russian)
- Sankin AY, Lelyavskaya VN, Soon I Tal (2017) [Relevant in the selection of varieties resistance genes *Pyricularia* rice in Primorsky Krai] *Biology Bulletin Reviews* 2(10):26–28 (In Russian)
- State register of breeding achievements approved for use. URL: https://reestr.gossort.com/reestr/1/15_01.03.2019

Plant Protection News, 2019, 1(99), p. 36–39

OECD+WoS: 4.01+AM

[http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-36-39](http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-36-39)

Full-text article

IDENTIFICATION OF THE *PI-TA²* RESISTANCE GENE IN RICE COLLECTION SPECIMENS AND FAR EASTERN RICE VARIETIES BY MOLECULAR MARKING

M.V. Ilyushko^{1*}, M.V. Romashova¹, P.V. Fisenko¹, T.V. Sunitskaya¹, S.S. Guchenko¹, V.N. Lelyavskaya²

¹Federal Scientific Center of Agrobiotechnology of the Far East named A.K. Chaika, Ussurisk, Russia

²Far Eastern Scientific Research Institute of Plant Protection, Kamen-Rybolov, Russia

* corresponding author, e-mail: ilyushkoiris@mail.ru

Rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Hebert Barr.)) is a serious limiting factor in obtaining the consistently high yields of rice in Primorsky Krai. The use of resistant varieties is considered as one of the most effective ways to protect plants from the disease. The most important genes in the selection for resistance to *P. oryzae* in Primorsky Krai are *Pi-9*, *Pi-ta²*, *Pi-12(t)*, and *Pi-zt*. In this study we aimed to identify the rice resistance gene *Pi-ta²* using molecular genetic marker in Far Eastern rice varieties and collection samples of Chinese and Korean origin. As a result, the *Pi-ta²* gene was found in the Rassvet, Dolinniy and Lugovoy varieties. The Dubrava variety turned out to be polymorphic for the presence of this gene, since it was derived by the selection method from the Chinese variety mixture. Seven out of 30 Chinese collection samples and 14 out of the 21 Korean selection samples carried the *Pi-ta²* gene. This gene was not found in the Far Eastern rice varieties. The combination of the *Pi-9+Pi-ta²* genes provides absolute resistance of rice to *P. oryzae*. Thus, the next step in the selection for resistance to pathogens is searching for the rice variety samples with the *Pi-9* gene, followed by the introgression of this gene into the varieties carrying the *Pi-ta²* gene.

Key words: *Oryza sativa*, rice blast disease, *Pi-ta²*, molecular marker

Received: 25.12.2018

Accepted: 25.01.2019