

УДК: 633. 18:632. 488.42:575

UDK: 633. 18:632. 488.42:575

**СОЗДАНИЕ ВНУТРИГЕННЫХ  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ РИСА ДЛЯ  
ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
СЕЛЕКЦИОННОГО И СЕМЕНОВОДЧЕСКОГО  
ПРОЦЕССОВ**

**DEVELOPING OF INSIDE GENE  
MOLECULAR MARKERS OF RICE FOR  
INCREASING OF BREEDING AND SEED  
PRODUCTION PROCESSES EFFICIENCY**

Мухина Жанна Михайловна  
к.б.н., доцент

*ФГОУ «Региональный институт агробизнеса»,  
Краснодар, Россия*

Mukhina Zhanna Mikhailovna  
Cand.Biol.Sci., associate professor

*Regional Institute of Agribusiness, Krasnodar, Russia*

Токмаков Сергей Вячеславович  
аспирант

Tokmakov Sergey Vacheslavovich  
postgraduate student

Мягких Юлия Александровна  
к.б.н.

Myagkikh Uylia Aleksandrovna  
Cand.Biol.Sci.

Дубина Елена Викторовна  
к.б.н.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский  
институт риса, п.Белозерный, Краснодар, Россия*

Dubina Elena Viktorovna  
Cand.Biol.Sci.

*All-Russian Rice Research Institute, Belozerniy,  
Krasnodar, Russia*

Созданы и проверены на эффективность  
внутригенные маркеры для идентификации  
аллельного состояния селекционно-важных генов  
риса: Pi-ta - устойчивость к пирикулярриозу риса; Rc –  
красная окраска перикарпа

Molecular markers for allele identification of  
breeding important rice genes Pi-ta (blast resistance)  
and Rc (red pericarp) have been created. Their  
efficiency is also checked

Ключевые слова: РИС, ПИРИКУЛЯРИОЗ РИСА,  
КРАСНОЗЁРНСТЬ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

Keywords: RICE, BLAST, RED PERICARP,  
MOLECULAR MARKERS

Рис является одной из трёх важнейших продовольственных культур. По данным Департамента сельского хозяйства США (World Agricultural Supply and Demand Estimates, September 10, 2010), за 2009/10 год валовой сбор риса в мире составил 441,15 миллионов тон. Это основной продукт питания 2,5 млрд. человек в Азии и сотен миллионов людей на остальных континентах [1].

Ежегодно в мире районируются сотни новых сортов риса, обладающих рядом ценных признаков: устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам; высокая урожайность, хорошее качество зерна и т.д.

Применение современных методов молекулярного маркирования в значительной степени ускоряет этот процесс, позволяя контролировать интересующие селекционера гены в растениях гибридных популяций и т.д., не прибегая к их фенотипической оценке по изучаемому признаку которая, зачастую, технически сложна и трудоемка.

В этой связи целью данного исследования было создание и проверка эффективности внутригенных маркеров для идентификации аллельного состояния селекционно важных генов риса:

- *Pi-ta* (определяет расоспецифическую устойчивость к пирикулярриозу; ген является эффективным в краснодарской зоне рисосеяния);

- *Rc* (красная окраска перикарпа). Ранняя диагностика доминантной аллели гена (до наступления стадии выметывания) крайне желательна в первичных звеньях семеноводства риса для элиминации красnozерных форм, засоряющих посевы риса.

**Методика исследований.** Для разработки и дизайна праймеров при создании внутригенного аллельспецифичного ДНК-маркера к гену *Rc* были использованы нуклеотидные последовательности аллелей гена, взятые из базы данных [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) (номера в базе данных DQ204735, DQ204736, DQ204737 и DQ204738).

Проверка эффективности созданного маркера проводилась на контрастных по изучаемому признаку сортах риса: красnozёрных - Рубин, Карат, белозёрных - Хазар, Талисман, Снежинка; а также на белозёрных сортах и их так называемых «красnozёрных фенотипах» – Павловский, Спринт, Виктория, Соната, Привольный, Кубань-3. Все образцы являются материалом рабочей коллекции и предоставлены лабораторией исходного материала ВНИИ риса.

Полевую апробацию маркера проводили на растительном материале питомника испытания потомств первого года (ПИП-1)

лаборатории семеноводства и семеноведения ВНИИ риса: 390 «семей» сорта Атлант, 98 «семей» сорта Ренар, 654 «семей» сорта Флагман, итого – 1142 «семей».

Под «семьей» в ПИП-1 понимается потомство одного растения. Каждая семья состоит из 120 растений, выросших из семян, собранных с одной метёлки. Каждая семья соответствует одному ряду в деланке. Таким образом, в ходе полевого эксперимента было изучено 137040 растений.

Проведение ПЦР-анализа выполняли в три этапа: выделение ДНК; ПЦР и визуализация продуктов амплификации (электрофорез).

Для выделения ДНК из образцов растений использовали бесхлорофилльные семидневные проростки, получаемые путем инкубации во влажной камере: в стерильной чашке Петри, на увлажненной стерильной фильтровальной бумаге, в темноте, при температуре 25°C. Экстракцию ДНК проводили, используя СТАВ-метод [2].

При создании внутригенного маркера к гену **Rc** ПЦР проводилась наборами для проведения ПЦР (компания Сибэнзим, г. Москва, Россия) в реакционном объеме 25 мкл смеси: 10 нг геномной ДНК, 1X ПЦР буфер (20мМ Трис-HCl, pH 8,4, 50мМ KCl), 0,1мМ каждого dNTP и 1 ед. Taq-полимеразы.

Параметры ПЦР: начальная денатурация ДНК при 94°C - 4 минуты; далее 30 циклов: 30 сек. денатурация - 94°C, 30 сек. отжиг праймеров - 62°C, 30 сек. элонгация - 72°C; далее последний цикл синтеза 8 мин - 72°C.

При проверке эффективности внутригенного ко-доминантного ДНК маркера для гена устойчивости к пирикуляриозу риса **Pi-ta** использовали сорта K1 (положительный контроль) и сорта Nirponbare (отрицательный контроль).

При проведении амплификации состав ПЦР-смеси: 10 нг ДНК, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM дезокситуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 1X ПЦР буфер (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1% Тритон X-100, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>),

0,25 единицы 5u Taq-полимеразы, а также 0,23μМ каждого праймера, в общем объеме 25мкл.

Параметры ПЦР: начальная денатурация ДНК при 94 °С - 5 минут, следующие 30 циклов: 30 секунд отжиг праймеров при 65 °С; 30 секунд элонгация при 72 °С; 15 секунд денатурация при 94 °С; последний цикл синтеза 5 минут при 72 °С.

В обоих экспериментах ПЦР была проведена в амплификаторе «Терцик» производства НПО «ДНК-технологии», Россия.

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР созданных в рамках данного исследования маркеров использовали 8% полиакриламидный, а также 2% агарозный гели (визуализация бромистым этидием).

**Результаты исследований.** Ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* секвенирован. Он расположен в области центромеры 12-той хромосомы [3]. Доминантная и рецессивная аллели этого гена отличаются одной аминокислотной заменой кодируемого геном белка: в положении 918 серина на аланин. Это обуславливает наличие двух аллелей данного гена:  $Pi-ta^-$  и  $Pi-ta^+$  [4].

Как указывалось выше, в ряде селекционных программ, в частности, на устойчивость риса к пирикулярриозу, важно контролировать аллельное состояние переносимого донорного гена в гибридном потомстве, т. е. идентифицировать как доминантную, так и рецессивную аллели.

Ниже описана схема поисковой работы, выполненной при создании маркера.

Для выполнения дизайна праймеров использовали нуклеотидные последовательности доминантной (источник - сорт Yashiro-mochi) и рецессивной (источник - сорт Tsuyake) аллелей гена *Pi-ta*. Их номера в базе данных [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) - AF207842 и AY196754, соответственно.

Было проведено сравнение полученных нуклеотидных последовательностей доминантной и рецессивной аллелей гена Pi-ta с использованием алгоритма «multiple alignment» в программе CLUSTALW.

В результате был выявлен участок гена с единичной нуклеотидной заменой у контрастных по изучаемому гену сортов (рис. 1).

СТТСТАТСТТТАССТ**GCT**АТГСАТСТТСААССТГАС  
СТТСТАТСТТТАССТ**TCT**АТГСАТСТТСААССТГАС

Рисунок 1. Точка полиморфизма гена Pi-ta у сортов риса, несущих доминантную (внизу) и рецессивную (вверху) аллели гена

Затем был выполнен дизайн двух праймерных пар таким образом, что в каждой паре праймеров один из них является специфичным для конкретной аллели. Указанные праймеры имеют в своей последовательности один общий олигонуклеотид – точку единичной нуклеотидной замены, но синтез специфичных ПЦР-продуктов идет в разных направлениях.

Два другие праймера (R1 и F2) подобраны с помощью программы Vektor 3.0, с точки зрения методического удобства, чтобы исключить возможность амплификации неспецифичных зон ДНК.

Чтобы исключить возможность амплификации неспецифичных зон ДНК с помощью созданных праймеров, был проведен поиск в системе BLAST базы данных [www.gramene.org](http://www.gramene.org). В качестве запроса поиска использовали нуклеотидные последовательности указанных праймеров.

Нуклеотидная последовательность праймерных пар созданного нами кодоминантного маркера гена Pi-ta представлена в таблице 1.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для идентификации доминантной и рецессивной аллелей гена Pi-ta

| Нуклеотидная последовательность праймерных пар |                           |
|------------------------------------------------|---------------------------|
| F1                                             | GCCGTGGCTTCTATCTTTACCTG   |
| R1                                             | ATCCAAGTGTTAGGGCCAACATTC  |
| F2                                             | TTGACACTCTCAAAGGACTGGGAT  |
| R2                                             | TCAAGTCAGGTTGAAGATGCATAGA |

На рисунке 2 проиллюстрирована апробация маркера. На электрофореграмме четко видно различие аллельной миграции в исследуемом локусе у контрастных по данному гену сортов: у сорта K1 (положительный контроль) и сорта Nipponbare (отрицательный контроль). Размер ПЦР-продукта у сортов с устойчивой аллелью гена составляет 270 п.н.; у сортов с восприимчивой аллелью – 563 п.н. Кроме того, очевидно, что доминантной аллелью гена обладает также сорт IR36. Остальные исследованные сорта несут рецессивную аллель гена.

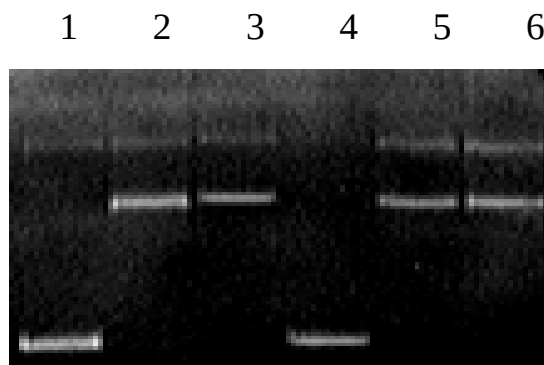


Рисунок 2. Проверка эффективности кодоминантного маркера для идентификации аллельного состояния гена Pi-ta ПЦР-методом.

1 – сорт K1 (положительный контроль), 2 – сорт Nipponbare (отрицательный контроль), 3 – сорт Виктория, 4 – сорт IR-36, 5 – сорт Toride, 6 - сорт Ou 244.

Таким образом, созданный маркер эффективен для выявления доноров гена *Pi-ta*, что позволяет проводить массовый скрининг коллекционных образцов.

При создании внутригенного маркера гена **Rc** использовали аналогичную схему, используя в качестве контрастных аллели гена:

- Rc (красный и коричневый перикарп),
- Rc-s (розовый перикарп)
- rc (неокрашенный перикарп).

При этом была локализована функциональная делеция из 14 пар оснований (п.о.) аллели **rc** белозёрного риса – ACGCGAAAAGTCGG (рис. 3):

|            |                               |                                                                     |     |
|------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| коричневый | TAC...N <sub>(5104)</sub> ... | AAAGGCGCAAGTGGAAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAG...N <sub>(1211)</sub> ... | TAA |
| красный    | TAC...N <sub>(5060)</sub> ... | AAAGGCGCAAGTGGAAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAG...N <sub>(1221)</sub> ... | TAA |
| розовый    | TAC...N <sub>(5061)</sub> ... | AAAGGCGCAAGTGGAAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAG...N <sub>(1215)</sub> ... | TAA |
| белый      | TAC...N <sub>(5105)</sub> ... | AAAGGCGCAAGTGGA-----TGCCATCCAAG...N <sub>(1213)</sub> ...           | TAA |
| ***        | *****                         | 14 п.о.                                                             | *** |

Рисунок 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей аллелей Rc (красный и коричневый перикарп), Rc-s (розовый перикарп) и rc (неокрашенный перикарп).

Затем были сконструированы две праймерные пары:

- 1) F1 – GCAAGTGGAAACGCGAAAAGT;
- 2) R1 – TTCCAATGTTTCGTTAGAGGC;
- 3) F2 – ACAACACTGACACTGAAAGG;
- 4) R2 – GAAATCACCTTGGATGGCATCC.

Полученные праймеры были проверены на отсутствие комплементарности между 3'-концами, чтобы исключить образование праймер-димеров, и отсутствие внутренних вторичных структур (шпилек).

В случае постановки ПЦР с обеими праймерными парами (F1- R1 и F2- R2) и с ДНК краснозёрного гетерозиготного растения (Rcrc), либо со смесью ДНК красно- и белозёрных образцов образуется два продукта

ПЦР-реакции разной длины, которые визуализируются в виде двух «бэндов» на электрофореграмме. Во всех остальных случаях образуется один продукт ПЦР-реакции. Таким образом, созданный маркер носит кодоминантный характер наследования.

Была проведена проверка эффективности созданного молекулярного маркера на отечественных сортообразцах риса, контрастных по изучаемому признаку. Результаты представлены на рисунке 4.

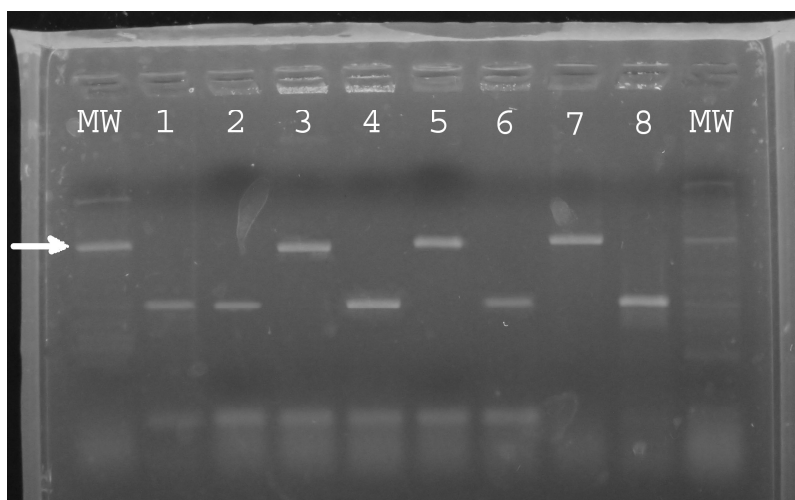


Рисунок 4. Аллельные различия гена **Rc** у краснозерных и белозерных сортообразцов риса.

Примечание: 1 – Карат, 2 – Рубин, 4 – Павловский-Red, 6 – Спринт-Red, 8 – Привольный-Red (краснозёрные); 3 – Хазар, 5 – Павловский, 7 – Спринт (белозёрные); «MW» - маркер молекулярного веса; фрагмент, на который указывает стрелка, соответствует 800 п.о.

Таким образом, из рисунка видно, что созданный маркер позволяет чётко различать аллельные состояния гена **Rc** – доминантное (краснозёрность) и рецессивное (белозёрность).

Для выявления возможности применения созданного маркера для скрининга большого количества растений (питомник испытаний потомств первого года, ПИП-1, первичных звеньев семеноводства) был также

поставлен эксперимент с целью определения чувствительности созданного маркера при идентификации доминантной аллели гена Rc в смеси ДНК контрастных по изучаемому признаку сортов риса (рис. 5).

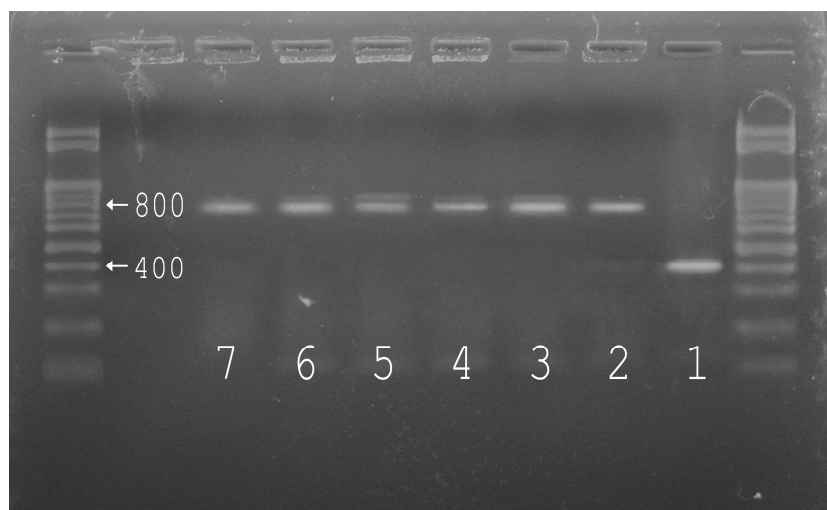


Рисунок 5. Определение чувствительности праймеров F1R1 и F2R2 при идентификации доминантной аллели гена Rc в смеси ДНК контрастных по изучаемому признаку сортов риса.

Примечание: 1–контроль – краснозёрный сорт Карат; 2 – смесь ДНК Карат/Павловский (белозёрный) в соотношении 1:50; 3 – смесь ДНК Карат/Павловский в соотнош. 1:100; 4 – смесь ДНК Карат/Павловский в соотнош. 1:200; 5 – смесь ДНК Карат/Павловский в соотнош. 1:500; 6 – смесь ДНК Карат/Павловский в соотнош. 1:1000; 7 – контроль – Павловский; фрагменты маркера молекулярного веса размером 400 и 800 п.о. обозначены соответствующими цифрами.

Из рисунка видно, что при соотношении ДНК краснозёрного риса к ДНК белозёрного вплоть до 1:200 ПЦР-продукт чётко визуализировался в виде различного «бэнда» на агарозном геле. При разведении 1:500 с уверенностью о наличии «бэнда» сказать уже сложно, а при разведении 1:1000 – он явно отсутствует.

В результате полевого опыта, проведенного в питомнике испытания потомств первого года (ПИП-1) сортов Атлант, Ренар и Флагман, ни в

одной из изученных «семей» не было обнаружено доминантной аллели гена Rc.

Результаты проведенного исследования наглядно демонстрируют эффективность методов молекулярного маркирования для практических целей селекции и семеноводства.

#### **Список литературы**

1. Ляховкин, А.Г., 2005. Рис. Мировое производство и генофонд. 2-е изд., перераб. и доп. -СПб.: «профи-информ», 288 с.
2. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research.- 1980.- V.10.- P. 4321-4325.
3. Kiyosawa S. Gene analysis for blast resistance // Oryza.- 1981.-V. 18.- P.196-203.
4. Orbach M. J. Farrall L., Sweigard J.A., Forrest G.Ch., Valent B. A telomeric Avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. – 2000. - The Plant Cell, - Vol. 12. – P. 2021-2032