

УДК 633.18:577.2:57.088

UDC 633.18:577.2:57.088

ОЦЕНКА ЛИНИЙ РИСА С ГЕНАМИ *PI-B*, *PI-Z* И *PI-40* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КРАСНОДАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПИРИКУЛЯРИОЗА (*PIRYCULARIA ORYZA*)¹

ESTIMATION OF RICE HYBRID LINES WITH BLAST RESISTANCE GENES *PI-B*, *PI-Z* AND *PI-40* FOR RESISTANCE TO RICE BLAST (*PIRYCULARIA ORYZA*) ISOLATES, COLLECTED IN THE KRASNODAR TERRITORY

Супрун Иван Иванович
к.б.н., с.н.с.

Suprun Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci. senior staff scientist

Харченко Елена Семеновна
с.н.с.

Харченко Елена Семеновна
senior staff scientist

Серая Лидия Ивановна
с.н.с.

Серая Лидия Ивановна
senior staff scientist

Ковалев Виктор Савельевич
д.с.-х.н. зам. директора института по научной работе
Всероссийский научно-исследовательский институт риса, п. Белозерный, г. Краснодар, Россия. E-mail: vnirice@vnirice.ru

Ковалев Виктор Савельевич
Dr.Sci.Agr., deputy director of science work
All Russian Rice Research Institute, p. Belozerny, Krasnodar, Russia. E-mail: vnirice@vnirice.ru

В результате проведенной работы выполнена оценка селекционных линий риса на устойчивость к Краснодарской популяции возбудителя пирикуляриоза (*Piricularia oryza*). Выявлено, что наибольшей степенью устойчивости обладают линии с геном устойчивости *Pi-40*. Образцы с генами *Pi-z* и *Pi-b* также проявили более высокий уровень устойчивости в сравнении с сортом стандартом Хазар

Estimation of blast resistance of rice breeding lines, carrying resistance genes *Pi-b*, *Pi-z* and *Pi-40* has been done. For phytopathological test isolates of pathogen from Krasnodar territory were used. As the results of the study *Pi-40* gene showed maximal resistance to blast isolates. On the other part, rice line, carrying both genes – *Pib* and *Pi-z* showed significantly higher level of resistance with compare to standart variety Khazar

Ключевые слова: ПИРИКУЛЯРИОЗ, ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ, *Piricularia oryza*, ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

Keywords: RICE BLAST, RESISTANCE GENES, *Piricularia oryza*, PHYTOPATOLOGICAL TESTING

Доминирующее положение, по степени вредоносности в Краснодарском крае занимает пирикуляриоз. Основными причинами распространения и вредоносности этого заболевания являются: использование сортов интенсивного типа, применение повышенных доз азотных удобрений, регуляторов роста, неоправданное увеличение норм высева семян, нарушение приемов технологии возделывания риса.

В системе интегрированной защиты растений от болезней наиболее эффективным элементом является селекция устойчивых сортов,

¹ Работа выполнена при поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 11-04-96596 р_юг_ц

возделывание которых позволяет снизить объем применения пестицидов, загрязняющих окружающую среду, и получить стабильный высококачественный урожай зерна риса. При этом особого внимания, с точки зрения эффективности, заслуживает создание сортов, несущих несколько генов устойчивости к патогену, а также гены широкого спектра устойчивости.

Ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b* является одним из наиболее изученных генов риса.

Впервые ген был открыт Shinoda в 1971 году в сортах риса подвида *indica*. В 1978 году были созданы близкоизогенные линии BL1-BL8 сортов *japonica*, несущие перенесенные из устойчивых форм области хромосомы с геном *Pi-b* [1]. На настоящий момент, данный ген клонирован и установлена его нуклеотидная последовательность [2].

Ранее проводимое фитопатологическое тестирование коллекции ВНИИ риса с целью поиска доноров эффективных генов не выявило образцы риса, несущие ген *Pi-b* [3].

Ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-z*, локализованный в хромосоме 6, был идентифицирован как объединенный в кластер с геном *Pi-zt*, определяемый как *Pi-z* локус. Кроме того, был создан ряд ДНК-маркеров к ним, основанных на полиморфизме единичных нуклеотидных замен (SNP) у доминантных и рецессивных аллелей генов [4].

Ген широкого спектра устойчивости к пирикуляриозу *Pi-40* картирован на коротком плече хромосомы 6. В настоящее время идентифицирована область генома с локализацией данного гена протяженностью 95 тыс. пар оснований. [5].

Линии риса, несущие ген устойчивости *Pi-40* были предоставлены ВНИИриса доктором К.К.Дена (IRRI) в рамках работы международного Консорциума TRRC. Начата программа по интрогрессии данного гена в российскую генплазму риса.

В лаборатории биотехнологии и молекулярной биологии ВНИИриса ведется работа по интрогрессии генов устойчивости *Pi-b*, *Pi-z* в российскую генплазму риса с применением ДНК-маркерной технологии. Донорами указанных генов послужили сорта BL1 и Zenit, соответственно. На основании данных о нуклеотидных последовательностях гена *Pi-b* создан ДНК-маркер к нему, который используется для ДНК-идентификации гена в селекционном материале [6]. Получен ряд ценных селекционных линий, несущих данные гены, в том числе и два гена в одном генотипе. Ряд линий проходит конкурсное сортоиспытание [7].

Немаловажным этапом создания устойчивых к пирикулярриозу сортов является выявление источников устойчивости среди коллекционного материала риса и фитопатологическая оценка создаваемых селекционных образцов. Изучение устойчивости растений к патогену базируется на создании жесткого инфекционного фона и провокационных условий при возделывании культуры. При этом одним из наиболее важных составляющих при проведении фитопатологического тестирования является культура возбудителя заболевания, используемая для создания искусственного инфекционного фона.

Основной целью работы являлось выделение штаммов возбудителя пирикулярриоза из различных рисосеющих районов края и проведение, с их использованием, оценки устойчивости линий риса с генами *Pi-b*, *Pi-z*, *Pi-40*.

Материал и методы исследований

Оценивали устойчивость линии, несущей доминантные аллели генов с *Pi-b* и *Pi-z*, созданной ранее в ходе выполнения программы по их интрогрессии. Данная линия получена после трех циклов самоопыления из гибридной комбинации Хазар/BL₁(BC₄F₃) × Хазар/Zenit (BC₃F₂). Кроме того, оценивали устойчивость линий, несущих ген широкого спектра

устойчивости к пирикулярриозу *Pi-40*: IR 83243-2-1-24-4-B, IR 83260-1-1-1-5-B, IR 83260-1-1-12-1-B, IR 83260-2-10-5-2-1-B, IR 83260-1-1-7-2-1-4-B.

Инфекционный материал для заражения - синтетическая популяция возбудителя пирикулярриоза. При выделении гриба в чистую культуру применены методы прямого выделения гриба на питательную среду и выделения гриба из поражений с предварительным помещением во влажную камеру [8].

Инокуляцию тестируемых линий проводили в фазы кущение и выметывание – цветение. Для заражения использовали сухой спорный материал, полученный из отобранных штаммов, выращенных на морковно-сахарозной агаризованной среде и свежий (14-ти дневный) инокулюм патогена. Инокуляцию проводили суспензией с титром конидий 30-40 спор в поле зрения микроскопа (увеличение 120 х) с добавлением ПАВ Твин-80. Инокуляцию проводили дважды. Поражаемость растений оценивали через 20 дней после инокуляции по десятибалльной шкале международного института риса, на основании чего подсчитывали общий индекс развития болезни в процентах (ИРБ) [9]. Стандартом послужил сорт селекции ВНИИриса Хазар.

Результаты

С целью наиболее полной оценки селекционного материала на устойчивость к возбудителю пирикулярриоза инокуляция выполнялась с применением так называемой синтетической популяции патогена. Она представляет собой смесь из нескольких штаммов, выделенных в различных рисосеющих районах Краснодарского края и Адыгеи. Сбор образцов пораженного риса проведен в период массового развития болезни. Это позволяет оценить экспериментальные растения на устойчивость к различным, генетически отдаленным штаммам возбудителя. В таблице 1 приведены данные о происхождении штаммов возбудителя пирикулярриоза.

Таблица 1 - Происхождение штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., использованных для заражения образцов риса.

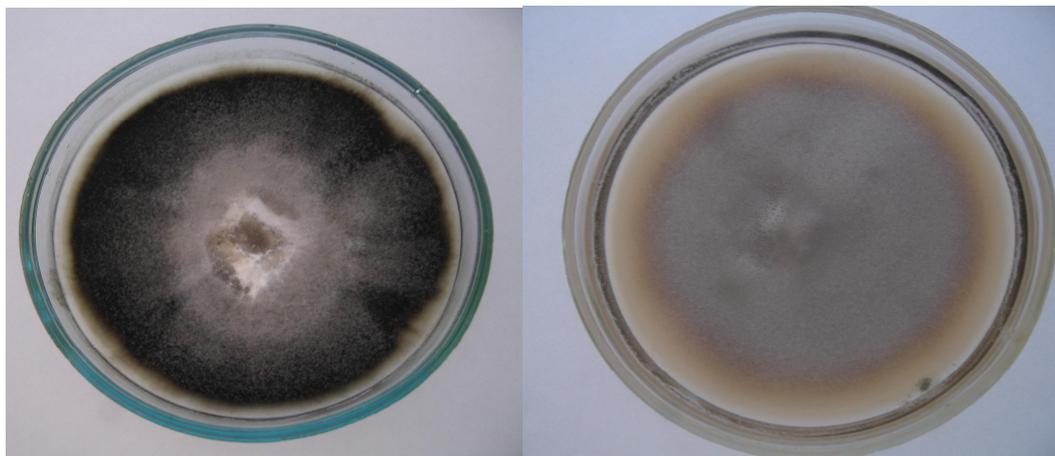
Наименование штамма	Происхождение		Пораженная часть растения
	район выделения	сорт риса	
К-1-10	Красноармейский	Рапан	лист
Б-2-10	ОПО ВНИИ риса	Фишт	узел
С-5-10	Славянский	Рапан	лист
С-7-10	Славянский	Виктория	узел
Кл-3-10	Калининский	Новатор	ножка метелки
КГ-1-10	Адыгея	Шарм	лист

После выделения штаммов патогена в чистую культуру и анализа интенсивности спороношения для дальнейшей работы были отобраны штаммы с различными морфолого-культуральными признаками (табл. 2).

Таблица 2 - Морфолого-культуральные признаки штаммов *Pyricularia oryzae* Cav.

Штамм	Характер роста	Цвет колонии	Цвет субстрата
К-1-10	низкий порошистый с концентрическими зонами	темно-серый	от темно-коричневого до черного
Б-2-10	низкий войлочный	однородный серый	темно-серый
С-5-10	низкий плотный войлочный	однородный светло-серый	серо-коричневый
С-7-10	неоднородный - с войлочным низким порошистым ростом	неоднородный от светло- серого до темно-оливкового	неоднородный - от светло-серого до черного
Кл-3-10	низкий порошистый	неоднородный - от серого до коричневого, в центре - белый	интенсивно черный
КГ-1-10	высокий пушистый	неоднородный - от белого до темно-серого	неоднородный - от темно-серого до бурого

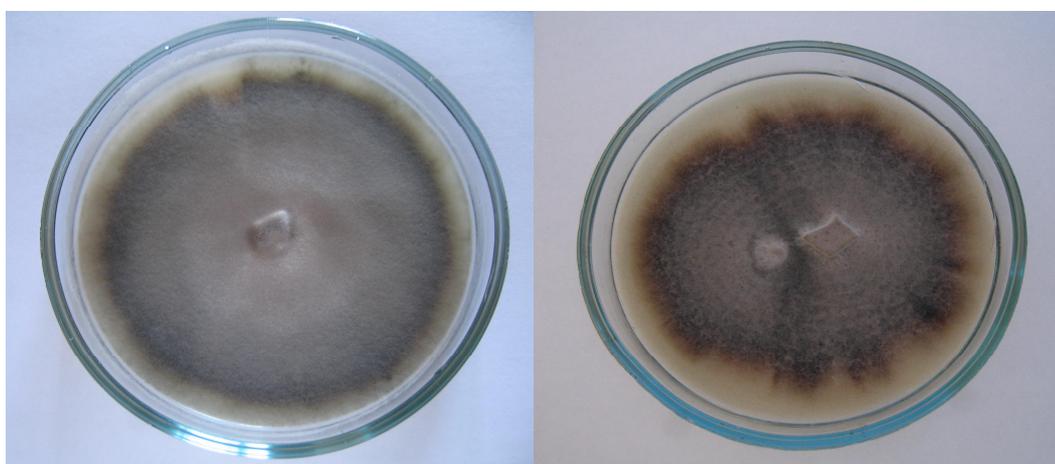
Как видно из таблицы 2, штаммы возбудителя значительно отличались друг от друга по морфолого - культуральным признакам. На рисунках 1 и 2 проиллюстрированы, в качестве примера, культуры штаммов Кл-3-10, С-5-10, Б-2-10 и К-1-10.



А

Б

Рисунок 1. Штаммы Кл-3-10 (А) и С-5-10 (Б)



А

Б

Рисунок 2. Штаммы Б-2-10 (А) и К-1-10 (Б)

Для создания наиболее «жестких» условий при оценке линий в условиях вегетационного опыта инокуляцию проводили дважды. Проявление листовой формы болезни было слабым, в связи с чем,

характеристика устойчивости сортообразцов к пирикулярриозу была дана по проявлению метельчатой формы (таблица 3).

Таблица 3 - Устойчивость сортообразцов к пирикулярриозу на искусственном инфекционном фоне в условиях вегетационного опыта

Сортообразец	Ген устойчивости	Балл поражения	ИРБ, %	Степень устойчивости
IR 83243-2-1-24-4-B	Pi 40	0,1,1,1,2,1,0,0,1,1	8,9	устойчив
Хазар(Pib+Piz)	Pi b, Pi z	1,9,6,8,3,4,0,0,1,4	40,0	среднеустойчив
IR 83260-1-1-1-5-B	Pi 40	1,0,0,1,0,0,1,1,0,1	4,4	устойчив
IR 83260-1-1-12-1-B	Pi 40	0,1,1,0,0,0,1,0,1,1	5,6	устойчив
IR 83260-2-10-5-2-1-B	Pi 40	5,0,1,1,1,1,0,0,0,0	10,0	устойчив
IR 83260-1-1-7-2-1-4-B	Pi 40	3,4,1,2,1,0,0,1,0,0	13,3	устойчив
Хазар	-	9,9,9,5,8,9,9,1,9,7	83,3	неустойчив

При инокуляции возбудителем пирикулярриоза в оптимальных для развития патогена условиях реакцию устойчивых сортов дали образцы, содержащие ген устойчивости *Pi-40*. На рисунке 3 (А и Б) показана степень поражения линии IR 83243-2-1-24-4-B, несущей ген устойчивости *Pi-40* в сравнении с сортом-стандартом Хазар.

Из рисунка очевидна разница в степени поражения экспериментальных растений. У представленных на рисунке Б растений сорта Хазар видны проявления метельчатой формы пирикулярриоза. Пораженные растения характеризуются повышенной пустозерностью. Кроме того, зерно, получаемое с пораженных растений, обладает более низкими технологическими показателями в сравнении с зерном растений, не пораженных пирикулярриозом. Данный фактор усугубляет экономический ущерб от данного заболевания.



А

Б

Рисунок 3. Поражение экспериментальных растений пирикулярриозом

А - линия IR 83243-2-1-24-4-B (ген *Pi 40*), Б – сорт Хазар

В тоже время, необходимо отметить, что линия Хазар (*Pib+Piz*), показала устойчивость среднего уровня (ИРБ 40%). Она значительно превосходит сорт Хазар по устойчивости. Данная линия была создана на основе указанного сорта, путем интрогрессии генов *Pi-z* и *Pi-b* из сортов-доноров генов с использованием ДНК-маркерного анализа для идентификации генов устойчивости. Можно сделать вывод о том, что указанные два гена, при их одновременном присутствии в генотипе значительно повышают устойчивость к Краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза.

Таким образом, проведенные исследования позволили выделить ряд штаммов возбудителя пирикулярриоза из пяти различных рисосеющих районов Краснодарского края и республики Адыгея. Штаммы использовали для создания синтетической популяции, с использованием которой была выполнена фитопатологическая оценка селекционных линий риса с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b*, *Pi-z*, *Pi-40*. Наибольшую степень устойчивости проявили линии, несущие ген

широкого спектра *Pi-40*. В то же время линия, созданная на основе сорта Хазар и несущая два гена устойчивости *Pi-b* и *Pi-z* проявила степень устойчивости значительно выше исходного сорта реципиента. Результаты работы говорят о перспективности использования в селекционных программах на устойчивость к пирикуляриозу риса гена широкого спектра устойчивости *Pi-40*, а также генов *Pi-b* и *Pi-z* путем создания селекционных форм, несущих оба гена.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 11-04-96596 р_юг_ц

Список литературы

1. Yokoo M., Kikushi F., Fujimaki H. et al. Breeding of blast resistance lines (BL1 to 7) from indica-japonica crosses of rice // Japan. J. Breed. 1978. V.28. P. 359-385.
2. Tsunoda Y., Jwa N.S., Akiyama K. et al. Cloning of the rice blast resistance gene *Pi-B* // Advanced in rice blast research 2000.V.1. P. 9-16.
3. Зеленский Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикуляриозу, рисовой листовой нематоды и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: Автореф. дис....д-ра с.-х. наук.- Краснодар.- 1993.-48 с.
4. Hayashi K. Development of PCR based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz*-locus // Theoretical and Applied Genetics. 2004. V.108. P. 1212-1200.
5. J. U. Jeung, B. R. Kim, Y. C. Cho et al. A novel gene, *Pi-40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice Theoretical and Applied Genetics 2007. V. 115. P. 1163–1177.
6. Супрун И.И., Ильницкая Е.Т., Мухина Ж.М. Создание внутригенного ДНК-маркера гена устойчивости к пирикуляриозу риса *Pi-b* и его использование в практической селекции // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 5. С. 63-66.
7. Супрун И.И., Шиловский В.Н., Рубан В.Я. Создание селекционного материала риса с геном устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b* с использованием молекулярно-генетических методов // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2011. №1. С.3-5.

8. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике. – М., ВАСХНИЛ, 1983. – 15 с.

9. Методические указания по оценке устойчивости сортов риса к возбудителю пирикулярриоза. – М., ВАСХНИЛ, 1988. – 30 с.