

УДК: 633. 18:632. 488.42:575

UDK: 633. 18:632. 488.42:575

**ИНТРОГРЕССИЯ ГЕНОВ PI-TA, PI-B, PI-Z
В ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ СОРТ РИСА
«СНЕЖИНКА» С ПРИМЕНЕНИЕМ
МЕТОДОВ МАРКЕРНОЙ СЕЛЕКЦИИ**

**INTROGRESSION OF GENE OF PI-TA, PI-B, PI-Z
INTO SNEZHINKA RUSSIAN RICE VARIETY,
WITH USE OF METHODS OF MOLECULAR
MARKING**

Дубина Елена Викторовна
к.б.н., старший научный сотрудник
*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт риса, п.Белозёрный, Краснодар, Россия*

Dubina Elena Viktorovna
Cand.Biol.Sci., senior scientific worker
*All Russian Rice Research Institute, Belozerny,
Krasnodar, Russia*

Мухина Жанна Михайловна
к.б.н., доцент
*ФГОУ «Региональный институт агробизнеса»,
Краснодар, Россия*

Mukhina Zhanna Mikhailovna
Cand.Biol.Sci., senior scientific worker
Regional Institute of Agrobusiness, Krasnodar, Russia

Проведена интрогрессия эффективных генов расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу Pi-ta, Pi-b, Pi-z в генотип отечественного сорта риса методом возвратных скрещиваний с маркерным контролем донорных аллелей. Среди растений BC₃ отобраны формы, максимально приближенные к рекуррентной родительской форме, с коротким вегетационным периодом и хорошей фертильностью метелки. Маркерный анализ полученной популяции выявил образцы, несущие целевые гены в гомозиготном состоянии

The introgression of race-specific blast resistance genes Pi-ta, Pi-b, Pi-z into genotype of Russian rice variety has been performed by backcross method with marker control of donor alleles. Plants that demonstrated maximal similarity with recurrent parental form, the short vegetation period and abundant panicle fertility have been picked up from BC₃-population. Marker analysis of developed population revealed the samples carrying introduced target genes in homozygote state

Ключевые слова: РИС, ПИРИКУЛЯРИОЗ РИСА, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ, ПИРАМИДИРОВАНИЕ ГЕНОВ

Keywords: RICE, RICE BLAST DISEASE, MICRO SATELLITE MARKERS, MOLECULAR MARKING, PYRAMIDING GENES

Одним из опасных заболеваний риса во всем мире, в том числе и России, является пирикулярриоз, вызываемый несовершенным грибом *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (*Pyricularia oryzae* Cavara (L.)). Патоген поражает все надземные органы растения, что приводит к потере урожая на 30-60%, а в годы эпифитотий - на 80-100%. В зависимости от характера поражения различают листовую, узловую и метельчатую формы болезни. Патоген вызывает отмирание пораженных тканей, на листьях образуются некрозы в виде пятен. На узлах стеблей, ножках и веточках метелок - опоясывающие коричневые или черные пятна. Стебли наклоняются, надламываются, прекращается доступ

питательных веществ в метелку (рис.1). Выход крупы из зерна зараженных растений уменьшается на 25-30 % [1].

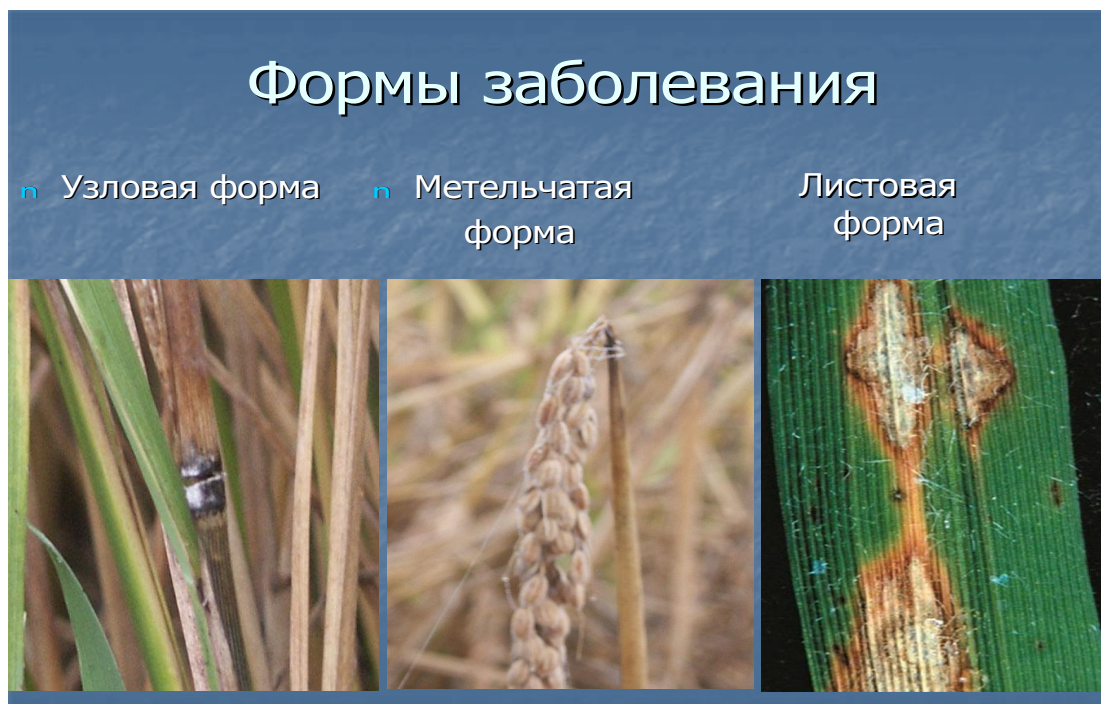


Рисунок 1. Формы заболевания риса, вызываемые фитопатогенным грибом *Magnaporthe grisea* (Herbert)

Применение химических средств защиты от этого заболевания увеличивает себестоимость продукции и пагубно сказывается на экологическом фоне в зонах возделывания риса, к тому же у многих хозяйств недостаточно средств для их использования. Исходя из этого, наиболее перспективные методы борьбы с пирикуляриозом - это создание «иммунных сортов» и быстрое внедрение их в производство. Устойчивые к пирикуляриозу сорта риса позволяют увеличить урожайность и валовые сборы зерна риса, избежать эпифитотий развития болезни. Применение современных биотехнологических приемов (молекулярное маркирование) в значительной степени ускоряет селекционный процесс и повышает его эффективность.

Цель работы - получить селекционный материал риса с пирамидированными эффективными генами расоспецифической устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta*, *Pi-z*, *Pi-b* с использованием метода молекулярного маркирования.

Существует несколько стратегий селекции на устойчивость к пирикуляриозу. Введение генов устойчивости в элитные сорта, адаптированные к конкретным условиям выращивания, как и объединение (пирамидирование) в одном генотипе нескольких генов устойчивости к пирикуляриозу, являются одними из наиболее перспективных путей для селекции устойчивых к патогену сортов.

По многолетним данным фитопатологов, для зоны возделывания риса в Краснодарском крае эффективными являются гены расоспецифической устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* [1].

Гены расоспецифической устойчивости к патогену *Pi-ta*, *Pi-b* у риса секвенированы. Ген *Pi-ta* расположен в области центромеры 12-той хромосомы; ген *Pi-b* - на дистальном конце длинного плеча хромосомы 2; ген *Pi-z* - в области центромеры 6-той хромосомы [4].

Применение биотехнологических методов, а именно ДНК-маркирование, предлагает новые решения для получения и сохранения устойчивых генотипов риса. Основное отличие селекции с применением молекулярных маркеров в том, что оценка и отбор селекционного материала производится непосредственно по генотипу, на основе данных молекулярного анализа, что позволяет обнаружить присутствие гена, отвечающего за селективируемый признак, задолго до его фенотипического проявления, что в итоге значительно сокращает время и объемы работ.

Методика исследований. В работе по введению генов устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* в генотип отечественного сорта риса

Снежинка (рекуррентная родительская форма), в качестве доноров переносимых генов использованы сорта IR-36, BL-1 и Maratelli, соответственно.

Гибридизацию проводили с использованием техники пневмокастрации, в результате которой удаляются пыльники у материнских растений.

Опыление проводили «твелл»-методом. Суть метода: перед опылением срезают верхнюю часть изолятора, вводят в него одну - две метелки отцовской формы и несколько раз энергично вращают их. После опыления верхнюю часть изолятора закрепляют.

Образцы ДНК выделяли из свежесрезанной части листовой пластинки гибридных растений на стадии 4-5 листьев. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 1М Tris-HCl (pH 7.5), 5М NaCl, 0.5М EDTA (pH 8.0), 10% SDS. Часть листа (2-3см) растирали в 500 мкл экстагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5мл [3].

Инкубировали образцы при 60°C в течение 3 часов. Отделяли супернатант центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 500 мкл изопропанола, оставляли на 10 минут, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 300мкл 70% этанола, высушивали и растворяли в 50мкл 0,1*TE. В ПЦР смесь добавляли по 3 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом.

Для контроля наличия в экспериментальных растениях доминантных аллелей донорных генов *Pi-ta*, *Pi-z*, *Pi-b* применяли внутригенные, а также тесно сцепленные с целевыми генами ПЦР-маркеры (табл.1, 2, 3).

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

Праймер	Сиквенс праймера
F1	GCC GTG GCT TCT ATC TTTA CCT G
R1	ATC CAA GTG TTA GGG CCA ACA TTC
F2	TTG ACA CTC TCA AAG GAC TGG GAT
R2	TCA AGT CAG GTT GAA GAT GCA TAG A

Параметры ПЦР для ко-доминантного маркера гена *Pi-ta*:

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.

При выполнении ПЦР-анализа, связанного с контролем переноса гена *Pi-ta* полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с 40-50 нг ДНК в конечном объеме 25 мкл. В пробирку последовательно добавляется: 8,7 мкл спец. дистиллированной воды; 2,5 мкл буфера Таq полимеразы; 2,5 мкл трифосфата (0,5 мμ); по 2мкл прямого и обратного праймеров; 1 единицу Таq полимеразы; 3 мкл выделенной ДНК. В пробирки с реакционной смесью добавляли минеральное масло для предотвращения испарения жидкости. Процесс осуществляли в амплификаторе «Терцик».

Таблица 2- Нуклеотидная последовательность праймеров для идентификации доминантной и рецессивной аллелей, гена *Pi-b*:

Праймер	Сиквенс праймера
F1	GAA CAG CTT GCT CGG AAT CCA
R2	TAC TGC ATT GTG CAG CTT GTG
R3	ATA CAT CGA CCA GCT ATT TGC C
F4	CAT CAA CGA AGT CCA GCT CA
R5	CCG CGC TAT CTT GTA CAT TC

R6	CTC AGC ATA TGT GGC AGC TC
----	----------------------------

Указанные праймеры могут быть использованы в нескольких комбинациях, каждая комбинация должна включать в себя один прямой праймер (F1, F4) и два обратных (R2+ R3, R5+ R6).

Аmplификацию проводили наборами для проведения ПЦР в реакционном объеме 25 мкл. В пробирку последовательно добавляется: 10,7 мкл спец. дистиллированной воды; 2,5 мкл буфера Taq полимеразы; 2,5 мкл трифосфата (0,5 мμ); по 2мкл прямого и обратного праймеров; 1 единицу Taq полимеразы; 3 мкл выделенной ДНК.

Параметры ПЦР:

начальная денатурация ДНК при 94 °С - 5 минут,
 следующие 35 циклов: 30 секунд денатурация при 94 °С; 30 секунд отжиг праймеров при 60 °С; 35 секунд элонгация при 72 °С; последний цикл синтеза 3 минуты при 72 °С.

Таблица 3- Нуклеотидная последовательность ПЦР-маркера z60510Piz, входящих в состав ДНК-маркерной системы идентификации гена *Pi-z*

Праймер	Сиквенс праймера
z60510Piz пр1	GGAGTTGGTGCG ACGGTGCCGTTAT
z60510Piz пр2	GGAGTTGGTGCG ACGGTGCCGTTAC
z60510Piz об	GCGCGGACCGGC CAGCTAGTTGAC

Параметры ПЦР для ДНК-маркера z60510Piz гена *Pi-z*:

начальная денатурация ДНК при 94 °С - 5 минут

следующие 35 циклов: 1 минута денатурация при 94 °С; 1 минута отжиг праймеров при 60 °С; 1 минута элонгация при 72 °С; последний цикл синтеза 10 минут при 72 °С.

Аmplификация микросателлитных последовательностей проводится наборами для проведения ПЦР в реакционном объеме 25 мкл. В пробирку последовательно добавляется: 10,7 мкл спец. дистиллированной воды; 2,5 мкл буфера Taq полимеразы; 2,5 мкл трифосфата (0,5 мМ); по 2 мкл прямого и обратного праймеров; 1 единицу Taq полимеразы; 3 мкл выделенной ДНК.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 8% акриламидном геле на основе 1*ТВЕ буфера и визуализировали в ультрафиолетовом свете, предварительно окрашивая 1%-м раствором бромистого этидия.

Растения выращивали в вегетационных сосудах на вегетационной площадке и в камерах искусственного климата с учетом продолжительности фаз вегетационного периода.

Результаты исследований. Для создания линий риса, несущих гены *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z*, и адаптированных к местным условиям рисосеяния, проведена программа возвратных скрещиваний с маркерным контролем целевых генов.

Параллельно проводилось скрещивание отечественного районированного сорта риса Снежинка (материнская форма) с сортами-донорами указанных генов устойчивости *IR-36*, *BL-1*, *Maratelli*. В результате гибридизации каждой комбинации получено F₁ поколение.

Полученное F₁ потомство задействовали в возвратных скрещиваниях с рекуррентной родительской формой (русским сортом риса Снежинка). Из растений BC₁F₁-популяции были выделены образцы ДНК, которые оценили на наличие переносимых аллелей методом ПЦР с помощью внутригенных молекулярных маркеров на гены *Pi-ta*, *Pi-b* и

микросателлитных маркеров, тесно сцепленных с геном *Pi-z* [2]. Отобранные по молекулярным данным гибриды, несущие донорные аллели устойчивости к пирикуляриозу, использовали в последующем рекуррентном скрещивании. Серия возвратных скрещиваний обеспечит введение донорных аллелей в генотип рекуррентной родительской формы – сорт Снежинка. Каждый этап селекционной программы контролируется ДНК - маркерами. Растения, в генотипе которых аллели устойчивости не обнаружены, выбраковываются.

Для перевода донорных аллелей в гомозиготное состояние отобранные растения ВС-популяций самоопыляли (рис. 2).

На рисунке 2 представлены результаты исследования внутригенным маркером гена *Pi-ta* ВС₃F₁-растений комбинации скрещивания IR-36×Снежинка. На электрофореграммах четко читаются материнская и донорная аллели.

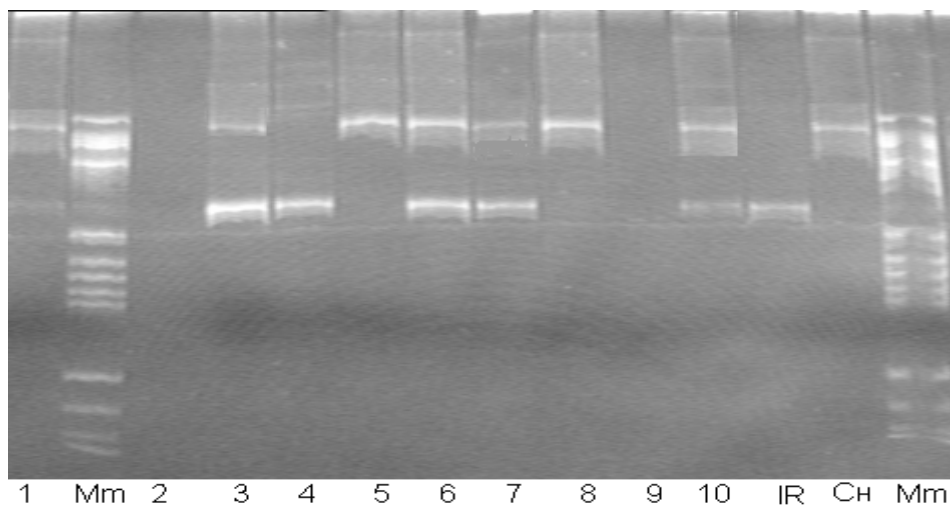


Рисунок 2. Аллельная миграция в локусе *Pi-ta* у ВС₃F₁-растений комбинации скрещивания IR-36×Снежинка.

Примечание: Mm- маркер молекулярного веса; IR –IR-36 – линия-донор на ген *Pi-ta*; Сн- Снежинка – сорт-реципиент; 1 – 10 – анализируемые ВС-растения.

Видно, что на рисунке 2 растения под номерами 5, 8 несут только аллель, унаследованную от материнской формы - сорта

Снежинка. Образцы 1, 3, , 6, 7, 10 являются гетерозиготами. Растение № 4 унаследовало аллель только от IR-36, т.е. несут донорную аллель в гомозиготном состоянии.

На рисунке 3 представлены результаты ПЦР- анализа растений ВС3F1 комбинации скрещивания сортов Maratelli × Снежинка.

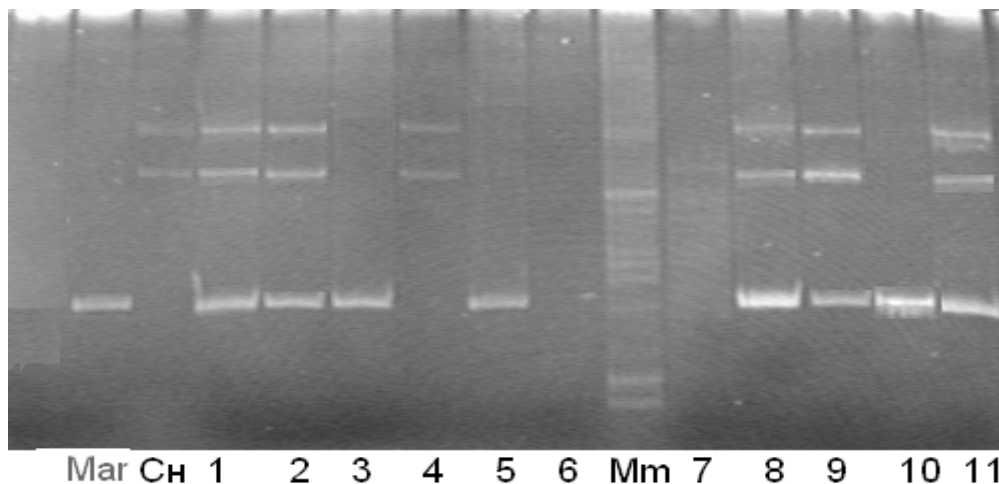


Рисунок 3. Аллельная миграция в локусе *Pi-z* у растений ВС3F – поколения комбинации скрещивания Maratelli × Снежинка

Примечание: Mar-Maratelli-линия-донор на ген *Pi-z*; Сн - Снежинка – сорт-реципиент; 1 - 11 – анализируемые ВС-растения; Mm- маркер молекулярного веса

Из рисунка видно, что растения 1, 2, 8, 9, 11 являются гетерозиготой (несут аллели материнской и отцовской форм); растения 4- несет аллель только материнской формы; растения 3, 5, 10 – гомозиготны по донорной аллели.

На рисунке 4 представлены результаты ПЦР-анализа растений ВС3F1-поколения комбинации скрещивания VL-1 × Снежинка

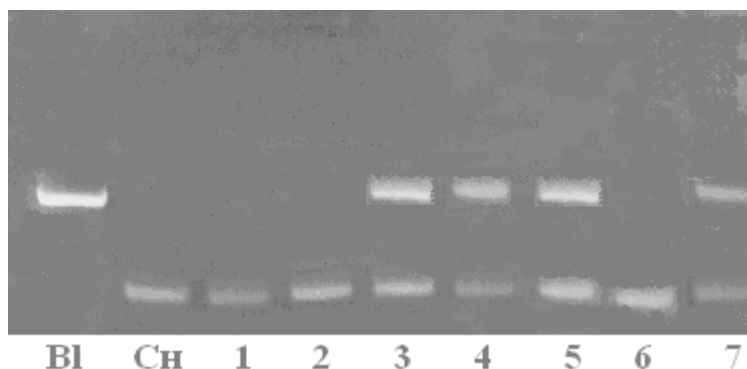


Рисунок 4. Аллельная миграция в локусе *Pi-b* у растений BC₃F₁ комбинации скрещивания VL-1 × Снежинка

Примечание: VI – VL-1 - линия-донор на ген *Pi-b*; Сн - Снежинка – сорт-реципиент; 1 - 7 – анализируемые BC-растения

Из рисунка видно, что растения 3, 4, 5, 7 являются гетерозиготой (несут аллели материнской и отцовской форм) по изучаемому гену; растения № 1, 2, 6 унаследовали аллель изучаемого локуса только от материнской формы.

Начиная с поколения BC₃, дальнейшие возвратные скрещивания не проводили. Известно, что доля генома рекуррентной родительской формы в потомстве BC₃ составляет 93,75 % [5]. Растения, анализ ДНК которых показал присутствие донорных генов, были использованы для получения семян BC₃F₁ поколения. Самоопыление растений риса, гетерозиготных по селективируемым генам, дает возможность перевести приоритетную аллель в гомозиготное состояние.

Работа продолжается.

Заключение. Использование маркерного контроля изучаемых генов в проведенном исследовании позволило сократить селекционную схему создания исходного селекционного материала риса с эффективными генами устойчивости к пирикуляриозу.

Список литературы

1. Дьяков Ю.Т. и др. Общая и молекулярная фитопатология: Учеб. пособие.- М. Изд-во Общество фитопатологов, 2001. - 302 с.

2. Ж.М.Мухина¹, к.б.н., Ю.А.Мягих¹, аспирант, Д.Богомаз² к.б.н., Т.В. Матвеева², к.б.н., С.В.Токмаков¹, аспирант. Создание кодоминантного молекулярного ПЦР-маркера для идентификации гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу риса Pita/Рисоводство.-2008. - №7.-с. 3-4.

3. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA/ Murray M.G., Thompson Genomt.- V. 40.-p. 379-378.

4. McCouch S.R., Nelson R.G., Tohme J., Zeigler R.S. Mapping of blast resistance genes in rice // Rice blast disease.-1994.- V.1.- P. 167-186.

5. Jena, K.K. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding / Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. // Korean J. Breed.- 2003.- V.35.- P. 133-140.