

УДК 577.2:581.2:632.938.1: 633.181

О. В. ГАЛАЄВ<sup>1</sup>, к. б. н., пров. наук. співроб.,  
М. В. ГАЛАЄВА<sup>1</sup>, к. б. н., мол. наук. співроб.,  
Д. В. ШПАК<sup>2</sup>, к. с.-г. н., зав. від.

<sup>1</sup>СГІ–НЦНС, Одеса  
e-mail: galaev7@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут рису  
e-mail: shpak\_dmitry@mail.ru

## **ВИЯВЛЕННЯ РАСОСПЕЦИФІЧНИХ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ПІРИКУЛЯРІОЗУ *Pi-ta* ТА *Pi-b* У СОРТИВ РИСУ (*Oryza sativa L.*)**

Кодомінантні внутрігенні молекулярно-генетичні маркери використані для детекції алельного стану расоспеціфічних генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* у 103 сортів і ліній рису різного географічного походження з Національної колекції Інституту рису НААН України. Виявлено генотипи–носії домінантних алелів генів *Pi-ta* та *Pi-b*, які забезпечують стійкість рису до пірикуляріозу.

**Ключові слова:** рис, пірикуляріоз, гени стійкості *Pi-ta* і *Pi-b*, молекулярні маркери.

**Вступ.** З усіх грибкових захворювань найбільш шкідливою і найпоширенішою хворобою рису в умовах Півдня України є пірикуляріоз, збудником якого є недосконалий гриб *Pyricularia oryzae* Cav (син. *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr), що відноситься до класу *Deuteromycetes*. Патологічні симптоми хвороби на рослинах рису починають виявлятися з фази проростання до фази молочно-воскової стигlosti рослин [1]. Ефективна та екологічно безпечна стратегія боротьби з даним захворюванням — створення генетично стійких сортів. У селекції стійких до пірикуляріозу сортів рису перед селекціонером стоїть ряд проблем: вибір донора стійкості, оцінка стійкості та добір стійких генотипів у гіbridних популяціях.

Гени вертикальної стійкості можуть бути виявлені за допомогою аналізу реакції з відомими генами авірулентності сорту на інокуляцію моноізолятами *P. oryzae*. Але такий класичний фітопатологічний тест досить довготривалий і потребує значних матеріальних витрат. Також важливим лімітуючим чинником є нестабільність генів авірулентності збудника пірикуляріозу і перекривання спектра расоспеціфічної стійкості. Отже, найефективнішим методом ідентифікації генів стійкості до пірикуляріозу є використання молекулярних маркерів внутрігенных або щільно зчеплених з цільовим геном.

В Україні дослідження з ідентифікації генів стійкості до пірикуляріозу в сортах рису не проводились. За багаторічними даними фітопатоло-

гів, для зони вирощування рису в Краснодарському краї Росії та України ефективними є гени расоспецифічної стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* [2]. Гени расоспецифічної стійкості *Pi-ta*, *Pi-b* у рису секвеновано. Ген *Pi-ta* розташований в області центромери 12 хромосоми; ген *Pi-b* — на довгому плечі хромосоми 2 [3].

**Мета** нашого дослідження полягала в ідентифікації алелів расоспецифічних генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* у сортів рису української селекції та в наборі сортів і ліній різного географічного походження з Національної колекції Інституту рису.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для досліджень слугували 73 сорти і лінії різного географічного походження та 30 сортів і ліній рису української селекції з Національної колекції Інституту рису. Позитивним контролем були сорти-носії генів *Pi-ta* (Katy, Madison) та *Pi-b* (Brazos, Katy, Labelle, Madison), надані National Plant Germplasm System (США).

ДНК виділяли з 5-денних проростків за допомогою СТАВ-буферу [4]. Досліджували ДНК п'яти індивідуальних рослин кожного сорту, лінії чи гібриду. Для виявлення алелів генів *Pi-ta* та *Pi-b* використано кодомінантні внутрігенні STS-маркери [5, 6]. Дві пари STS-маркерів *Pi-ta.F/Pi-ta.R* та *pi-ta.F/pi-ta.R* виявляють два алеля: домінантному алелю *Pi-ta*, який забезпечує стійкість до пірикуляріозу, відповідає продукт ампліфікації розміром 270 п. н.; рецесивному алелю *pi-ta* — продукт 563 п. н. Дві пари STS-маркерів *Pi-b.F/Pi-b.R* та *pi-b.F/pi-b.R* виявляють два алеля: домінантному алелю *Pi-b*, що зумовлює стійкість, відповідає фрагмент 490 п. н., а рецесивному алелю *pi-b* — 200 п. н.

ПЛР зі спрямованими праймерами проводили на термоциклері «Тер-цик» («ДНК-технологія», Росія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила буфер (67 мМ трис-HCl pH 8,8; 16,6 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,03 % Tween-20); 0,2 мМ кожного dNTP; 0,25 мКМ праймера; 20 нг ДНК; 0,8 од. Таq-полімерази. Умови реакції для пар STS-маркерів згідно Дубініна та ін. [5]. Продукти ампліфікації (15 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 1,5 %-му агарозному гелі у 1xTBE буфері. Електрофорез в агарозному гелі проводили при постійній напрузі 150 V в апараті для горизонтального гель-електрофорезу (S-2N, «Helicon», Росія). Фрагменти ДНК у гелі забарвлювали бромистим етидієм. Калібрували молекулярну масу отриманих ампліконів з використанням стандарту pUC 19/MspI.

Статистична обробка результатів — за загальноприйнятими методиками [7].

**Результати та обговорення.** На першому етапі роботи для усунення хибно негативних та позитивних результатів проводили ПЛР-аналіз контрольних сортів, що є носіями генів *Pi-ta* та *Pi-b*, з застосуванням вище-зазначених STS-маркерів. Доведено, що сорти Katy, Madison є носіями домінантних алелів генів *Pi-ta* та *Pi-b*, а сорти Brazos, Labelle — домінантного алеля *Pi-b* (табл. 1). Результати ПЛР-аналізу сортів з парами праймерів, що виявляють алельний стан гена *Pi-ta* та *Pi-b*, показано на рисунку 1.

Таблиця 1

Генотипи контрольних сортів за алелями генів стійкості до пірикуляріозу рису *Pi-ta* та *Pi-b*

Генотип	Сорт	STS-маркери			
		<i>Pi-ta</i>	<i>pi-ta</i>	<i>Pi-b</i>	<i>pi-b</i>
		270 п. н.	563 п. н.	490 п. н.	200 п. н.
<i>Pi-ta</i> , <i>Pi-b</i>	Katy	+	-	+	-
<i>Pi-ta</i> , <i>Pi-b</i>	Madison	+	-	+	-
<i>Pi-b</i>	Brazos	-	+	+	-
<i>Pi-b</i>	Labelle	-	+	+	-

Примітка: «+» — присутність алеля, «-» — відсутність алеля.

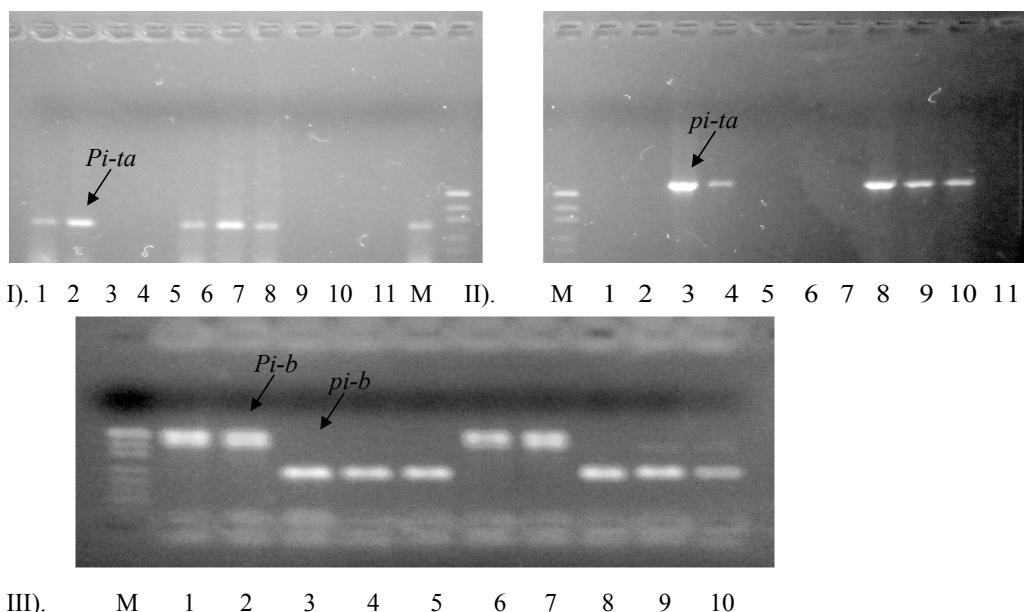


Рис. 1. Результати ПЛР-аналізу з парами праймерів, що виявляють алелі *Pi-ta* (I), *pi-ta* (II), *Pi-b* та *pi-b* (III) в 1,5 %-му агарозному гелі: М — pUC19 DNA/MspI; I, II): 1 — Katy, 2 — Madison, 3 — Brazos, 4 — Labelle, 5 — Онтаріо, 6 — Пам'яті Гічкіна, 7 — Преміум, 8 — Еней, 9 — IRBL-21, 10—97-В, 11 — Престиж; III): 1 — Katy, 2 — Madison, 3 — Онтаріо, 4 — Пам'яті Гічкіна, 5 — Преміум, 6 — Brazos, 7 — Labelle, 8 — Престиж, 9 — Серпневий, 10 — Україна — 96

На другому етапі роботи за алелями генів *Pi-ta* та *Pi-b* досліджували 16 сортів і 14 ліній Інституту рису НААНУ. Результати наведено у таблиці 2. Серед сортів та ліній рису української селекції досить часто виявляється домінантний алель гена *Pi-ta*, який зумовлює стійкість до пірикуляріозу. З досліджених нами сортів та ліній 40 % характеризувались генотипом з домінантним алелем *Pi-ta*, 53 % — генотипом з рецесивним алелем *pi-ta*, а 7 % були неоднорідними та складались з обох зазначених генотипів. Сорти Агат, Антей, Віконт, Дебют, Онтаріо, Пам'яті Гічкіна, Преміум, Престиж, Серпневий,

Україна — 96, Янтарний та лінія УР 3470 є носіями домінантного алеля *Pi-ta*. Зазначені сорти можна використовувати як джерела гена стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta*. Слід зазначити, що всі сорти Інституту рису, що входять до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, мають генотип з домінантним алелем гена *Pi-ta*. Проте серед сортів української селекції не виявлено жодного сорту з домінантним алелем гена *Pi-b*.

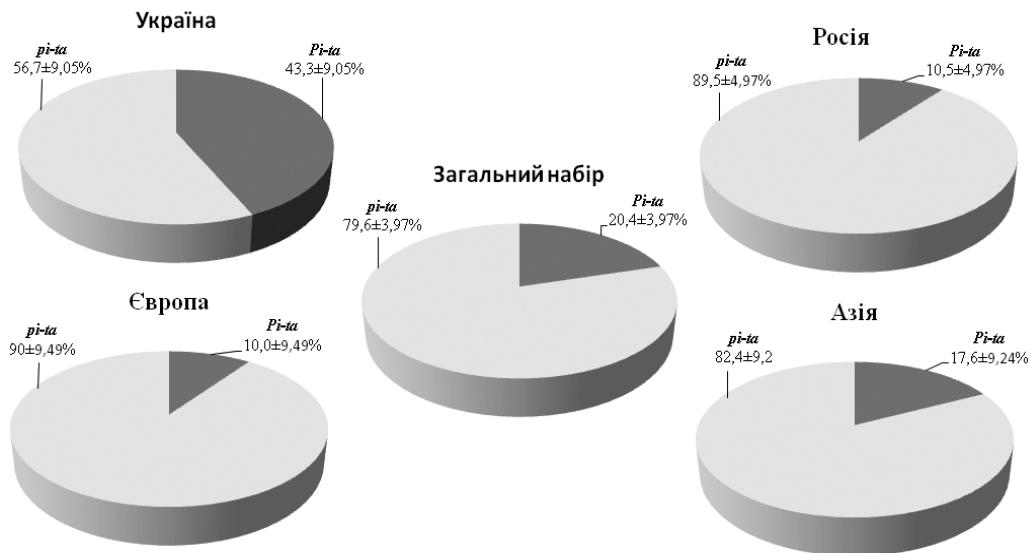
Таблиця 2

Генотипи сортів та ліній селекції Інституту рису НААНУ за алелями генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b*

Сорт, лінія	Рік створення	Алель				Сорт, лінія	Рік створення	Алель			
		<i>Pi-ta</i>	<i>pi-ta</i>	<i>Pi-b</i>	<i>pi-b</i>			<i>Pi-ta</i>	<i>pi-ta</i>	<i>Pi-b</i>	<i>pi-b</i>
Агат	2004	+	-	-	+	Янтарний	2002	+	-	-	+
Антей	2002	+	-	-	+	КОП-161-92	1992	-	+	-	+
Віконт	2007	+	-	-	+	УкрНДС 5079	1993	-	+	-	+
Дебют	2009	+	-	-	+	УкрНДС 6955	1998	-	+	-	+
Дніпровський	1999	+	+	-	+	УР 2184	2010	-	+	-	+
Еней	1992	-	+	-	+	УР 2775	2010	+	+	-	+
Онтаріо	2008	+	-	-	+	УР 3470	2009	+	-	-	+
Пам'яті Гічкіна	2002	+	-	-	+	УР 3472	2009	-	+	-	+
Перекат	1986	-	+	-	+	УР 3475	2009	-	+	-	+
Преміум	2006	+	-	-	+	УР 3481	2010	-	+	-	+
Престиж	2005	+	-	-	+	УР 3482	2010	-	+	-	+
Прибій	1994	-	+	-	+	УР 3483	2010	-	+	-	+
Серпневий	2008	+	-	-	+	УР 5814	2009	-	+	-	+
Україна — 96	1996	+	-	-	+	УР 5815	2009	-	+	-	+
Червоний	2007	-	+	-	+	УР 8458	2010	-	+	-	+

Примітка: «+» — присутність алеля, «-» — відсутність алеля.

На третьому етапі досліджували сорти і лінії рису різного географічного походження (Європа, Азія, Африка, Америка). В досліденому наборі з 73 сортів і ліній було виявлено ще 11 сортів, що несуть домінантний алель гена *Pi-ta* (табл. 3). Проте 6 сортів були неоднорідними та складались з двох генотипів з домінантним та рецесивним алелем гена *Pi-ta* відповідно. Однорідні сорти та лінії Малиш, Мутант 4207-75, ПФ-4186 (Росія), Chise Bind (Японія) та Delfino (Туреччина) мали генотип з домінантним алелем гена *Pi-ta*, який забезпечує стійкість. Зазначені сорти також можна використовувати в селекції на стійкість до пірикуляріозу. Слід зазначити, що частота алеля *Pi-ta* у сортів і ліній рису України ( $43,3 \pm 9,05$ ) істотно перевищувала аналогічний показник в наборі сортів з Росії, а також інших країн Європи та Азії (рис. 2). У сортів рису з Африки та Америки не виявлено генотипів з домінантним алелем *Pi-ta*.

Рис. 2. Частоти алелів гена *Pi-ta*

Ген стійкості *Pi-ta* забезпечує середню (на рівні 5–7 балів) стійкість сортів рису до пірикуляріозу в умовах Півдня України. Тому для створення стійких сортів необхідно схрещувати сорти, які несуть домінантний алель гена *Pi-ta*, з сортами, що мають інші гени стійкості до цієї хвороби, наприклад з сортами-носіями домінантного алеля *Pi-b*, який також забезпечує стійкість до пірикуляріозу. Проте у сортів української селекції домінантного алеля *Pi-b* не виявлено. Основна частина досліджених нами сортів та ліній рису різного географічного походження також характеризувалась генотипом з рецесивним алелем *pi-b*. Домінантний алель гена *Pi-b* ідентифіковано лише у трьох сортів та ліній рису: ВНІІР 546 (Росія), 97-В (Індія) та IRBL-21 (Філіппіни). Зазначені сорти можна використовувати в схрещуваннях для створення нових стійких до пірикуляріозу сортів.

Отже, з метою створення стійких генотипів ми можемо рекомендувати для пірамідування генів стійкості *Pi-ta* та *Pi-b* використовувати в схрещуваннях адаптовані до місцевих умов рисосіяння сорти української селекції Інституту рису, що несуть домінантний алель гена *Pi-ta* (Агат, Антей, Віконт, Дебют, Онтаріо, Пам'яті Гічкіна, Преміум, Престиж, Серпневий, Україна — 96, Янтарний), з сортами-носіями домінантного алеля гена *Pi-b* (ВНІІР 546, 97-В, IRBL-21, Brazos, Katy, Labelle, Madison). При цьому використання кодомінантних молекулярно-генетичних маркерів дозволить істотно скоротити селекційну схему створення вихідного матеріалу рису з ефективними генами стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* і *Pi-b*.

З вищезазначеною метою в Інституті рису створено  $F_2$  популяції 97-В/Віконт, 97-В/Онтаріо, IRBL-21/Віконт, IRBL-21/Преміум, IRBL-21/Онтаріо, у яких однією з батьківських форм були носії домінантного алеля

Таблиця 3

Генотипи сортів та ліній рису різного географічного походження за алелями генів стійкості до пірикуляріозу рису *Pi-ta* та *Pi-b*

№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів				Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів			
			D <sub>1</sub> -ta	D <sub>1</sub> -a	D <sub>1</sub> -d	D <sub>3</sub> /3			D <sub>1</sub> -ta	D <sub>1</sub> -a	D <sub>1</sub> -d	D <sub>3</sub> /3
1	97-B	Індія	—	+	—	38	Biola	Росія	—	+	—	+
2	A'bel	Угорщина	—	+	+	39	Birajz	Росія	—	+	—	+
3	Arborio	Італія	—	+	—	40	BNIIP 10157	Росія	—	+	—	+
4	Ariette	Італія	—	—	+	41	BNIIP 10163	Росія	—	+	—	+
5	China His 15	Бурунді	—	+	—	42	BNIIP 4631-88	Росія	—	+	—	+
6	Chise Bind	Японія	+	—	+	43	BNIIP 546	Росія	—	+	+	—
7	Csing Feng 2	Китай	+	—	+	44	BNIIP 6080	Росія	—	+	—	+
8	Delfino	Туреччина	+	—	—	45	BNIIP 8847	Росія	—	+	—	+
9	Dong 18	В'єтнам	—	+	—	46	BNIIP 989	Росія	—	+	—	+
10	Edirne	Туреччина	—	+	—	47	BNIIP 99-88	Росія	—	+	—	+
11	Ellida	Румунія	—	+	—	48	Волгоградський	Росія	—	+	—	+
12	Europi	Греція	—	+	—	49	Гарант	Росія	+	+	—	+
13	Gizza 177	Египет	—	+	—	50	Ізумруд	Росія	—	+	—	+
14	IR-532-1-218	Філіппіни	—	+	—	51	Карат	Росія	—	+	—	+
15	IRBL-21	Філіппіни	—	+	—	52	KП – 15	Росія	—	+	—	+
16	Karolina	Угорщина	—	+	—	53	KП-40-71	Росія	—	+	—	+
17	M-103	США	—	+	—	54	KPSU-91	Росія	—	+	—	+
18	Madina	Казахстан	—	+	—	55	Краснодарський	Росія	—	+	—	+
19	Magic	Румунія	+	+	—	56	Кулон	Росія	—	+	—	+
20	Mega	Болгарія	—	+	—	57	Лінія 84-1-35-2	Росія	—	+	—	+
21	Merle	Франція	+	+	—	58	Малиш	Росія	+	—	—	+
22	Nato × Ballilla gr. grosses × Кубань	Росія	—	+	—	59	Мугант 4207-75	Росія	+	—	—	+

Закінчення таблиці 3

№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів			№ з/п	Сорт, лінія	Країна походження	Алель генів
			D <sub>1</sub> -ta	D <sub>1</sub> -q	D <sub>1</sub> -d				
23	Onda	США	—	+	+	60	Новатор	Росія	—
24	Osmancik 97	Туреччина	—	+	+	61	ПФ – 4186	Росія	+
25	PI 502967 OR04AR SD	США	—	+	+	62	Раздольний	Росія	—
26	PI 592507 OR95TX SD	США	—	+	+	63	Світлий	Росія	—
27	PI 593892 OR07AR SD	США	—	+	+	64	Северний	Росія	—
28	Pingxi 16	Китай	—	+	+	65	Серлантин	Росія	+
29	Poorga	Індія	—	+	+	66	Сніжинка	Росія	—
30	Ryongyang 15	Північна Корея	—	—	+	67	Солярис × O. Perenis	Росія	—
31	Ryongyang 21	Північна Корея	—	+	—	68	СР 44–35	Росія	—
32	Ryongyang 7	Північна Корея	+	+	—	69	Філіппіни	Філіппіни	—
33	Sakha 101	Єгипет	—	+	—	70	Флагман	Росія	—
34	Saturn × BNIP 6082	Росія	—	+	+	71	Хайдараабад	Індія	—
35	Strimonas	Греція	—	—	+	72	Южанін	Росія	—
36	Боярин	Росія	—	+	—	73	Южний	Росія	—
37	Вікторія	Росія	—	—	+				

Примітка: «+» — присутність алеля, «–» — відсутність алеля.

*Pi-ta* української селекції (Віконт, Онтаріо, Преміум), а іншою батьківською формою — носії домінантного алеля *Pi-b* (97-B та IRBL-21). Нині з застосуванням молекулярних маркерів з рослин F<sub>2</sub> популяцій проводиться добір генотипів, які поєднують домінантні алелі генів *Pi-ta* та *Pi-b* в гомозиготному стані, що значно скорочує селекційний процес.

**Висновки.** Ідентифіковано генотипи сортів і ліній рису різного географічного походження за алелями генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* з використанням кодомінантних внутрігенних молекулярних маркерів. Виявлено генотипи-носії домінантних алелів зазначених генів, які рекомендується застосувати в селекційні програми для підвищення стійкості рису до пірикуляріозу.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вожегова Р. А. Теоретичні основи і результати селекції рису в Україні : монографія / Р. А. Вожегова. — Херсон, 2009. — 348 с.
2. Дьяков Ю. Т. Общая и молекулярная фитопатология : учеб. пособие / Ю. Т. Дьяков. — М. : Общество фитопатологов, 2001. — 302 с.
3. McCouch S. R. Mapping of blast resistance genes in rice / S. R. McCouch, R. G. Nelson, J. Tohme, R. S. Zeigler // Rice blast disease. — 1994. — V.1. — P. 167–186.
4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : науч.-метод. руководство / под рук. Ю. М. Сиволапа. — К. : Аграр. наука, 1998. — 156 с.
5. Дубинина Е. В. Интроверсия генов *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* в отечественный сорт риса Снежинка с применением метода маркерной селекции / Е. В. Дубинина, Ж. М. Мухина // Научный журнал КубГАУ. — 2011. — № 66 (02). — С. 1–11.
6. Мухина Ж. М. Создание внутригенных молекулярных маркеров риса для повышения эффективности селекционного и семеноводческого процессов / Ж. М. Мухина, С. В. Токмаков, Ю. А. Мягких, Е. В. Дубинина // Научный журнал КубГАУ. — 2011. — № 67 (03). — С. 1–10.
7. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — М. : Колос, 1973. — 327 с.

Надійшла 03.07.2015.

UDC 577.2:581.2:632.938.1:633.181

**Galaev O. V., Galaeva M. V., Shpak D. V.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**DETECTION OF RACE-SPECIFIC BLAST RESISTANCE GENES *Pi-ta* AND *Pi-b* IN RICE VARIETIES (*Oryza sativa L.*)**

An intragenic codominant molecular genetic markers for detection allelic state race-specific blast resistance genes *Pi-ta* and *Pi-b* is used for searching its donors among 103 varieties and lines rice of different geographical origin in the National Collection of the Institute of rice NAANU. Genotypes carrier resistant dominant alleles of genes *Pi-ta* and *Pi-b* were detected.

УДК 577.2:581.2:632.938.1:633.181

**Галаев А. В., Галаева М. В., Шпак Д. В.**

**ВЫЯВЛЕНИЕ РАСОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ *Pi-ta* И *Pi-b* В СОРТАХ РИСА (*Oryza sativa L.*)**

Кодоминантные внутригенные молекулярно-генетические маркеры использованы для детекции аллельного состояния расоспецифических генов устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta* и *Pi-b* в 103 сортах и линиях риса различного географического происхождения из Национальной коллекции Института риса НААНУ. Обнаружены генотипы–носители доминантных аллелей генов *Pi-ta* и *Pi-b*, обеспечивающие устойчивость риса к пирикуляриозу.