

УДК 633.18: 575.488.42

ИНТРОГРЕССИЯ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ КАК ФАКТОР СТАБИЛИЗАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ РИСА К ЗАБОЛЕВАНИЮ

Е.В. Дубина, В.Н. Шиловский, С.В. Гаркуша, М.Г. Рубан, Л.В. Есаулова

Всероссийский научно-исследовательский институт риса, г. Краснодар

В селекции риса (*Oryza sativa* L.) актуальная задача – создание сортов, устойчивых к пирикулярриозу, возбудителем которого является несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Cav. (половая форма *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr Yaegashi & Udagawa). Экономический ущерб, наносимый заболеванием, значителен во всех зонах мирового рисосеяния [Гаркуша, 2013]. В решении такого рода задач перспективным представляется применение ДНК-технологий. Цель работы – создать селекционный материал, а также высокопродуктивный сорт и линии риса с генами устойчивости к пирикулярриозу с использованием метода молекулярного маркирования. Проведено инкорпорирование генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* в отечественный сорт риса Флагман. Идентификация донорных аллелей переносимых генов устойчивости в гибридных растениях осуществлялась с помощью микросателлитных, а также внутригенных молекулярных маркеров. В результате ряда возвратных скрещиваний нами получен селекционный материал с интродуцированными и пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу, что подтверждается ПЦР-анализом. Линия риса КП-171-14 с геном *Pi-ta*, адаптированная к условиям выращивания на юге России, устойчивая к краснодарской популяции патогена *P. oryzae*, а также имеющая высокую урожайность и качество крупы подготовлена для передачи в Государственное сортоиспытание. Внедрение и возделывание таких сортов в производстве позволит сократить применение химических средств защиты, получать экологически чистую сельхозпродукцию и избежать загрязнения экосистем.

Ключевые слова: рис, пирикулярриоз, гены устойчивости, ПЦР, SSR-маркеры, селекция.

Селекция растений основана на классических методах – гибридизации и отбора. В настоящее время разработаны методы молекулярной генетики, которые позволяют идентифицировать генотипы, основанные на ДНК-маркировании [Cho et al., 2003; Jena et al., 2003]. Благодаря этому в мировой практике возникло такое направление, как ДНК-маркерная селекция (marker assisted selection), осуществляющая молекулярно-генетическое сопровождение селекционного процесса, начиная с подбора исходного материала, наличия желательных генов и заканчивая паспортизацией нового сорта.

Одним из современных методов ДНК-анализа является изучение микросателлитных локусов (SSR). SSR-маркеры весьма полиморфны, стабильны в соматических клетках, локуспецифичны, их наследование, как правило, имеет кодоминантный характер, что позволяет отличать гомозиготное состояние исследуемого локуса от гетерозиготного. Кроме того, они просты при использовании в реакции ПЦР. Высокий уровень полиморфизма, выявляемый SSR-маркерами, определяет ценность этой маркерной системы и позволяет говорить о возможности создания на её основе эффективной универсальной технологии, пригодной для контроля генов в селекции риса на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды [Cho et al., 2003; Остерман, 1981].

Материалы и методы исследований

Донорами для введения генов устойчивости к пирикулярриозу в отечественный сорт риса Флагман (материнская форма) стали сорта и линии зарубежной селекции IR-36 (донор гена *Pi-ta*), BL-1 (донор гена *Pi-b*), C101LAC (донор генов *Pi-1+Pi-33*), C101A-51 (*Pi-2*), которые в условиях Краснодарского края проявили себя как позднеспелые, с вегетационным периодом 140–155 дней. В местной зоне рисосеяния предпочтительно возделывание сортов, созревающих не более, чем за 125 дней [Зеленский, 1993], поэтому материнская форма для гибридизации была высажена в три срока, с разницей в 10 дней, тем самым увеличивая вероятность совпадения периодов цветения родительских форм.

Пирикулярриоз считается одним из наиболее вредоносных заболеваний риса на всей территории возделывания данной культуры. В связи с этим создание устойчивых к *P. oryzae* сортов – важное направление селекции, наряду с повышением урожайности риса и качеством зерна.

Цель работы – создать селекционный материал, а также высокопродуктивный сорт и линии риса с генами устойчивости к пирикулярриозу с использованием метода молекулярного маркирования.

Работа методами классической селекции в данном направлении довольно затруднительна. Главная сложность – определение присутствия целевого гена устойчивости, что связано с перекрывающимися фенотипическими эффектами, а также трудностями в создании инфекционных фонов [Зеленский, 1993].

Идентификация донорных аллелей устойчивости молекулярными маркерами SSR, тесно сцепленных с генами резистентности к *P. oryzae*, облегчает селекционную работу [Jena et al., 2003].

По многолетним исследованиям фитопатологов, для юга России эффективны гены расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-z'*, *Pi-ta*², *Pi-b* и *Pi-ta* [Коломиец, 1990]. Гены *Pi-ta* и *Pi-b* сиквенированы. Гены *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* относят к генам широкого спектра устойчивости к *P. oryzae* [Ильницкая, 2007].

При гибридизации растений использовали пневмокастрацию материнских форм и опыление «ТВЕЛЛ» – известным методом [Лось, 1987]. Растения выращивали в камерах искусственного климата.

Для контролирования наличия, а также аллельного состояния целевых генов в гибридных растениях использовали ДНК-анализ на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Экстракцию (выделение ДНК) осуществляли методом СТАВ [Murray et al., 1980]. Метод заключается в использовании цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ) в качестве основного компонента буфера экстракции и преципитации.

Для идентификации генов Pi-1, Pi-2, Pi-33 использовали известные из литературных источников праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров (сиквенс праймерных пар доступен на сайте gramene.com) [Jena at al., 2003]. Микросателлитные повторы, тесно сцепленные с генами Pi-1, Pi-2, Pi-33, были определены на генетическом материале донорных линий

и уже эффективно использовались в селекции [Jiang at al., 2002; Berruyer at al., 2003; Correa-Victoria at al., 2003]. Для идентификации генов Pi-ta, Pi-b использовались внутригенные маркеры, созданные в нашей лаборатории [Мухина и др., 2003; Мухина и др., 2011]. (табл. 1).

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для идентификации генов Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b

Название локуса	Хромосома	Ген устойчивости	Донор устойчивости	Сиквенс		Размер ПЦР-продукта, п.н.	
				F	R		
Rm224	11	<i>Pi 1</i>	C104-lac C101-lac	atcgatcgatcttcacgagg	tgctataaaaggcattcggg	124–158	
SSR140	6	<i>Pi 2</i>	C101-lac –A51	aaggtgtgaacaagctagcaa	ttctaggggagggtgtagaa	118–148	
Rm527	6			C101-lac	ggctcgatcagaaaatccg	ttgcacaggttgcgatagag	233
Rm72	8	<i>Pi 33</i>	C101-lac	ccggcgataaaacaatgag	gcatcggtcctaactaagg	152–198	
Rm310	8			C101-lac	ccaaaacatttaaatatcatg	gcttgttggtcattaccattc	85–120
Pi-ta	12	<i>Pi-ta</i>	IR-36, IR-64	F1 gccgtggcttctatctttacatg	R1 atccaagtgttagggccaacattc	132	
				F2 ttgacactctcaaggactgggat	R2 tcaagtcaggttgaagatgcatcga		
				F1 gaacagcttgctcggaaatcca	R2 tactgcattgtgcagcttgtg		302
				R3 atacatcgaccagctatttggc			

ПЦР проводили с 40–50 нг ДНК, 0.1 μM dNTPs, 25mM KCL, 60 mM Tris-HCL (pH 8.5), 0.1% Тритон X-100, 6 10 mM 2-меркаптоэтанол, 1.5 mM MgCl₂, 1 единица Taq-полимеразы и 0.3 μM праймеров в конечном объёме 25 мкл.

Аmplификацию осуществляли в ДНК-амплификаторе «Терцик», оптимизировав при этом условия ПЦР: начальная денатурация – 5 минут при 94 °C – 1 цикл. Следующие 35 циклов: де-

натурация – 35 сек при 94 °C; отжиг праймеров 45 сек при 60 °C; синтез 30 сек при 72 °C. Синтез 5 мин при 72 °C – 1 цикл.

Для разделения ПЦР продуктов при электрофорезе использовали 8%-й полиакриламидный гель. Полиморфизм контрастных аллелей визуализировался после трёх часов электрофореза при напряжении 250V. После электрофореза гелевые пластины помещали на 20–30 минут в раствор бромистого этидия и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты исследований

В 2007 году на основе использования технологии ДНК-маркерной селекции (marker assisted selection – MAS – селекция с применением ДНК маркеров к генам интереса) нами проведена гибридизация линий доноров генов устойчивости к пирикулярриозу, указанных в разделе «Материалы и методы», с отечественным сортом риса Флагман.

В результате гибридизации каждой комбинации получено F1 поколение, которое использовали в возвратных скрещиваниях с реципиентной родительской формой (сорт риса Флагман). Следует отметить, что растения F1 имели высокую степень стерильности (до 95%). После проведения первой серии беккроссов в 2008 году в камерах искусственного климата получено BC1 и BC2 поколение. В BC2-популяциях фертильность возросла и в среднем составляла около 50%.

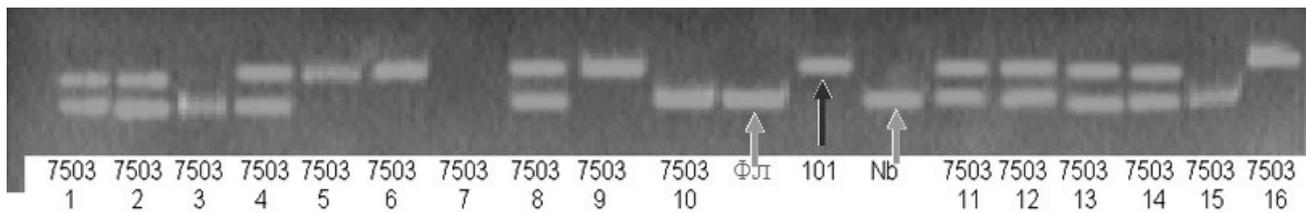
Начиная с первого возвратного скрещивания проводился маркерный контроль на присутствие переносимых донорных аллелей в гибридном потомстве. Отбирали растения, которые по результатам ДНК-анализа несли донорную аллель гена устойчивости к патогену, а также отмечали те растения, которые показали наименьший период вегетации до цветения. Растения, в генотипе которых аллели устойчивости не были обнаружены, выбраковывали.

В полученных BC2-популяциях работа проводилась по той же схеме. Отобранные по молекулярным данным растения, несущие донорные аллели, вовлекали в следующий беккросс, предварительно выбраковав формы с нежелательным морфотипом.

По каждой комбинации было проведено три беккросса, поскольку известно, что восстановление генома рекуррентного родителя (RP) при возвратных скрещиваниях в BC3 составляет 93.75% [Openshau at al., 1994].

В 2009 году получено BC3 поколение, среди которого были отобраны формы с наименьшим вегетационным периодом и наибольшей фертильностью метёлки. Семена этих растений высадили для получения сегрегирующей BC3F2 популяции. Самоопыление растений риса, гетерозиготных по селективируемым генам, даёт возможность перевести приоритетную аллель в гомозиготное состояние. Маркерный анализ полученной популяции выявил образцы, несущие вводимые целевые гены в гомозиготном состоянии (рис. 1).

Из электрофореграммы видно, что образцы под №№ 7503-5, 7503-6, 7503-9 несут доминантную аллель гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1* в гомозиготном состоянии, образец № 7503-3 и 7503-15 – аллель материнской формы (сорт Флагман); остальные образцы являются гетерозиготами по локусу RM224.

Рисунок 1. Результаты ПЦР на ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*.

Примечание: 7503-1.....7503-16 – гибридные растения BC1; C101- линия C101Лас- донор гена *Pi-1* (контроль «+»); Фл – сорт Флагман; Nb – сорт Nirpon Vare (контроль «-»).

На современном этапе для селекции риса желательным является низкорослый тип растений, с высокой интенсивностью первоначального роста, устойчивый к полеганию, с продуктивной метёлкой и неосыпающимися в фазу полной спелости колосками [Коротенко., 2006]. Среди растений, которые по результатам ДНК-анализа, несли доминантные аллели ? генов *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* в гомозиготном состоянии, удалось отобрать несколько форм, совмещающих в себе скороспелость, низкорослость, неосыпаемость и фертильность колосков. Семена этих растений были высеяны и в потомстве отобрали лучшие экземпляры, которые в 2011 году были переданы в селекционный процесс для оценки по хозяйственно-ценным признакам. Растения, не удовлетворяющие таким требованиям, выбраковывали.

Однако, длительная устойчивость к пирикулярриозу не может быть обеспечена присутствием одного гена, так как популяции гриба обладают способностью быстро мутировать и поражать формально устойчивые сорта с конкретными генами устойчивости [Conaway-Vormans at al. 2003].

Стабильную устойчивость проявляют сорта, в генотипе которых собрано несколько генов, определяющих непоражаемость разными расами гриба, а также сорта, несущие так называемые гены широкого спектра и QTL, придающие растениям устойчивость к значительному разнообразию рас патогена [Bonman at al., 1992; Witcombe at al., 2000].

Зарубежными коллегами проведен ряд успешных селекционных программ по созданию устойчивых к пирикулярриозу сортов риса методом пирамидирования генов с использованием маркерной селекции [Tabien at al., 2000; Hittalmani at al., 2000; Kumar. at al., 2000; Correa-Victoria at al., 2003].

Поэтому мы одновременно вели работу и по несколько другой схеме, где главной задачей было получить расте-

ния риса с объединенными генами *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* в одном генотипе. Нами проведено скрещивание беккроссных растений BC3F2 между собой, несущих одиночные гены резистентности *Pi-ta*, *Pi-2*, *Pi-1+Pi-33*, *Pi-b*. Получено F1, а затем F2 поколение, которое проверили маркерным анализом на наличие целевых генов. Отобраны те растения, которые по результатам ДНК-анализа имели в генотипе донорные аллели выше указанных генов.

Для повышения экономической эффективности маркерной системы ранее нами разработан ряд мультипраймерных систем, позволяющих за одну реакцию идентифицировать в гибридных растениях с пирамидированными генами резистентности одновременно два гена, что значительно снижает время и затраты на ПЦР-анализ (рис. 2).

На рисунке 2 представлены результаты мультиплексной ПЦР на присутствие в одном генотипе одновременно двух генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b+Pi-ta*.

Из электрофореграммы видно, что образцы под №№ 2642-39x556-10-1, 2642-39x556-10-3, №№ 2642-39x556-10-4, 2642-39x556-10-1 имеют специфичный ПЦР-продукт для гена *Pi-ta*; образцы под №№ 2645-143x124-11-1 и 2645-143x124-11-1 являются гетерозиготой по гену *Pi-b*; образец под №1 имеет доминантную аллель гена *Pi-ta* и является гетерозиготой по гену *Pi-b*.

Растения риса с генами устойчивости к пирикулярриозу передавались нами в селекционный процесс для изучения по комплексу хозяйственно-ценных признаков. В 2011–2013 гг. в селекционном питомнике после оценки и жёсткой браковки отобрано 23 линии для контрольного питомника, из которых в 2014 году выделилась по комплексу признаков устойчивая к пирикулярриозу, с хорошим качеством крупы и высокой урожайностью линия риса КП-171-14 с геном *Pi-ta*. Результаты оценки приведены в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика линии риса КП-171-14 в контрольном питомнике

Название линии / сорта	Урожайность, т/га	Вегетационный период, дней	Высота растения, см	Кол-во колосков в метёлке, шт.	Масса зерна с метёлки, г	Масса 1000 зёрен, г	l/b зерна	Выход крупы, %	ИРБ, %
КП-171-14	7.14	118	77.8	110.5	2.96	30.1	2.5	70.6	15.6
Флагман (стандарт)	5.38	116	73.8	130.6	3.35	27.9	1.9	69.9	34.5

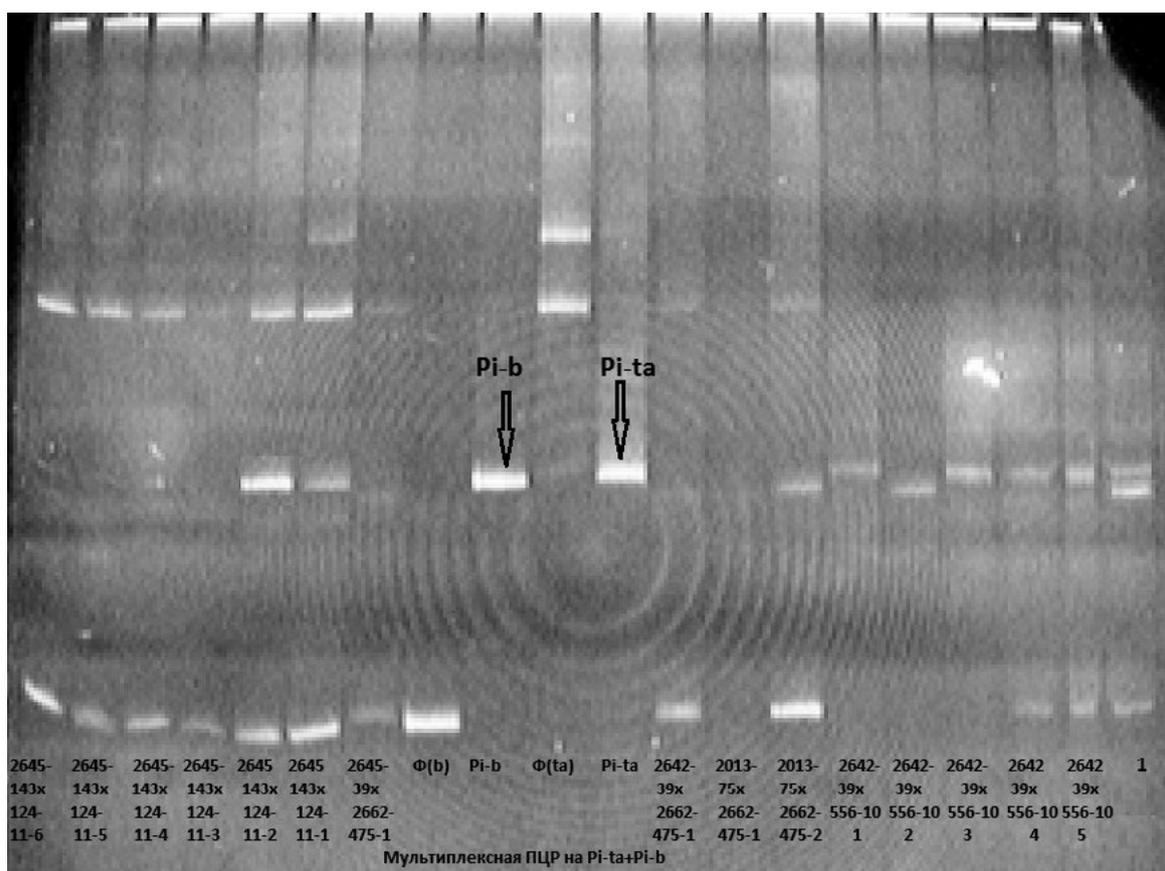
Примечание: l/b – отношение длины к ширине у зерновки; ИРБ-индекс развитие болезни.

В 2015 году эта линия изучалась в конкурсном сортоиспытании. Характеристика сортообразца риса КП-171-14 по результатам конкурсного испытания представлена в табл. 3.

Данные таблицы 3 показывают, что растения этой линии короткостебельные, 77–90 см, устойчивы к полеганию, а также к пирикулярриозу. Метёлка прямостоячая, компактная, длиной 14–15 см. Зерно удлинённое (l/b –

2.4), масса 1000 семян – 29–30 г. Выход крупы – 72 %. При пересчете на 1 га сформировала около 10 т зерна.

Изучение этой линии будет продолжено в конкурсном сортоиспытании с дальнейшей передачей её в государственное сортоиспытание. Кроме того, на разных этапах селекционного процесса будет продолжено изучение новых линий риса с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*.

Рисунок 2. Мультиплексная ПЦР на гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b+Pi-ta*

Примечание: 2645-143X124-11-1.....2642-39x556-10, Флх Virgo – гибридные растения;
 Ф(b) – сорт риса Флагман, проверяемый на ген *Pi-b*; Ф (ta) – сорт риса Флагман, проверяемый на ген *Pi-ta*;
Pi-b – линия риса В1-1 – донор гена *Pi-b*; *Pi-ta* – линия риса IR-36 – донор гена *Pi-ta*.

Таблица 3. Характеристика линии риса КП-171-14 в конкурсном сортоиспытании

Название линии / сорта	Урожайность, т/га	Вегетационный период, дней	Высота растения, см	Кол-во колосков в метёлке, шт.	Масса зерна с метёлки, г	Масса 1000 зёрен, г	l/b зерна	Выход крупы, %	ИРБ, %
КП-171-14	9.2	116	89.2	164.6	4.13	29.0	2.4	72.3	27.8
Флагман (стандарт)	7.1	116	91.0	147.0	3.61	26.7	1.9	71.6	36.7

Примечание: l/b- отношение длины к ширине у зерновки; ИРБ-индекс развитие болезни.

Параллельно в условиях полевого опыта на рисовой оросительной системе ВНИИ риса лабораторией защиты риса ежегодно проводится фитопатологический тест полученных линий с интрогрессированными и пирамидированными генами резистентности к *Pyricularia oryzae* Cav. *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* на проверку их устойчивости к смеси изолятов возбудителя пирикулярриоза, выделенных с полей Краснодарского края.

Инокуляцию растений проводят культурой спор гриба в фазе кущения, а также в фазе выметывание-цветение из расчета 0.5 мл на одно растение при 10^5 конидий/мл.

В качестве контроля используют устойчивый сорт риса Авангард, неустойчивого контроля – Победа 65. Учёт степени поражения растений проводят на 14 день после инокуляции.

Оценку осуществляют, учитывая два показателя: тип реакции (в баллах), используя при этом 10-балльную шкалу Международного института риса [Коло-

миец, 1990]; интенсивность развития болезни ИРБ (в процентах) согласно экспресс-методу оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу:

- устойчивые (0–1 баллов) – отсутствие поражения, мелкие коричневые пятна, покрывающие менее 25% общей поверхности листьев;
- среднеустойчивые (2–5 баллов) – типичные пирикулярриозные пятна эллиптической формы, 1–2 см длиной, покрывающие 25.1–50% общей поверхности листьев;
- неустойчивые (6–10 баллов) – типичные пирикулярриозные пятна эллиптической формы, 1–2 см длиной, покрывающие 50.1% и более общей поверхности листьев.

В результате, при совместном сотрудничестве с селекционерами и фитопатологами с использованием метода молекулярного маркирования на основе отечественного сорта риса Флагман, нами созданы сорта и сортообразцы с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z*, *Pi-40*.

Обсуждение и выводы

Проведено введение генов устойчивости *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* к *P. oryzae* в генотип отечественного сорта риса Флагман методом возвратных скрещиваний с контролем донорных аллелей ДНК-маркерами. Среди гибридных растений отобраны формы с оптимальным вегетационным периодом и наибольшей фертильностью колосков метелки. Маркерный анализ, а также фитопатологический тест полученных популяций выявил устойчивые к патогену образцы риса, несущие целевые гены в гомозиготном состоянии. Линия риса КП-171-14 подготовлена для передачи на государственное сортоиспытание. Она устойчива к краснодарской популяции патогена *Pyricularia oryzae* Cav., адаптирована к условиям выращивания на юге России, имеет высокую урожайность и качество крупы.

Созданные с помощью маркерной селекции линии и сорта риса могут служить хорошими донорами устойчивости к заболеванию и выступать в качестве родительских форм.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ р-а №16-44-230178 «Изучение генетической структуры популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. и научное обоснование иммуногенетической защиты культуры риса».

Библиографический список (References)

- Гаркуша С.В. Агротехнические особенности выращивания сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу / С.В. Гаркуша, С.А. Шевель, Н.Н. Малышева, С.А. Тешева, Г.Л. Зеленский, Н.В. Остапенко, А.Г. Зеленский, А.Р. Третьяков // Методические рекомендации. Краснодар. 2013. С. 43.
- Зеленский Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, рисовой листовой нематоде и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: автореф. ... докт. дис. Краснодар. 1993.
- Ильницкая Е.Т. Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу: дисс. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2007.
- Коломиец Т.М. Отбор исходного материала риса для селекции на иммунитет к пирикулярриозу: автореф. ... канд. дисс. Голицыно. 1990.
- Лось Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса / Г.Д. Лось // Сельскохозяйственная биология. 1987. N12. С.15–17.
- Мухина Ж.М. Создание внутригенных молекулярных маркеров риса для повышения эффективности селекционного и семеноводческого процессов / С.В. Токмаков, Ю.А. Мягких, Е.В. Дубина // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. 67 (03). (2011). HYPERLINK <http://ej.kubagro.ru/get.asp?id=1441&t=0>.
- Мухина Ж.М. Создание внутригенных ДНК-маркеров и их использование в практической селекции риса / Т.М. Коломиец, С.А. Волкова, Е.В. Дубина, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Ю.А. Мягких // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 3(22). 2003. С. 63–67.
- Коротенко Т.Л. Оценка исходного материала для селекции сортов риса с высоким качеством зерна: автореф. канд. дисс. Краснодар. 2006.
- Остерман Л.А. Методы исследования нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман // М.: Наука. 1981. С. 288.
- Berruyer B. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1. / B. Berruyer, H. Adreit, J. Milazzo, S. Gaillard // Theor. Appl. Genet. 2003. N 107. P. 1139–1147.
- Bonman J. Breeding rice for resistance to pest / J. Bonman, G. Khush, R. Nelson // Annu. Rev. Phytopathol. 1992. N 30. P. 507–528.
- Cho Y.G. The semidwarf gene, sd-1, of rice (*Oryza sativa* L.) / Y.G. Cho, M.Y. Eun, M. Couch, Y.A. Chae // II. Molecular mapping and marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet. 1994. N 89. P. 54–59.
- Correa-Victoria F.J. Gene combinations in rice for the development of durable resistance to *Pyricularia grisea* in Colombia / F.J. Correa-Victoria, D. Tharreau, C. Martinez, M. Vales // Proc. 3rd Int. Temperate Rice Conference. Punta del Este. 2003.
- Conaway-Bormans C.A. Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z*, in rice for use in marker-assisted selection / C.A. Conaway-Bormans, M.A. Marchetti, C.W. Johnson, A.M. McClung, W.D. Park // Theor. Appl. Genet. 2003. N 107. P.1014–1020.
- Jena K.K. Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding / K.K. Jena, H.P. Moon, D.J. Mackill // Korean J. Breed. 2003. N 35. P. 133–140.
- Jiang J. Identification of a 118-kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene *Pi-2(t)* in rice / J. Jiang and S. Wang // Mol. Genet. Genomics. 2002. N 268. P. 249–252.
- Girish Kumar K. Marker assisted backcross gene introgression of major genes for blast resistance in rice / K. Girish Kumar, S. Hittalmani, K. Srinivasachary // Advances in Rice Blast Research. 2000. P. 43–53.
- Hittalmani S. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice / S. Hittalmani, A. Parco, T.V. Mew, R.S. Zeigler, N. Huang // Theor. Appl. Genet. 2000. N 100. P. 112–1128.
- Kumar, S. Hittalmani, K. Srinivasachary // Advances in Rice Blast Research. 2000. P. 4–353.
- Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. // Thompson Nucleic Acids Research. 1980. N 10. P. 4321–4325.
- Openshaw S.J. Marker assisted selection in backcross breeding / S.J. Openshaw, S.J. Jarboe, W.D. Bears // In: Analysis of molecular marker data. Joint plant Breed. Symp. Ser., Corvallis, Oregon, USA. 1994. P. 41–43.
- Tabien R.E., Li Z. Mapping of four major blast resistance genes from “Lemont” and “Teqing” and evaluation of their combination effect for field resistance / R.E. Tabien, Z. Li, A.H. Paterson, M.A. Marchetti, J.W. Stansel, S.R.M. Pinson // Theor. Appl. Genet., 101. 2000. P. 1215–1225.
- Witcombe J.R. Resistance gene deployment strategies in cereal hybrids using marker-assisted selection: gene pyramiding, three-way hybrids, and synthetic parent populations / J.R. Witcombe, C.T. Hash // Euphytica. 2000. N 112. P.175–186.
- Garkusha S.V., Shevel S.A., Malyshev N.N., Tesheva S.A., Zelenskii G.L., Ostapenko N.V., Zelensky A.G., Tretyakov A.R. Agronomic features of cultivation of rice varieties resistant to blast. Metodicheskie rekomendacii. Krasnodar. 2013. P. 43. (In Russian).
- Il'nitskaya E.T. Molecular marking in rice breeding for resistance to blast. Diss. ...kand. biol. nauk. Krasnodar, 2007. 23 p. (In Russian).
- Kolomiets T.M. The selection of the starting material for rice breeding for immunity to blast. Avtoref. ... kand. diss. Golitsyno. 1990. 21 p. (In Russian).
- Korotenko T.L. Evaluation of initial material for breeding rice varieties with high quality grain. Avtoref. kand. diss. Krasnodar. 2006. 25 p. (In Russian).
- Los G.D. A promising method of rice hybridization. Agricultural Biology. 1987. N 12. P. 15–17. (In Russian).

- Mukhina Zh.M., Kolomiets T.M., Volkov S.A., Dubina E.V., Suprun I.I., Tokmakov S.V., Myagkikh Y.A. Creating intragenic DNA markers and their use in practical breeding of rice. Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2003. V. 3(22). P. 63–67. (In Russian).
- Mukhina Zh.M., Tokmakov S.V., Myagkikh Y.A., Dubina E.V. Creating intragenic rice molecular markers to improve the efficiency of breeding and seed production process. Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal KubGAU. 2011. V. 67 (03). P. 1–10. (In Russian).
- Osterman L.A. Methods of study of nucleic acids. Moscow: Nauka. 1981. 288 p. (In Russian).
- Zelenskii G.L. Selection of rice varieties resistant to blast, rice foliar nematodes and blight conditions in the Russian Federation. Avtoref. ... dokt. dis. Krasnodar. 1993. 48 p. (In Russian).

Plant Protection News, 2016, 4(90), p. 19–24

INTROGRESSION OF BLAST RESISTANCE GENES AS A FACTOR OF RESISTANCE STABILIZATION OF RICE PLANTS TO DISEASE

E.V. Dubina, V.N. Shilovskii, S.V. Garkusha, M.G. Ruban, L.V. Esaulova

All-Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Russia

An urgent task in the selection of rice (*Oryza sativa* L.) is to create varieties resistant to blast disease, which is the causative agent of the imperfect fungus *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr Yaegashi & Udagawa). The economic losses caused by the disease are high in all regions of the world rice cultivation. Application of a DNA technology is promising for solving the problem. The most common approach is based on the use of molecular markers. Their use holds a great promise for the detailed mapping of chromosomes, identification of genes responsible for economically valuable traits of the culture. The purpose of this work is the creation of highly productive varieties and rice lines with gene resistance to blast using a method of molecular marking to expedite this process, i.e. an incorporation of resistance genes Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b in the domestic rice cultivar Flagman. Identification of donor-borne resistance alleles of genes in the hybrid plants is carried out using microsatellite and intragenic molecular markers. As a result of a number of backcrossing breedings, the material is received with introduced and united genes resistant to blast, which is confirmed by PCR-analysis. The line CP-171–14 of the rice gene Pi-ta adapted to the conditions of cultivation in the south of Russia, resistant to the Krasnodar population of pathogen *Pyricularia oryzae* Cav., and having high yield and grain quality is prepared for transfer to the state variety trials. The introduction and cultivation of such varieties in rice growing will reduce the use of chemical means of protection, allow receiving ecologically clean agricultural products and avoid contamination of grain ecosystems.

Keywords: rice; resistance gene; PCR; micro-satellite marker; breeding.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ риса, 350921, г. Краснодар,
пос. Белозёрный, 3, Российская Федерация

*Дубина Елена Викторовна. Ведущий научный сотрудник,
кандидат биологических наук, e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Шиловский Валентин Николаевич. Главный научный сотрудник, доктор
сельскохозяйственных наук, e-mail: argr_kub@mail.ru

Гаркуша Сергей Валентинович. Профессор,
доктор сельскохозяйственных наук, e-mail: argr_kub@mail.ru

Рубан Маргарита Георгиевна, Научный сотрудник,
e-mail: argr_kub@mail.ru

Есаулова Любовь Владимировна. Ведущий научный сотрудник, кандидат
биологических наук, e-mail: l.esaulova@mail.ru

Information about the authors

All-Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Belozernyi 3,
Russian Federation

Dubina E.V. Leading Researcher, PhD in Biology,
e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Shilovskii V.N. Principal Researcher, DSc in Agriculture,
e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Garkusha S.V. Professor, DSc in Agriculture,
e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Ruban M.G. Researcher,
e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Esaulova L.V. Leading Researcher, PhD in Biology,
e-mail: l.esaulova@mail.ru

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence