




Оценка селекционных линий риса (*Oryza sativa* L.), содержащих ген *Pi-40*, на устойчивость к краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза

И.И. Супрун , В.С. Ковалев, Е.С. Харченко, Е.Г. Савенко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, пос. Белозерный, Россия

Пирикулярриоз, вызываемый грибным патогеном *Magnaporthe oryzae* В.С. Couch, 2002, представляет одно из наиболее вредоносных заболеваний риса (*Oryza sativa* L.), поэтому создание устойчивых сортов является актуальным направлением в селекции данной культуры. Важным этапом при формировании селекционной программы является оценка эффективности генов устойчивости по отношению к местной популяции возбудителя данного заболевания. В ходе исследования проведена оценка степени устойчивости гибридных форм BC1F3, созданных на основе отечественного сорта Хазар и содержащих ген *Pi-40*, в отношении к краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза. В работе оценивали устойчивость растений, несущих доминантный аллель гена *Pi-40* в гомозиготном состоянии. Для фитопатологического тестирования была использована синтетическая популяция *Magnaporthe oryzae*, состоящая из шести штаммов патогена, отобранных в различных районах рисосеяния на территории Краснодарского края и Ростовской области в сезон с эпифитотийным развитием пирикулярриоза. Оценивали устойчивость к метельчатой форме заболевания. В результате фитопатологического тестирования было выявлено, что отечественные сорта риса Диамант, Кураж и Хазар поражались заболеванием на высоком уровне (индекс развития болезни, ИРБ: 74,4; 57,9 и 83,3 % соответственно). Гибридные растения из популяции BC1F3 Хазар/IR 83260-2-10-5-2-1-B, несущие целевой ген, проявили высокий уровень устойчивости (ИРБ = 7,6 %). Они представляют ценность для селекции устойчивых к пирикулярриозу отечественных сортов риса. Полученные данные подтверждают широкий спектр устойчивости, определяемый геном *Pi-40*, и свидетельствуют о перспективности его использования в селекционных программах при создании сортов, устойчивых к популяции *Magnaporthe oryzae*, распространенной на территории Краснодарского края.

Ключевые слова: рис; селекция на устойчивость к пирикулярриозу; фитопатологическое тестирование; *Magnaporthe oryzae*; ген *Pi-40*; маркер-вспомогательная селекция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Супрун И.И., Ковалев В.С., Харченко Е.С., Савенко Е.Г. Оценка селекционных линий риса (*Oryza sativa* L.), содержащих ген *Pi-40*, на устойчивость к краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):333-336. DOI 10.18699/VJ16.131

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Suprun I.I., Kovalyev V.S., Kharchenko E.S., Savenko E.G. Assessment of breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.) carrying the *Pi-40* gene for resistance to rice blast strains from Krasnodar region. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):333-336. DOI 10.18699/VJ16.131

ORIGINAL ARTICLE

Received 02.12.2014 г.

Accepted for publication 12.01.2015 г.

© AUTHORS, 2016

Assessment of breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.) carrying the *Pi-40* gene for resistance to rice blast strains from Krasnodar region

I.I. Suprun , V.S. Kovalyev, E.S. Kharchenko, E.G. Savenko

All Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Belozerniy, Russia

Blast caused by fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch, 2002, is one of the most harmful diseases of rice (*Oryza sativa* L.), and so the development of resistant varieties is important in rice breeding. Evaluation of the efficacy of blast resistance genes against local populations of the blast pathogen is an important preliminary stage in the formation of the breeding program. In the course of the study, the level of resistance to blast pathogen was estimated for hybrid lines BC1F3 derived from local rice variety Khazar and containing the *Pi-40* gene. Plants carrying the dominant allele of the *Pi-40* gene in the homozygous state were used in the study. A synthetic population of *Magnaporthe oryzae* consists of six strains selected at different rice-growing regions in the Krasnodar territory and Rostov region in the season with epiphytotic development of blast disease was used for phytopathological evaluation. Resistance to neck and panicle blast was estimated. Phytopathological testing revealed that the disease had high prevalence in domestic rice varieties Diamant, Courage and Khazar (74.4 %, 57.9 % and 83.3 %, respectively). Khazar/IR 83260-2-10-5-2-1-B hybrid plants from population BC1F3 carrying the target gene showed a high level of resistance (7.6 % prevalence). They are valuable for breeding blast resistant varieties. These findings confirmed a wide spectrum of blast resistance of the *Pi-40* gene and promise for use for development of rice cultivars resistant to the population of *Magnaporthe oryzae* common in the Krasnodar territory.

Key words: rice; breeding for blast resistance; phytopathological testing; *Magnaporthe oryzae*; *Pi-40* gene; marker-assisted breeding.

Повышение экономической эффективности и экологической безопасности возделывания сельскохозяйственных культур, в том числе и риса, предполагает улучшение сортимента. Одним из ключевых признаков, по которому ведется селекция сортов, наряду с продуктивностью, является устойчивость к болезням. Возделывание устойчивых сортов позволяет существенно сократить нормы внесения средств защиты растений при сохранении урожайности на стабильном уровне (Система рисоводства..., 2005; Зеленский, 2013).

Для риса (*Oryza sativa* L.) пирикулярриоз, вызываемый грибным патогеном *Magnaporthe oryzae* В.С. Couch 2002, является одним из наиболее вредоносных заболеваний на всей территории его культивирования. В Краснодарском крае в условиях, благоприятных для развития патогена, наблюдается эпифитотийное развитие заболевания, которое приводит к значительному снижению урожайности (Система рисоводства..., 2005; Зеленский, 2013). Так, например, наиболее масштабная за последние 10 лет эпифитотия пирикулярриоза 2013 г. привела к поражению около 85 % посевной площади со средневзвешенным процентом распространенности 16,4–31,2 (Сасова, 2014). Для сравнения, данные показатели в 2012 г. составляли 2,3 %. В расчете на рыночную стоимость риса в 2013 г. потери урожая привели к экономическому ущербу в размере около 1,6–1,7 млрд рублей. В связи с этим создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса является одним из приоритетных направлений отечественной селекции данной культуры.

При создании устойчивых сортов перспективна интродукция в геном восприимчивых сортов генов, определяющих устойчивость к нескольким расам патогена (Deng et al., 2006). Создание генотипов, содержащих несколько генов устойчивости к пирикулярриозу, значительно облегчается с помощью технологии маркер-вспомогательной селекции (Jena et al., 2003; Leach et al., 2007). Данная технология в настоящее время используется во ВНИИ риса для интродукции в геном коммерческих сортов генов *Pi-40*, *Pi-9*, которые обеспечивают устойчивость к широкому спектру рас возбудителя пирикулярриоза (Супрун и др., 2013; Suprun et al., 2014).

Известно, что ген *Pi-40*, интрогрессированный в геном культурного риса *Oryza sativa* ssp. *japonica* от дикого вида *Oryza australensis*, локализован в коротком плече хромосомы 6 (Jeung et al., 2007; Suh et al., 2009). К настоящему времени идентифицировано два SSR-локуса (RM527 и RM 3330), фланкирующих ген *Pi-40* на расстоянии 1,1 и 2,4 сМ соответственно, а также разработан CAPS-маркер, тесно сцепленный с данным геном (Jeung et al., 2007).

Важным этапом создания устойчивых селекционных форм, несущих целевой ген устойчивости, является определение уровня устойчивости, детерминированной данным геном в отношении к местной популяции патогена. При этом целесообразно проводить как первичный анализ степени устойчивости линий-доноров генов резистентности, так и оценку эффективности данных генов, интрогрессированных в восприимчивые сорта-реципиенты. Это необходимо для получения достоверной информации об эффективности гена, так как наряду с главным геном

устойчивости, который вносит основной вклад в признак устойчивости, сорт-донор может нести минорные локусы, оказывающие влияние на формирование признака.

Ранее нами с применением маркер-вспомогательного отбора на основе отечественного сорта Хазар, восприимчивого к пирикулярриозу, были созданы гибридные формы, несущие ген *Pi-40*. Цель работы – оценка степени устойчивости гибридных форм BC1F3, созданных на основе сорта Хазар и содержащих ген *Pi-40*, в отношении к краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза *Magnaporthe oryzae*.

Материалы и методы

Оценивали устойчивость растений гибридной популяции BC1F3, полученной от скрещивания сорта Хазар с линией IR 83260-2-10-5-2-1-B, содержащей ген *Pi-40*. Исследовали растения, несущие доминантный аллель гена *Pi-40* в гомозиготном состоянии. В качестве восприимчивых сортов-стандартов использовали отечественные сорта риса Хазар, Кураж, Диамант.

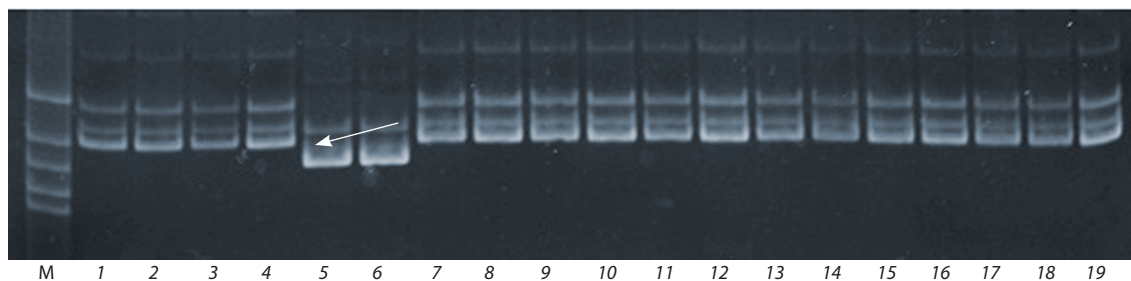
Для отбора гибридных растений, несущих доминантный аллель гена *Pi-40*, проводили анализ ДНК с SSR-маркерами RM527 и RM3330 (Jeung et al., 2007). Электрофорез продуктов ПЦР вели в 8 % полиакриламидном геле при напряжении 200 В в течение 2,5 ч. Гелевые пластины окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Для заражения была использована синтетическая популяция возбудителя пирикулярриоза. При изоляции гриба в чистую культуру применены методы прямого выделения гриба на питательную среду, а также из поражений с предварительным помещением во влажную камеру. Морфолого-культуральные характеристики штаммов описывали в соответствии с общепринятыми методиками (Коваленко и др., 1988).

Для инокуляции использовали споры материал, полученный из отобранных штаммов, выращенных на морковно-сахарозной агаризованной среде, и свежий (14-дневный) инокулюм патогена. Инокуляцию тестируемых линий проводили в фазы «кущение» и «выметывание-цветение» суспензией с титром конидий 30–40 спор в поле зрения микроскопа (увеличение 120×) с добавлением ПАВ Твин-80. Растения выращивали на вегетационной площадке в сосудах. Поражаемость растений оценивали через 20 дней после инокуляции по десятибалльной шкале, разработанной Международным институтом риса, на основании которой подсчитывали общий индекс развития болезни в процентах (ИРБ) (Коваленко и др., 1988).

Результаты и обсуждение

Популяция BC1F3 (Хазар/IR 83260-2-10-5-2-1-B) была отобрана из потомства растений BC1F2, несущих доминантный аллель гена *Pi-40* в гомозиготном состоянии (Супрун и др., 2013). Однако для дополнительного контроля наличия данного гена в геноме гибридных растений популяция BC1F3 была проанализирована с помощью SSR-маркеров RM527 и RM3330, фланкирующих данный ген. Результаты анализа растений популяции BC1F3 с SSR-маркером RM527 представлены на рисунке. Результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР ампли-



Results of the analysis of hybrid plants from BC1F3 population (cross combination Khazar/IR 83260-2-10-5-2-1-B) with DNA marker RM527

M, DNA ladder. Donor lines of the *Pi-40* gene: 1, IR 83260-2-10-5-2-1-B; 2, IR 83260-1-1-1-5-B; 3, IR 83260-1-1-7-2-1-4-B; 4, IR 83243-2-10-24-4-B. Other lanes: 5, Khazar cv.; 6, Severnyi cv.; 7–19, hybrid plants.

Response of rice plants to artificial blast inoculation

Variety	Lesion score	Disease development level, %	Blast resistance
Khazar (<i>Pi-40+</i>)	2,1,0,1,0,0,0,1,1,0,2,0,0,1,0,0	7.6	Resistant
Diamant	8,6,4,7,5,4,9,6,9,8,6,8,7	74.4	Susceptible
Кураж	5,8,6,6,9,8,4,5,3,3,3,3,5,5	57.9	Susceptible
Khazar*	9,9,9,5,8,9,9,1,9,7	83.3	Susceptible

* (Suprun et al., 2013).

фикации показали, что в геноме гибридных растений амплифицируется продукт длиной около 235 п. н. (рисунок, стрелка), что свидетельствует о наличии доминантного аллеля гена *Pi-40* у экспериментальных растений в гомозиготном состоянии. Размер ПЦР-продукта рецессивного аллеля около 215 п. н. (рисунок, образцы 5, 6).

Для фитопатологической оценки гибридных образцов BC1F3, несущих доминантный аллель гена *Pi-40* в гомозиготном состоянии и восприимчивых к пирикулярриозу отечественных сортов риса, использовали синтетическую популяцию патогена, представляющую смесь из шести штаммов возбудителя заболевания. Штаммы были выделены в чистую культуру из посевов пяти различных сортов риса в районах Краснодарского края (Темрюкский, Красноармейский, Абинский, Крымский, Краснодар), а также в Ростовской области и различались по своим морфолого-культуральным характеристикам. На территории Краснодарского края штаммы были выделены в 2013 г. во время эпифитотийного развития пирикулярриоза в регионе.

Оценка устойчивости образцов к пирикулярриозу, выполненная на основе анализа проявления метельчатой формы заболевания, показала наличие поражений у восприимчивых сортов-стандартов при отсутствии симптомов у гибридных образцов, несущих ген *Pi-40* (таблица).

Анализ достоверности межгрупповых различий в парах групп образцов 1/2, 1/3 и 1/4 выполнили на основе расчета *t*-критерия Стьюдента. Значения *t*-критерия – 13,05, 8,66 и 10,05 соответственно при $p \leq 0,01$ подтверждают достоверность различий в степени устойчивости между группами образцов 1/2, 1/3 и 1/4, что позволяет сделать заключение о более высоком уровне устойчивости к пирикулярриозу образцов с геном *Pi-40*.

Очевидно, что наибольшую степень устойчивости проявили гибридные растения, несущие ген широкого спектра *Pi-40*. При этом варьирование балла поражения у индивидуальных растений от 0 до 2 свидетельствует о высоком уровне устойчивости, детерминируемой геном *Pi-40*. В работе Jeung с коллегами (2007), в которой было выполнено картирование данного гена, также проводили сравнительный анализ степени устойчивости, формируемой этим геном. По результатам оценки листовой формы пирикулярриоза, линия риса с геном *Pi-40* проявила наибольшую степень устойчивости в сравнении с моногенными линиями, несущими гены устойчивости *Pib*, *Piz-5*, *Piz-t*, *Piz*, *Pi9*, *Pi3*, *Pi5*, *Pi1*, *Pik-s*, *Pik-p*, *Pita* и *Pita2*. Балл поражения для линии с геном *Pi-40* варьировал в пределах 0–1 по шестибальной шкале оценки степени поражения, использованной авторами. Наличие гена *Pi-40* при этом определило устойчивость более высокого уровня в сравнении с другим геном, *Pi-9*, детерминирующим резистентность к широкому спектру рас патогена. У моногенной линии, несущей ген *Pi-9*, был выявлен балл поражения «5» штаммом *Magnaporthe oryzae*, который не поражал линию с геном *Pi-40* (0 баллов) (Jeung et al., 2007). Следует отметить, что в исследовании, выполненном коллективом китайских ученых, моногенная линия IRBL9-W, несущая ген *Pi-9*, проявила устойчивость к 45 моноспоровым изолятам возбудителя пирикулярриоза различного эколого-географического происхождения, в то время как линия с геном *Pi-2*, который также относится к генам широкого спектра устойчивости, была восприимчива к 16 из них (Jun W et al., 2015).

Полученные нами данные дополняют научную информацию о спектре устойчивости, детерминируемой геном

Pi-40. Кроме того, результаты работы свидетельствуют о высоком уровне устойчивости к метельчатой форме заболевания, формируемой данным геном, наряду с устойчивостью к листовой форме пирикулярриоза.

При сравнении степени устойчивости к популяции возбудителя пирикулярриоза Краснодарского края, определяемой геном *Pi-40* и другим геном устойчивости, *Pi-b*, можно сделать вывод о том, что ген *Pi-40* определяет значительно более высокий уровень устойчивости. Так, у сорта Партнер, несущего ген *Pi-b*, при оценке в ГСИ в 2014 г. была выявлена величина показателя ИРБ на уровне 25 %. Очевидно, что селекционные образцы с геном *Pi-40*, изученные нами в ходе выполнения исследований, обладают значительно более высоким уровнем устойчивости (ИРБ 7,6 %).

Результаты нашего исследования подтверждают перспективность использования данного гена в селекционных программах по созданию образцов с устойчивостью к пирикулярриозу риса. Линии, созданные на генетической основе сорта Хазар и несущие ген *Pi-40*, представляют собой ценный селекционный материал, который в настоящее время используется в качестве родительских форм для проведения гибридизации с другими сортами нового поколения селекции ВНИИ риса. Это позволит получить широкий спектр ценных селекционных форм для создания сортов риса, обладающих длительной устойчивостью к пирикулярриозу и комплексом ценных агробиологических характеристик, соответствующих агроклиматическим условиям Краснодарского края.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-96598 r_yug_a, and the Administration of the Krasnoyarsk Krai.

The authors are grateful to Dr. K.K. Jena (International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines) for assistance in the obtaining of seeds of rice lines serving as donors of the *Pi-40* gene for broad-range resistance.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Deng Y., Zhu X., Shen Y., He Z. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:705-713. DOI 10.1007/s00122-006-0338-7
- Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection—a new paradigm in plant breeding. *Korean J. Breed. Sci.* 2003;35:133-140.
- Jeung J.U., Kim B.R., Cho Y.C., Han S.S., Moon H.P., Lee Y.T., Jena K.K. A novel gene, *Pi-40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115:1163-1177. DOI 10.1007/s00122-007-0642-x
- Jun W., Yanjun K., Jiandong B., Li Y., Tang M., Zhu X., Ponaya A., Xiao G., Li J., Li C., Song M.-Y., Cumagun C.J., Deng Q., Lu G., Jeon J.-S., Naqvi N.I., Zhou B. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. *New Phytologist.* 2015. DOI 10.1111/nph.13310
- Kovalenko E.D., Gorbunova Yu.V., Kovaleva A.A. Metodicheskie ukazaniya po otsenke ustoychivosti sortov risa k vozбудителю pirikulyarrioz [Guidelines for Evaluating the Resistance of Rice Varieties to the Blast Agent]. Moscow, All-Russia Research Institute of Plant Pathology, All-Russia Academy of Agricultural Sciences, 1988.
- Leach J.E., Davidson R., Liu B., Manosalva P., Mauleon R., Carrillo G., Bruce M., Stephens J., Diaz M.G., Nelson R., Vera Cruz C., Leung H. Understanding broad-spectrum durable resistance in rice. *Rice Genet.* Eds D.S. Brar, D.J. Mackill, B. Hardy. IRRI, World Science Press, 2007.
- Sasova N.A. Blast is a threat for rice yield! *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine.* 2014;6:48-49.
- Система рисоводства Краснодарского края: Рекомендации. Под ред. Е.М. Харитоновой [System of Rice Growing in the Krasnodar Krai: Recommendations. Ed. E.M. Kharitonov]. Krasnodar, All-Russia Research Institute of Rice, 2005.
- Suh J.P., Roh J.H., Cho Y.C., Han S.S., Kim Y.G., Jena K.K. The *Pi40* gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of *Pi40*-advanced backcross breeding lines. *Phytopathology.* 2009;99(3):243-250. DOI 10.1094/PHYTO-99-3-0243
- Супрун И.И., Ковалев В.С., Шиловский В.Н. Development of rice breeding lines carrying the *Pi-40* gene for wide-range blast resistance by using DNA markers. *Politematicheskij Setevoy Jelektronnyj Nauchnyj Zhurnal Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Multidisciplinary Online Scientific Journal of the Kuban State Agrarian University.* 2013;86:511-521.
- Супрун И., Ковалев В., Шиловский В., Мухина З. Marker assisted breeding for rice blast resistance in south region of Russian. *Proc. of the 4th Intern. Rice Congr. Bangkok. Thailand.* 27 Oct. – 1 Nov. 2014.
- Зеленский Г.Л. Борба с пирикulyарриозом риса путем создания устойчивых сортов [Rice Blast Control by Release of Resistant Varieties]. Krasnodar, Kuban State Agrarian University, 2013.