

ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2(1), 2019



Сайт: <http://vir.nw.ru/pbi/>
E-mail: pbi@vir.nw.ru



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ
РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н. И. ВАВИЛОВА (ВИР)



THE MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION
FEDERAL RESEARCH CENTER
THE N. I. VAVILOV ALL-RUSSIAN INSTITUTE OF
PLANT GENETIC RESOURCES (VIR)

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019 2(1)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

*Для биотехнологов, селекционеров,
генетиков, преподавателей вузов
биологического и сельскохозяйствен-
ного профиля.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000, Российская Федерация
г. Санкт-Петербург,
ул. Большая Морская, 42–44

© Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н. И. Вавилова
(ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77 – 74475
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2019 2(1)

FOUNDED IN 2018
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

*Addressed to biotechnologists,
geneticists, plant breeders and
lecturers of biological and agricultural
universities and colleges.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

42–44, Bolshaya Morskaya St.
St. Petersburg, 190000
Russian Federation

© Federal research center The N.I. Vavilov
All-Russian institute of plant genetic resources
(VIR)

Главный редактор: д. б. н., профессор РАН **Е. К. Хлесткина**

Заместитель главного редактора: д. б. н. **Т. А. Гавриленко**

Ответственные секретари: д. б. н. **И. Н. Анисимова**, д. т. н. **Л. Ю. Новикова**

Редакционный совет

А. И. Аbugалиева — д. б. н. (Казахстан)
О. С. Афанасенко — д. б. н., академик РАН (Россия)
Г. А. Баталова — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
Р. К. Берсимбаев — д. б. н., академик НАН РК (Казахстан)
Л. А. Беспалова — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
А. И. Грабовец — д. с.-х. н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. И. Гриб — д. с.-х. н., академик НАНБ (Беларусь)
Е. А. Егоров — д. э. н., академик РАН (Россия)
В. Г. Еремин — д. с.-х. н., профессор РАН (Россия)
Г. В. Еремин — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
Г. И. Карлов — д. б. н., чл.-корр. РАН (Россия)
А. В. Кильчевский — д. б. н., академик НАНБ (Беларусь)
З. А. Козловская — д. с.-х. н. (Беларусь)
Н. А. Колчанов — д. б. н., академик РАН (Россия)
В. Н. Корзун — д-р (Германия)
А. В. Кочетов — д. б. н., чл.-корр. РАН (Россия)
Н. В. Кухарчик — д. с.-х. н. (Беларусь)
В. М. Лукомец — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
Л. А. Лутова — д. б. н. (Россия)
С. Мишева — д-р (Болгария)
А. И. Моргунов — д-р (Турция)
В. Ройчев — д. с.-х. н. (Болгария)
А. А. Романенко — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
А. В. Рынди́н — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
Е. Н. Седов — д. с.-х. н., академик РАН (Россия)
К. Г. Скрябин — д. б. н., академик РАН (Россия)
И. А. Тихонович — д. б. н., академик РАН (Россия)
П. Н. Харченко — д. б. н., академик РАН (Россия)
Л. В. Хотылева — д. б. н., академик НАНБ (Беларусь)
В. К. Шумный — д. б. н., академик РАН (Россия)

Редакционная коллегия

Е. Е. Андронов — к. б. н. (Россия)
Д. А. Афонников — к. б. н. (Россия)
А. Х. Баймиев — д. б. н. (Россия)
И. А. Белан — к. с.-х. н. (Россия)
А. Г. Беседин — к. с.-х. н. (Россия)
М. А. Вишнякова — д. б. н. (Россия)
В. А. Гаврилова — д. б. н. (Россия)
С. В. Гаркуша — д. с.-х. н. (Россия)
Т. А. Гасанова — к. с.-х. н. (Россия)
С. В. Герасимова — к. б. н. (Россия)
М. С. Гинс — д. б. н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. В. Гончаров — д. б. н. (Россия)
Р. О. Давоян — д. б. н. (Россия)
Я. Н. Дему́рин — д. б. н. (Россия)
М. Г. Дивашук — к. б. н. (Россия)
С. Н. Еланский — д. б. н. (Россия)
О. В. Еремина — д. с.-х. н. (Россия)
А. П. Ермишин — д. б. н. (Беларусь)
М. В. Ефимова — к. б. н. (Россия)
Р. Ш. Заремук — д. с.-х. н. (Россия)
С. В. Зеленцов — д. с.-х. н. (Россия)
Е. Т. Ильницкая — к. б. н. (Россия)
Р. Н. Календарь — к. б. н. (Казахстан)
Н. Н. Карпун — к. б. н. (Россия)
В. С. Ковалев — д. с.-х. н. (Россия)
Н. Н. Коваленко — д. б. н. (Россия)
Е. З. Кочиева — д. б. н. (Россия)
Б. Р. Кулуев — д. б. н. (Россия)
К. У. Куркиев — д. б. н. (Россия)
С. В. Кушнаренко — к. б. н. (Казахстан)
И. Н. Леонова — д. б. н. (Россия)
И. Е. Лихенко — д. с.-х. н. (Россия)
В. В. Лиховской — д. с.-х. н. (Россия)
П. Н. Мальчиков — д. с.-х. н. (Россия)
Т. В. Матвеева — д. б. н. (Россия)
Н. В. Мироненко — д. б. н. (Россия)
И. В. Митрофанова — д. б. н. (Россия)
С. В. Осипова — д. б. н. (Россия)
В. Н. Подорожный — к. с.-х. н. (Россия)
Т. Г. Причко — д. с.-х. н. (Россия)
Т. А. Рожмина — д. б. н. (Россия)
А. В. Смыков — д. с.-х. н. (Россия)
А. А. Соловьев — д. б. н., профессор РАН (Россия)
И. И. Супрун — к. б. н. (Россия)
Е. К. Турусспеков — к. б. н. (Казахстан)
Е. В. Ульяновская — д. с.-х. н. (Россия)
О. Ю. Урбанович — д. б. н. (Беларусь)
Ю. В. Фотев — к. с.-х. н. (Россия)
Э. Б. Хатефов — д. б. н. (Россия)
Я. А. Цепилов — к. б. н. (Россия)
М. Н. Шаптуренко — д. б. н. (Беларусь)
О. Ю. Шоева — к. б. н. (Россия)
Л. А. Эльконин — д. б. н. (Россия)
Г. В. Якуба — к. б. н. (Россия)

Editor-in-Chief: E. K. Khlestkina Dr. Sci. in Biol., Professor

Deputy Editor-in-Chief: T. A. Gavrilenko Dr. Sci. in Biol.

Executive Secretaries: I. N. Anisimova Dr. Sci. in Biol., L. U. Novikova Dr. Sci. in Techn.

Editorial council

A. I. Abugalieva — Dr. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
O. S. Afanasenko — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
G. A. Batalova — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
R. K. Bersimbaev — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)
L. A. Bupalova — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
A. I. Grabovets — Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. I. Grib — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
E. A. Egorov — Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)
G. V. Eremin — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. G. Eremin — Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)
G. I. Karlov — Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
P. N. Kharchenko — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
L. V. Khotyleva — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kilchevsky — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
Z. A. Kozlovskaya — Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
N. A. Kolchanov — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
V. N. Korzun — Dr. (Germany)
A. V. Kochetov — Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
N. V. Kukharchik — Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
V. M. Lukomets — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
L. A. Lutova — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. Misheva — Dr. (Bulgaria)
A. I. Morgunov — Dr. (Turkey)
V. Roychev — Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)
A. A. Romanenko — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
A. V. Ryndin — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
E. N. Sedov — Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. K. Shumny — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
K. G. Skryabin — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
I. A. Tikhonovich — Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

Editorial board

E. E. Andronov — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
D. A. Afonnikov — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. H. Bajmiev — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. A. Belan — Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
A. G. Besedin — Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Garkusha — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Gasanova — Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
V. A. Gavrilova — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Gerasimova — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. S. Gins — Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. V. Goncharov — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
R. O. Davoyan — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. N. Demurin — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. G. Divashuk — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
S. N. Elansky — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L. A. Elkonin — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O. V. Eremina — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. P. Ermishin — Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
M. V. Efimova — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
Yu. V. Fotev — Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
E. T. Ilnitskaya — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. N. Kalendar — Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
N. N. Karpun — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. B. Khatefov — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. Z. Kochieva — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. N. Kovalenko — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. S. Kovalev — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
B. R. Kuluev — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
K. U. Kurkiev — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Kushnarenko — Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
I. N. Leonova — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. E. Lihenko — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
V. V. Likhovskoi — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
P. N. Malchikov — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. V. Matveeva — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. V. Mironenko — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. V. Mitrofanova — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Osipova — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. N. Podorozhniy — Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
T. G. Prichko — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Rozhmina — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. N. Shapturenko — Dr. Sci. Biology (Belarus)
A. V. Smykov — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. A. Soloviev — Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)
I. I. Suprun — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. K. Turuspekov — Cand. Sci. in Biol.
E. V. Ulyanovskaya — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
O. Yu. Urbanovich — Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Ya. A. Tsepilov — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
O. Yu. Shoeva — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. A. Vishnyakova — Dr. Sci. in Biol. (Russia)
G. V. Yakuba — Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. Sh. Zaremuk — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Zelentsov — Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

Содержание

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 5

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 7

Супрун И. И., Ковалев В. С., Коротенко Т. Л., Степанов И. В., Лободина Е. В.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ВЗАИМОСВЯЗЕЙ СОРТОВ
РИСА ИЗ РАЗНЫХ ЭКОЛОГО-
ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ГРУПП
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
SSR-МАРКЕРОВ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 16

Дубина Е. В., Шиловский В. Н., Костылев П. И., Рубан М. Г., Оглы А. М.

СОЗДАНИЕ СОРТОВ
РИСА, УСТОЙЧИВЫХ
К ПИРИКУЛЯРИОЗУ,
НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 24

Батурин С. О., Филипенко Е. А.

АНЕУПЛОИДИЯ
ПРИ СКРЕЩИВАНИЯХ
FRAGARIA × *ANANASSA DUCH* ×
POTENTILLA ANSERINA L.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 32

Хатефов Э. Б., Хореза В. И., Керв Ю. А., Шеленга Т. В.

ОСОБЕННОСТИ
БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА
ЗЕРНА ТЕТРАПЛОИДНОЙ
КУКУРУЗЫ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 42

Клименко Н. С., Гавриленко Т. А., Костина Л. И., Мамадбокирова Ф. Т., Антонова О. Ю.

ПОИСК ИСТОЧНИКОВ
УСТОЙЧИВОСТИ К *GLOBODERA*
PALLIDA И К PVX В КОЛЛЕКЦИИ
ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СОРТОВ
КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

ОБЗОР 49

Хлесткина Е. К.

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ
РИСА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

Contents

FROM THE EDITOR IN CHIEF 5

ORIGINAL ARTICLE 7

*Suprun I. I., Kovalyov V. S., Korotenko T. L.,
Stepanov I. V., Lobodina E. V.*

ANALYSIS OF GENETIC
RELATIONSHIPS AMONG RICE
CULTIVARS FROM DIFFERENT
ECOGEOGRAPHIC GROUPS USING
SSR MARKERS

ORIGINAL ARTICLE 16

*Dubina E. V., Shilovsky V. N., Kostylev P. I.,
Ruban M. G., Ogly A. M.*

DEVELOPMENT OF BLAST-
RESISTANT RICE VARIETIES
BASED ON APPLICATION OF DNA
TECHNOLOGIES

ORIGINAL ARTICLE 24

Baturin S. O., Filipenko E. A.

ANEUPLOIDY IN INTERGENERIC
CROSSES BETWEEN *FRAGARIA* ×
ANANASSA DUCH. × *POTENTILLA*
ANSERINA L.

ORIGINAL ARTICLE 32

*Khatefov E. B., Horeva V. I., Kerv Yu. A.,
Shelenga T. V.*

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF
TETRAPLOID MAIZE GRAIN

ORIGINAL ARTICLE 42

*Klimenko N. S., Gavrilenko T. A., Kostina L. I.,
Mamadbokirova F. T., Antonova O. Yu.*

SEARCH FOR RESISTANCE SOURCES
TO *GLOBODERA PALLIDA*
AND POTATO VIRUS X IN THE
COLLECTION OF POTATO VARIETIES
USING MOLECULAR MARKERS

REVIEW 49

Khlestkina E. K.

RICE GENOME EDITING USING
CRISPR/CAS SYSTEM

Уважаемые читатели!

Представляем вашему вниманию второй выпуск нового периодического научного журнала «Биотехнология и селекция растений», на страницах которого публикуются оригинальные результаты исследований, обзорные статьи, протоколы и методы в области прикладной биотехнологии культурных растений, а также результаты традиционной селекции в сочетании с технологиями *in vitro*, методами геномной и маркер-ориентированной селекции, геномного редактирования, отдаленной гибридизации, клеточной и хромосомной инженерии (<http://new.vir.nw.ru/pbi/>).

Возможности применения методов современной селекции к той или иной культуре напрямую зависят от степени изученности генома данного вида. Среди геномов сельскохозяйственных видов растений первым был секвенирован геном риса, что во многом определяет опережающие темпы развития как генетических исследований, так и технологий маркер-ориентированной селекции и геномного редактирования данной культуры. В текущем выпуске журнала представлены результаты работы отечественных селекционеров по созданию сортов риса, устойчивых к пирикуляриозу, на основе применения ДНК-технологий. Маркер-контролируемый отбор потомства от трех возвратных скрещиваний с использованием маркера гена *Pi-ta* распецифической устойчивости риса к пирикуляриозу позволил выделить несколько устойчивых образцов, переданных в дальнейшем в ГСИ.

Одним из преимуществ метода маркер-ориентированной селекции является возможность проводить отбор источников устойчивости растений к объектам внешнего и внутреннего карантина. В данном выпуске представлены результаты использования аллель-специфичного ДНК маркера гена устойчивости к бледной картофельной нематоды для идентификации потенциально устойчивых генотипов в коллекции сортов картофеля.

При подборе родительских пар для скрещиваний ценной является информация о степени их генетического сходства. Наиболее распространенной системой выяснения генетических взаимосвязей сортов риса является микросателлитный (SSR) анализ. В выпуске представлены результаты SSR-анализа современных сортов риса из России, Средней и Восточной Азии, которые представляют различные эколого-географические группы.

Полученные к настоящему моменту сведения о структурно-функциональной организации большого числа генов риса предоставляют возможность широкого выбора генов-мишеней для селекции следующего поколения, основанной на методах направленного мутагенеза. Одним из наиболее эффективных



методов направленного мутагенеза является геномное редактирование при помощи системы CRISPR/Cas. На сегодняшний день эта система апробирована на десятках генов-мишеней риса, из которых мутации более чем в 30 генах привели к желаемому улучшению селекционно значимых свойств. В обзорной статье, публикуемой в данном выпуске, представлен анализ работ в этом направлении. Отмечается, что в эти исследования вовлечены уже около полусотни различных генотипов риса, что создает предпосылки для широкого практического применения технологий геномного редактирования в программах по селекции данной культуры. Становится все больше примеров использования системы редактирования CRISPR/Cas не только для нокаута генов, способствующих проявлению нежелательных свойств, но и для модификации или замены аллельных вариантов генов-мишеней. Таким образом можно расширять генетическое разнообразие культурных видов, в том числе внося изменения, идентичные встречаемым у диких родичей, которые способствуют улучшению свойств культурных растений. В будущем это позволит обойти сложности, с которыми экспериментаторы сталкиваются при проведении отдаленной гибридизации с целью передачи культурным растениям аллелей диких родичей путем рекомбинации.

В хромосомной инженерии потенциал отдаленной гибридизации используется как для создания интрогрессивных форм, так и для получения анеуплоидных и делеционных линий культурных видов растений. Для некоторых таксонов сценарии геномных из-

менений, происходящие в результате отдаленной гибридизации, хорошо изучены. Однако есть менее исследованные в этом направлении виды. В выпуске представлена статья, описывающая результаты изучения формы, полученной при скрещивании представителей родов *Fragaria* L. и *Potentilla* L. Комплексное исследование с использованием ДНК-маркеров и цитогенетических методов анализа позволило установить, что в результате скрещиваний произошла редукция хромосомного набора октоплоидной родительской формы *Fragaria* × *ananassa* Duch. до гексаплоидной. Другой известный сценарий скрещивания данной родительской формы с представителями рода *Potentilla* — получение октоплоидных партеногенетических потомков.

Данные сравнительного анализа геномов указывают на то, что многие представители царства растений прошли в ходе своего эволюционного развития через аллополиплоидизацию с последующей диплоидизацией, сопровождаемой множественными хромосомными перестройками. Например, современная диплоидная кукуруза является результатом цепочки произошедших еще до ее одомашнивания событий, включавших по два акта полиплоидизации и диплоидизации. Сегодня эксперименты с полиплоидизацией кукурузы продолжают уже в рамках целенаправленных селекционных работ. Тетраплоидная сахарная кукуруза отличается высокой урожайностью, а результаты исследования, представленные в данном выпуске, указывают на большую вариабельность признаков тетраплоидных форм по сравнению с диплоидными, включая свойства, связанные с биохимическим составом зерна. Создание гибридов сахарной кукурузы на основе тетраплоидных линий, описанных в статье, позволит

существенно увеличить генетический полиморфизм и расширить современный сортимент кукурузы.

Мы приглашаем наших читателей рассказать о своих достижениях в области биотехнологии и селекции растений на страницах журнала (<https://biosel.elpub.ru/jour>). Также приглашаем принять участие в международном конгрессе «VII съезд ВОГиС, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы», который состоится в Санкт-Петербурге 18–22 июня 2019 года (<https://events.spbu.ru/events/genetic-selection-2019>). Его программа включает несколько заседаний, темы которых так или иначе связаны с направлением нашего журнала. Это симпозиумы «Селекция и биотехнология растений», «Генетические основы селекции», «Редактирование генома», «Биоресурсные коллекции и геномные биобанки», а также ассоциированная с Конгрессом конференция «Хлеба будущего», приуроченная к 125-летию ВИР.

Главный редактор,
профессор РАН,
Е. К. Хлесткина

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ СОРТОВ РИСА ИЗ РАЗНЫХ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ГРУПП С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR МАРКЕРОВ

Супрун И. И.^{1,2}, Ковалев В. С.¹, Коротенко Т. Л.¹, Степанов И. В.², Лободина Е. В.²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт риса 350921, Россия, г. Краснодар, п. Белозерный, д. 3

² Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия. 350901, Россия, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, д. 39

e-mail: supruni@mail.ru

Микросателлитные ДНК-маркеры нашли широкое применение в генетических исследованиях риса: как в части изучения генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов, выяснении микроэволюционных процессов в пределах рода *Oryza L.* и при анализе генетических взаимосвязей генофондов из разных регионов мира, так и в картировании генов, при выполнении маркер-опосредованного отбора в селекции, а также ДНК-паспортизации сортов. Учитывая объем коллекции генофонда Всероссийского научно-исследовательского института риса, насчитывающей в общей сложности около 7000 образцов, актуальным является вопрос анализа ее генетической структуры и изучения генетического разнообразия, в том числе и с использованием молекулярно-генетических методов. Целью работы являлось выяснение генетических взаимосвязей современных отечественных сортов риса и сортов из различных регионов Азии (Средняя Азия, Восточная Азия) и представляющих различные эколого-географические группы с применением микросателлитных ДНК-маркеров. Объектом исследования являлись 32 сорта риса, представляющие три различных эколого-географических группы: восточную, среднеазиатскую и европейскую. В работе использовали 10 SSR-маркеров, по которым было выявлено от двух (RM11, RM316, RM19) до восьми аллелей (RM1). Суммарно по десяти локусам было идентифицировано 46 аллелей. Среднее значение показателя PIC – 0,45. Результаты Байесовского анализа и кластеризации методом UPGMA позволили сделать заключение о сложной генетической структуре изученной выборки образцов, что согласуется с наличием сортов из разных эколого-географических групп (ЭГГ). Был выявлен ряд сортов, занимающих переходное положение между эколого-географическими группами, что, очевидно, является следствием активного использования в селекции скрещиваний сортов, относящихся к разным ЭГГ. Отнесение отечественных сортов, которые, в соответствии с морфологическими характеристиками, принадлежат к европейской эколого-географической группе, к группе сортов, включающей также некоторые сорта из средней Азии и из восточной ЭГГ, является следствием использования в отечественной селекции сортов, принадлежавших к данному эколого-географическим группам.

Ключевые слова: рис, *Oryza sativa*, коллекции генофонда, генетическое разнообразие, микросателлитные ДНК-маркеры, эколого-географические группы сортов.

Благодарности: Исследование выполнено при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-44-230244 p_a)

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Супрун И. И., Ковалев В. С., Коротенко Т. Л., Степанов И. В., Лободина Е. В. Анализ генетических взаимосвязей сортов риса из разных эколого-географических групп с использованием SSR-маркеров.

Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 7-15.

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-7-15

Suprun I. I., Kovalyov V. S., Korotenko T. L., Stepanov I. V., Lobodina E. V. Analysis of genetic relationships among rice cultivars from different ecogeographic groups using SSR markers.

Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 7-15.

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-7-15

Супрун И. И. orcid.org/0000-0003-0355-8395 [1]

ANALYSIS OF GENETIC RELATIONSHIPS AMONG RICE CULTIVARS FROM DIFFERENT ECOGEOGRAPHIC GROUPS USING SSR MARKERS

Suprun I. I.^{1,2}, Kovalyov V. S.¹, Korotenko T. L.¹, Stepanov I. V.², Lobodina E. V.²

¹ All-Russian Rice Research Institute 3, pos. Belozerny, Krasnodar, 350921, Russia

² North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture and Winemaking 39, ul. 40-letia Pobedy, Krasnodar, 350901, Russia

e-mail: supruni@mail.ru

Microsatellite DNA markers are widely used in genetic research on rice: for studying the genetic diversity of genetic resources collections, identifying microevolutionary processes within the genus *Oryza L.* and analyzing genetic relationships of gene pools from different regions of the world, as well as in gene mapping and performing marker-assisted selection in breeding. Given the size of the collection held by the All-Russian Rice Research Institute, which has a total of about 7,000 accessions, it is important to analyze its genetic structure and study genetic diversity, including the use of molecular genetic methods. The aim of the work was to clarify the genetic relationships among modern Russian rice varieties and varieties from different regions of Asia (Central Asia or East Asia) representing various ecogeographic groups using microsatellite DNA markers. The material of the study was 32 rice cultivars representing three different ecogeographic groups: Eastern, Central Asian and European. We used 10 SSR markers, which showed a level of polymorphism from 2 (RM11, RM316, RM19) to 8 alleles (RM1). For a total of ten loci, 46 alleles were identified. The average PIC was 0.45. The results of the Bayesian analysis and clustering using the UPGMA method made it possible to make a conclusion about the complex genetic structure of the set of the studied cultivars, which is consistent with the presence of cultivars from different ecogeographic groups (EGG). A number of cultivars that occupy an intermediate position between ecogeographic groups were identified, which obviously is a consequence of the active use of crosses between cultivars belonging to different EGGs in the process of breeding. Russian cultivars, which according to their morphological characteristics belong to the European ecogeographic group, were attributed to the group which also included some varieties from Central Asia and from the Eastern EGG. It was a consequence of the use of cultivars belonging to different ecogeographic groups in domestic breeding programs.

Keywords: rice, *Oryza sativa*, germplasm collections, genetic diversity, microsatellite DNA markers, ecogeographic groups of cultivars.

УДК: 575.22 : 633.181.2

Поступила в редакцию: 08.12.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Введение

Микросателлитные ДНК-маркеры в настоящее время широко используются при изучении генетических ресурсов культурных растений. Они эффективно применяются в оценке генетического разнообразия – как в части изучения генетической структуры коллекций генетических ресурсов, так и при выяснении путей формирования локальных генофондов и их взаимосвязей с генплазмой из других регионов возделывания культур. Наряду с этим SSR-маркеры эффективно используются в популяционно-генетических исследованиях, в картировании генов и при выполнении маркер-опосредованного отбора в селекции, а также для ДНК-паспортизации сортов и определения сортовой принадлежности образцов.

Высокая эффективность SSR-маркеров во многом обеспечивается некоторыми их характеристиками: высоким уровнем аллельного полиморфизма SSR-локусов, кодоминантностью, удобством в работе и высоким уровнем воспроизводимости результатов, распределением по всему геному, позволяющим получать генетические карты с достаточным уровнем насыщения.

Суммарное количество микросателлитных локусов с ди-, три- и тетра-нуклеотидным повтором у риса составляет около 100 000. При этом области генома, которые более богаты генами, также являются более богатыми и на SSR-последовательности (McCouch et al., 2008).

В генетических исследованиях риса микросателлитные ДНК-маркеры широко используются: при изучении генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов, выяснении микроэволюционных процессов в пределах рода *Oryza* L., при анализе генетических взаимосвязей генофондов из разных регионов мира.

Одним из примеров использования SSR-маркеров для выяснения путей формирования автохтонного культурного генофонда является работа группы индийских исследователей, в которой были изучены генетические взаимосвязи между дикорастущими местными видами риса, стародавними сортами местной селекции и новыми, современными сортами. На основе анализа полиморфизма 25 SSR-маркеров было выявлено, что наибольшим уровнем полиморфизма обладала выборка видовых образцов, наименьшим – выборка, включавшая современные сорта, а стародавние сорта местной селекции по уровню полиморфизма заняли промежуточное положение. На основе этого авторы сделали вывод о перспективности включения в селекционный процесс автохтонных сортов с целью увеличения уровня генетического разнообразия культурного генофонда риса (Ram et al., 2007). Анализ генетических взаимосвязей с использованием 50 SSR-маркеров в репрезентативной выборке, включавшей 23 сорта риса из генетических коллекций Ирана, позволил разделить сорта на группы, соответствующие их происхождению: автохтонные сорта местной селекции,

современные иранские сорта и сорта подвида *indica* из Азии, а также группу, включающую сорта подвида *japonica* (Moumeni et al., 2003).

В совместной работе китайских и южнокорейских ученых на основе анализа SSR-полиморфизма в выборке из 150 сортов риса было установлено, что представленные группы китайских и южнокорейских сортов обладают близким уровнем полиморфизма, превышающим аналогичный показатель выборки японских сортов (Weiguo et al., 2009). В работе Yelome с соавторами SSR-маркеры были успешно применены для оценки генетических взаимосвязей и структуры репрезентативной выборки, включавшей 42 сорта риса из шести стран Западной Африки и представлявшей собой коллекцию, сформированную по географическому принципу и на основе данных о генетических дистанциях между сортами. В данной работе SSR-маркеры, использованные в сочетании с AFLP-маркерами для анализа сортов, принадлежащих к видам *Oryza glaberrima* L. и *Oryza sativa* L., позволили выявить наличие потока генов между данными видами. Это выразилось в наличии общих аллелей по значительному количеству SSR-маркеров (по 18 из 20) для ряда сортов, принадлежащих к этим двум видам и вошедшим в общие группы генетического сходства (Yelome et al., 2018).

Помимо изучения генетической структуры и уровня полиморфизма коллекций генофондов, SSR-маркеры успешно применяются и при изучении генетического разнообразия природных популяций дикорастущих предковых видов риса (Gao et al., 2005), а также в исследованиях процессов образования автохтонного генофонда и вклада местных видов в его формирование (Choudhary et al., 2013; Michael et al., 2007; Basabdatta et al., 2013).

Коллекция генофонда Всероссийского научно-исследовательского института риса насчитывает порядка 7000 образцов: рабочей коллекции – около 5000 образцов, мировой коллекции ВИР – 208 образцов и около 2000 форм риса, интродуцированных из 40 стран мира. При этом генофонд представлен 82 разновидностями и двумя подвидами: *Oryza sativa* subsp. *indica* и *Oryza sativa* subsp. *japonica*. В коллекции представлены образцы, относящиеся к 7 эколого-географическим группам (ЭГГ). Существенная часть современных сортов может проявлять переходные между эколого-географическими группами характеристики. Имеется значительное разнообразие по признакам морфотипа растений: высота растений, форма метелки, ширина и длина листовой пластины, угол отклонения флагового листа от стебля, окраска и опушенность листа и пр. Из интродуцированного генофонда по адаптивности к условиям региона в качестве наиболее перспективных можно определить раннеспелые формы из Японии, Кореи, Казахстана и Украины (Korotenko, 2018).

Изучение эколого-географического и внутривидового разнообразия риса позволяет определять параметры, по которым отбираются генотипы, соответствующие

требованиям селекции рисосеющего региона России. Одним из эффективных инструментов при определении уровня разнообразия коллекций генофонда и ее структуры являются ДНК-маркеры, среди которых микросателлиты можно выделить как одни из наиболее перспективных. В России до настоящего времени не выполнялось исследований, направленных на изучение генетических взаимосвязей отечественных сортов риса и сортов, представляющих разные эколого-географические группы. В связи с этим целью работы являлось выяснение генетических взаимосвязей современных отечественных сортов риса и сортов из различных регионов Азии (Средняя

Азия, Восточная Азия), представляющих различные эколого-географические группы.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили 32 сорта риса из коллекции генофонда Всероссийского научно-исследовательского института риса (г. Краснодар, пос. Белозерный), подвида *japonica*, представляющие различные эколого-географические группы. Сорта и их краткая характеристика приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика коллекционных образцов риса по биологическим и морфологическим признакам

Table 1. Characteristics of the rice accessions according to their biological and morphological traits

| № п. п. | Сорта | Страна | ЭГГ | Разновидность | Период вегетации, дней | Высота растений, см | Форма метелки |
|---------|-----------|---------------------|-------------|------------------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 1. | Фаворит | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 112 | 96,0 | слаборазвесистая |
| 2. | Диамант | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 114 | 85,0 | компактная |
| 3. | Анаит | Россия | Европейская | <i>subvulgaris</i> | 105 | 102,0 | среднеразвесистая |
| 4. | Вираж | Россия | Европейская | <i>nigro-apiculata</i> | 105 | 86,0 | компактная |
| 5. | Дружный | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 110 | 97,5 | слаборазвесистая |
| 6. | Кулон | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 126 | 78,0 | компактная |
| 7. | Лиман | Россия | Европейская | <i>subvulgaris</i> | 118 | 94,0 | компактная |
| 8. | Олимп | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 120 | 87,0 | компактная |
| 9. | Полевик | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 107 | 94,0 | слаборазвесистая |
| 10. | Регул | Россия | Европейская | <i>subvulgaris</i> | 115 | 88,0 | компактная |
| 11. | Ренар | Россия | Европейская | <i>nigro-apiculata</i> | 120 | 96,0 | слаборазвесистая |
| 12. | Славянец | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 116 | 89,0 | компактная |
| 13. | Соната | Россия | Европейская | <i>nigro-apiculata</i> | 117 | 98,5 | компактная |
| 14. | Старт | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 114 | 75,0 | компактная |
| 15. | Янтарь | Россия | Европейская | <i>italica</i> | 110 | 95,0 | компактная |
| 16. | Китайский | Россия/ Приморье | Восточная | <i>italica</i> | 102 | 83,0 | слаборазвесистая |
| 17. | Уссур | Россия/ Приморье | Восточная | <i>italica</i> | 98 | 87,0 | слаборазвесистая |

| № п.п. | Сорта | Страна | ЭГГ | Разновидность | Период вегетации, дней | Высота растений, см | Форма метелки |
|--------|---------------|---------------------|-----------------|-----------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 18. | Приморский 29 | Россия/ Приморье | Восточная | italica | 95 | 97,0 | слаборазвесистая |
| 19. | Талмас 2 | Узбекистан | Среднеазиатская | italica | 110 | 82,0 | слаборазвесистая |
| 20. | Арал 22 | Казахстан | Среднеазиатская | zeravschanica | 85 | 101,5 | среднеразвесистая |
| 21. | Крос 358 | Казахстан | Среднеазиатская | erythroceros | 105 | 90,5 | среднеразвесистая |
| 22. | Баканасский | Казахстан | Среднеазиатская | vulgaris | 108 | 105,0 | среднеразвесистая |
| 23. | Баракат | Казахстан | Среднеазиатская | italica | 100 | 85,0 | слаборазвесистая |
| 24. | Odaebueo | Корея | Восточная | italica | 120 | 75,8 | среднеразвесистая |
| 25. | Jibu | Корея | Восточная | italica | 125 | 76,0 | слаборазвесистая |
| 26. | Undong 5 | Корея | Восточная | italica | 105 | 94,0 | слаборазвесистая |
| 27. | Geumobueo | Корея | Восточная | italica | 118 | 82,5 | слаборазвесистая |
| 28. | Kuro-mochi | Япония | Восточная | paluedica | 98 | 104,0 | среднеразвесистая |
| 29. | Kanto 51 | Япония | Восточная | nigro-apiculata | 148 | 77,0 | среднеразвесистая |
| 30. | Ischikari | Япония | Восточная | italica | 128 | 88,0 | среднеразвесистая |
| 31. | Aichi Asachi | Япония | Восточная | italica | 130 | 77,0 | слаборазвесистая |
| 32. | Igisakau | Япония | Восточная | italica | 112 | 75,0 | слаборазвесистая |

Экстракцию ДНК проводили из 7–10-дневных проростков методом ЦТАБ (Murray, 1980). В работе использовали следующие микросателлитные ДНК-маркеры: RM1, RM11, RM122, RM168, RM167, RM164, RM44, RM316, RM19, RM474 (Panaud et al., 1996; McCouch et al., 1997). При генотипировании SSR-маркеры распределили в мультиплексные наборы, как апробированные ранее, так и сформированные в ходе выполнения исследования (Suprun et al., 2015). Для всех мультиплексных наборов использовали общие, унифицированные реакционные условия. ПЦР проводили в 25 мкл смеси содержащей 50–70 нг ДНК, 0,1 мМ dNTPs (дезоксинуклеотидтрифосфаты), 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл 10X реакционного буфера, 2,5 мМ MgCl₂, 1 е.а. Taq-полимеразы. ПЦР проводили по следующей схеме: 5 мин при 95 °С – начальная денатурация, далее 35 циклов: 30 секунд денатурации при 95 °С, 30 сек отжиг праймеров при 57 °С, 30 сек элонгация при 72 °С; финальный цикл элонгации – 3 мин при 72 °С. ДНК-амплификацию проводили в амплификаторе Bio-Rad T100. Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1. Для статистической обработки результатов SSR-генотипирования и анализа генетических взаимосвязей изученной выборки генотипов использова-

ли пакет программ PAST version 2.17c. Для оценки генетической структуры выборки использовалась программа Structure 2.3.4. В расчете были использованы различные значения гипотетических популяций от K = 2 до K = 5 (burn-in period = 500,000; 500,000 iterations).

Результаты

Использование мультиплексного анализа при унифицированных условиях ПЦР позволило выполнить эффективную идентификацию целевых амплифицированных фрагментов при проведении электрофоретического анализа (рис. 1).

Как видно из рисунка, для каждого из маркеров идентифицируются специфичные для него пики на электрофореграмме, соответствующие флуорофору каждого из маркеров.

В результате анализа экспериментальной выборки образцов, включающей 32 сорта и представляющей генотипы риса из пяти стран и трех эколого-географических зон, был выявлен уровень аллельного полиморфизма от двух до восьми аллелей на локус (табл. 2). Суммарное количество аллелей по десяти использованным SSR-маркерам составило 46 при среднем показателе 4,6 аллелей на локус. Показатель PIC варьировал от 0,1103 до 0,7715 при среднем значении 0,45064. Как видно из таблицы, наиболее полиморфными оказались SSR-маркеры RM1, RM 122, RM164, RM44.

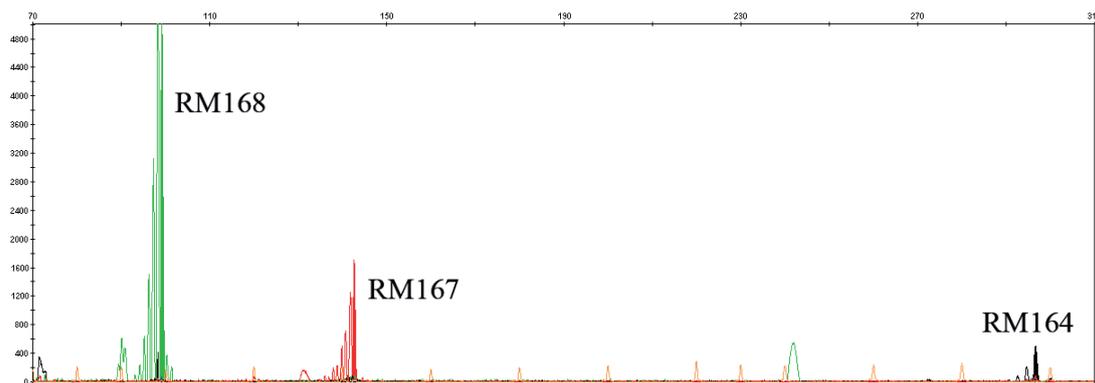


Рис. 1. Пример результатов фрагментного анализа, выполненного на анализаторе ABI Prism 3130 по мультиплексному набору, включающему микросателлитные ДНК-маркеры RM168, RM167 и RM164. Сорт риса Уссур

Fig. 1. The results of an analysis performed on the ABI Prism 3130 analyzer for a multiplex set with DNA markers RM168, RM167 and RM164. Ussur rice variety

Таблица 2. Характеристики SSR-маркеров, использованных для генотипирования сортов риса
Table 2. Characteristics of SSR markers used for genotyping of rice varieties

| SSR-маркер/SSR marker | Флуорофор/ Fluorescent label | Кол-во аллелей/ Number of alleles | PIС | Диапазон размера фрагментов/Size range |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------|---|
| RM168 | R6G | 3 | 0.4742 | 96–99 |
| RM167 | TAMRA | 5 | 0.5041 | 145–153 |
| RM164 | ROX | 7 | 0.7148 | 259–305 |
| RM122 | FAM | 7 | 0.6444 | 224–233 |
| RM1 | TAMRA | 8 | 0.6997 | 81–100 |
| RM11 | ROX | 2 | 0.1103 | 127–133 |
| RM44 | ROX | 7 | 0.7715 | 94–130 |
| RM316 | R6G | 2 | 0.0587 | 216–219 |
| RM19 | FAM | 2 | 0.0587 | 196–202 |
| RM474 | TAMRA | 3 | 0.47 | 257–263 |

Для анализа генетических взаимосвязей изученной выборки сортов была выполнена кластеризация методом UPGMA и с использованием Байесовского анализа. Рассматривая результаты Байесовского анализа, представленные на рисунке 2, можно видеть, что при $K = 2$ сорта разделились на две основных группы: первая группа представлена в основном сортами восточной эколого-географической группы (ЭГГ), ко второй отнесены в большей степени сорта европейской ЭГГ (русские сорта) и среднеазиатского происхождения. Часть разных по происхождению сортов была отнесена с различной долей вероятности как к первому кластеру, так и ко второму кластеру, что указывает на их промежуточное положение. При увеличении значения числа кластеров до трех ($K = 3$) все сорта, отнесенные к первому кластеру при $K = 2$, остаются объединенными в один кластер. Сорта европейской и среднеазиатской

ЭГГ разделяются на два кластера. При этом большинство сортов среднеазиатского происхождения входят в третий кластер, а второй кластер в основном образован сортами европейского происхождения.

Объединение сортов по трем кластерам, установленное при $K = 3$, сохраняется и при $K = 4$. К вновь сформированному четвертому кластеру определены сорта, ранее занимавшие переходное положение между кластерами. Часть сортов восточной группы, отнесенных к кластеру 1, с различной долей достоверности (от 5 % до 38 %) отнесены к кластеру 4. В значениях $K = 5$ происходит разделение сортов восточного происхождения на два кластера: в одном преобладают сорта корейского происхождения, в другом – японского. Остальные кластеры соответствуют группам, выявленным при значении $K = 4$.

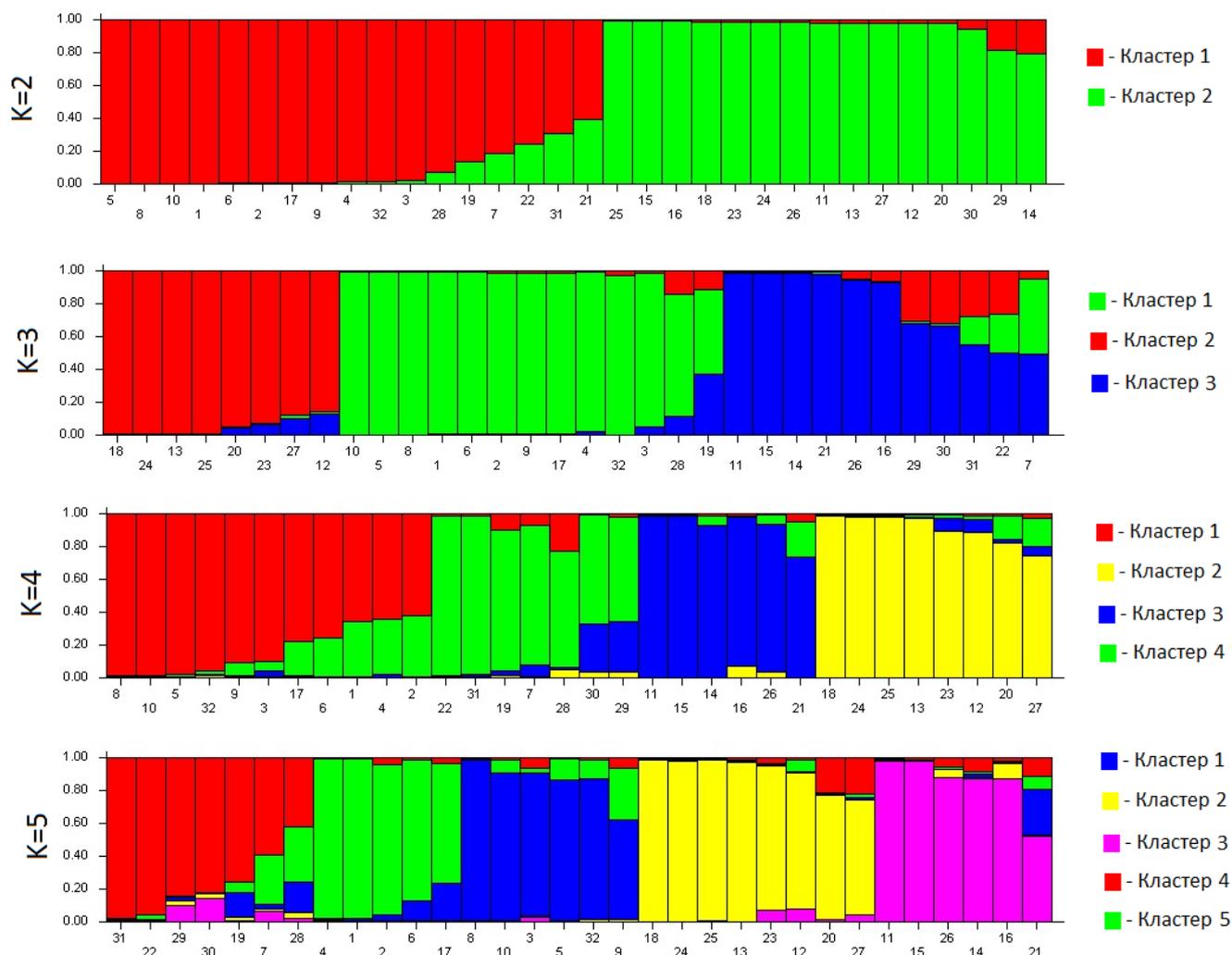


Рис. 2. Структура изучаемой выборки сортов риса по результатам Байесовского анализа

Примечание:

Корея (Восточная ЭГГ): 1 – Odaebueo; 2 – Jibu; 3 – Undong 5; 4 – Geumobueo; Япония (Восточная ЭГГ): 5 – Kuro-mochi; 6 – Kanto 51; 7 – Ischikari; 8 – Aichi Asachi; 9 – Igisakau; Россия Приморье (Восточная ЭГГ): 10 – Китайский; 11 – Уссур; 12 – Приморский 29; Узбекистан (Среднеазиатская ЭГГ): 13 – Талмас 2; Казахстан (Среднеазиатская ЭГГ): 14 – Арал 22; 15 – Крос 358; 16 – Баканасский; 17 – Баракат; Россия (Европейская ЭГГ) (селекция ВНИИриса): 18 – Фаворит; 19 – Диамант; 20 – Анаит; 21 – Кулон; 22 – Лиман; 23 – Олимп; 24 – Регул; 25 – Янтарь; 26 – Дружный; 27 – Ренар; 28 – Полевик; 29 – Славянец; 30 – Вираз (селекция ВНИИЗК); 31 – Старт; 32 – Соната.

Fig. 2. Bar plot of Bayesian analysis results (K = 2, 3, 4, 5) for the studied rice varieties

Note:

Korea (Eastern EGG): 1 – Odaebueo; 2 – Jibu; 3 – Undong 5; 4 – Geumobueo; Japan (Eastern EGG): 5 – Kuro-mochi; 6 – Kanto 51; 7 – Ischikari; 8 – Aichi Asachi; 9 – Igisakau; Russia Primorye (Eastern EGG): 10 – Kitajsky; 11 – Ussur; 12 – Primorskij 29; Uzbekistan (Central Asian EGG): 13 – Talmas 2; Kazakhstan (Central Asian EGG): 14 – Aral 22; 15 – Cross 358; 16 – Bakanassky 17 – Barakat; Russia (European EGG) (breeding of ARRR1): 18 – Favorit; 19 – Diamond; 20 – Anait; 21 – Kulon; 22 – Liman; 23 – Olimp; 24 – Regul; 25 – Jantar; 26 – Druzhny; 27 – Renar; 28 – Polevik; 29 – Slavyanets; 30 – Virazh (breeding of VNIIZK); 31 – Start; 32 – Sonata.

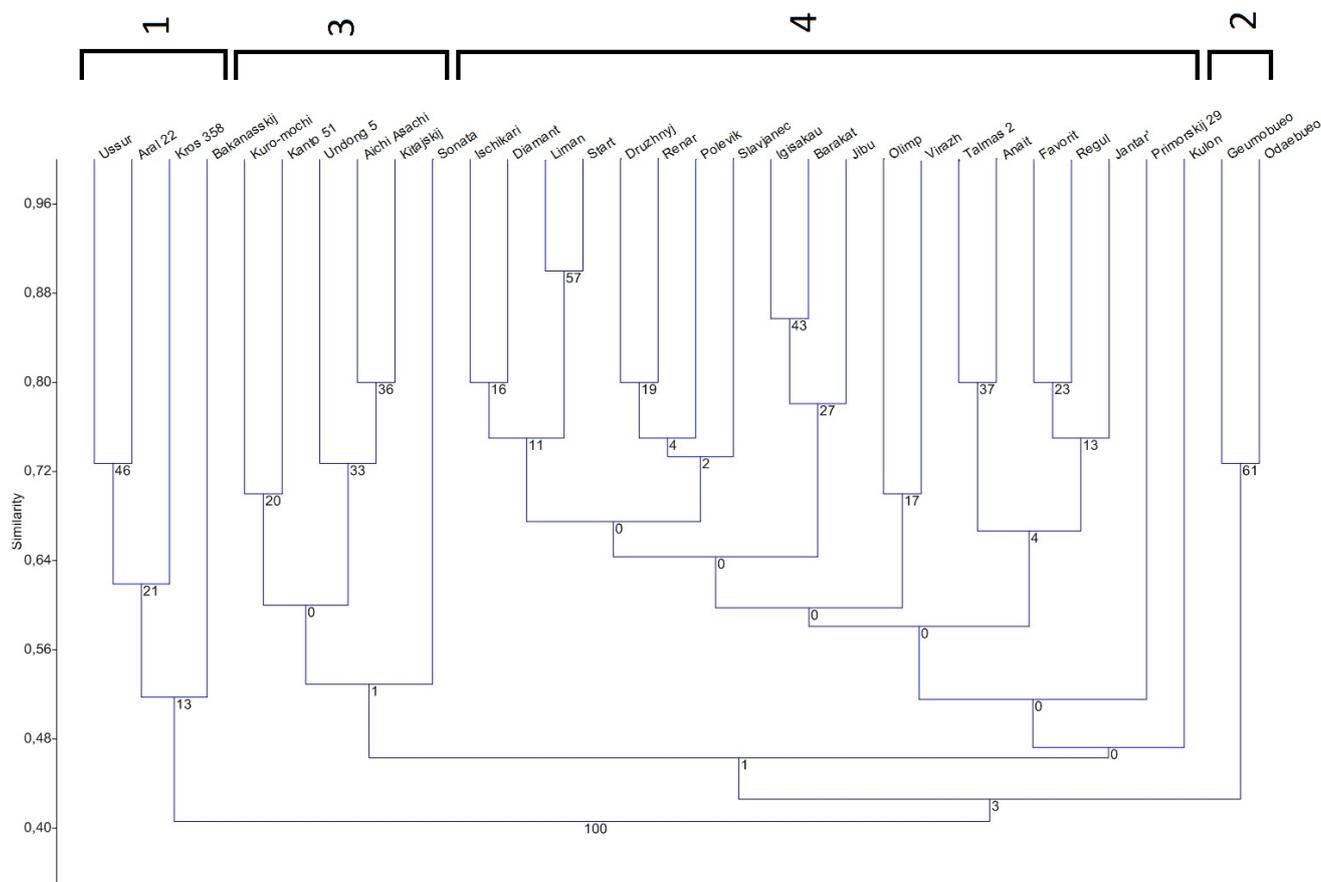


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства сортов риса, построенная с использованием алгоритма UPGMA

Fig. 3. UPGMA dendrogram of genetic similarity between rice cultivars

Кластеризация методом UPGMA позволяет рассмотреть процесс группировки сортов под одним углом (рис. 3).

На UPGMA-дендрограмме можно выделить 4 кластера. Первый кластер включает 3 сорта среднеазиатской эколого-географической группы и один сорт, относящийся к восточной эколого-географической группе (Уссур). Второй установленный кластер представлен корейскими сортами: Одаебueо и Geumobueо. Третий кластер состоит из пяти сортов восточной эколого-географической группы (три японских сорта – Kanto 51, Kuro-Mochi и Aichi Asachi, корейский сорт Undong 5 и российский сорт из Приморского края – Китайский) и одного сорта селекции ВНИИ риса – Соната. Отнесение сорта Соната к данному кластеру может быть обусловлено тем, что данный солеустойчивый сорт был создан с участием донора солеустойчивости – сорта Поккали, относящегося к южно-азиатской эколого-географической группе, которая генетически более близка восточной ЭГГ, нежели к европейской. Четвертый кластер, хоть и включает представителей трех вышеперечисленных эколого-географических групп, в основном сформирован сортами селекции ВНИИ риса, входящих в европейскую ЭГГ.

Обсуждение

Сравнивая уровень полиморфизма маркеров, полученный по результатам нашего исследования, с результатами анализа генплазмы риса из различных регионов рисосеяния, можно сказать о сопоставимом уровне полиморфизма. Так, к примеру, в работе М. Ravi с соавторами, при изучении генетического разнообразия выборки генотипов, включающей 45 представителей генофонда Индии, Филиппин, Шри-Ланки, идентифицировали среднее значение PIC = 0,578. Необходимо отметить, что в изучаемую выборку наряду с сортами вошли и пять видовых образцов (*Oryza nivara* S.D. Sharma & Shastry и *Oryza rufipogon* L.) (Ravi et al., 2003). При изучении генетических взаимосвязей автохтонных культурных форм, сортов современной селекции и дикорастущих форм риса из Индии в выборке из 35 генотипов среднее количество аллелей на locus было 4,86 при среднем значении показателя PIC 0,707, что может быть следствием более равномерного распределения частот аллелей маркеров (Ram et al., 2007). Относительно SSR-маркеров, у которых был выявлен минимальный уровень полиморфизма,

можно предположить, что данный факт может быть следствием того, что в работе были задействованы сорта только из трех эколого-географических зон. При этом не представлены сорта подвида *indica*, а также сорта из Южной и Юго-Восточной Азии — регионов, относящихся к областям происхождения данной культуры и отличающихся высоким разнообразием генофонда рода *Oryza* (Lyakhovkin, 2005).

Исходя из данных Байесовского анализа, можно утверждать, что удаленное географическое происхождение европейских сортов и дальневосточных сортов риса соответствует и их генетической удаленности. При этом среднеазиатские сорта проявляют генетическое родство с европейскими сортами. Тем не менее, несмотря на родство среднеазиатских и европейских форм, при более детальной кластеризации они обособляются друг от друга. В свою очередь, восточноазиатские сорта также не представляют единого целого и при последующей кластеризации разделяются на две группы с преобладанием корейских или японских сортов. Стоит отметить, что кластеры не образованы только представителями той или иной ЭГГ и определяются по преобладающей в кластере группе. Также практически между всеми кластерами существуют сорта, занимающие переходное положение. Это служит доказательством генетического обмена между различными ЭГГ.

Видно, что результаты UPGMA демонстрируют несколько иную картину распределения сортов, отличную от полученной при проведении Байесовского анализа. Большинство сортов азиатского происхождения (восточная и среднеазиатская ЭГГ) образуют аутгруппы относительно сортов селекции ВНИИ риса, представленных четвертым кластером. В связи с этим, высокий уровень генетического родства среднеазиатских сортов риса с европейскими, полученный по результатам байесовского анализа при значении $K = 2$, представляется не столь однозначным. Скорее можно сделать вывод о более объективном разделении сортов при значении $K = 3$ и 4 . Наличие сортов различного эколого-географического происхождения в четвертом кластере, куда вошла основная часть сортов отечественной селекции, может быть следствием вклада генофонда, относящегося к среднеазиатской и восточной ЭГГ в формирование российской генплазмы риса за счет их вовлечения в селекционный процесс.

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение о сложной генетической структуре изученной выборки образцов, что согласуется с наличием сортов из разных эколого-географических групп. При этом необходимо отметить присутствие сортов, занимающих переходное положение между эколого-географическими группами, что, очевидно, является следствием активного использования в селекции скрещивания сортов, относящихся

к разным ЭГГ. Отнесение отечественных сортов, которые, в соответствии с морфологическими характеристиками, относятся к европейской эколого-географической группе, к группе сортов, включающей также некоторые сорта из средней Азии и из восточной ЭГГ, является следствием использования в отечественной селекции сортов, принадлежащих к разным эколого-географическим группам.

References/Литература

- Choudhary G, Ranjithkumar N, Surapaneni M, Deborah DA, Vipparla A, Anuradha G, Siddiq A E, Reddy Vemireddy L (2013) Molecular Genetic Diversity of Major Indian Rice Cultivars over Decadal Periods. *PLoS ONE*; 8(6): e66197. DOI: 10.1371/journal.pone.0066197
- Das B, Sengupta S, Parida SK (2013) Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India. *BMC Genetics*; 14: 71.
- Gao L-Z, Zhang C-H (2005) Comparisons of microsatellite variability and population genetic structure of two endangered wild rice species, *Oryza rufipogon* and *O. officinalis*, and their conservation implications. *Biodiversity and Conservation*; 14: 1663–1679. DOI: 10.1007/s10531-004-0537-y
- Korotenko TL (2018) Perspective initial material of rice for breeding programs of the South of Russia (Perspektivnyy iskhodnyy material risa dlya selekcionnykh programm yuga Rossii). Nauchnoe obespechenie innovacionnykh tekhnologij proizvodstva i hraneniya sel'skohozyajstvennoj i pishchevoj produkcii: Sbornik materialov 1-oj Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii molodykh uchenykh i aspirantov. Krasnodar: FGBNU VNIITTI 9–23 aprelya — Scientific support of innovative technologies for the production and storage of agricultural and food products: Collection of materials of the 1st International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Postgraduates April 9–23 2018. Krasnodar: FGBNU VNIITTI [in Russian] (Коротенко Т. Л. Перспективный исходный материал риса для селекционных программ Юга России // «Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции»: Сборник материалов 1-й Международной научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов 9–23 апреля 2018. Краснодар: ФГБНУ ВНИИТТИ, 2018. С. 40–49).
- Lyakhovkin AG (2005) Rice. World production and gene pool (Ris. Mirovoe proizvodstvo i genofond). 2-e izd. SPb.: «PROFI-INFORM» 2nd ed. SPb.: «PROFI-INFORM»: 288 [in Russian] (Ляховкин А. Г. Рис. Мировое производство и генофонд. 2-е изд. СПб.: ПРОФИ-ИНФОРМ», 2005. 288 с.).
- McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T, Blair (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.*; 35: 89–99.
- McCouch SR, Temnykh S, Lukashova A, Coburn J, DeClerck G, Cartinhour S, Harrington S, Thomson M, Septiningsih E, Semon M, Moncada P, Jiming Li (2008) Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications. *Rice Genetics Collection*; 4: 117–135 DOI: 10.1142/9789812814296_0008
- Moumeni A, Bahman YS, Wu J, Leung H (2003) Genetic diversity and relatedness of selected Iranian rice cultivars and disease resistance donors assayed by simple sequence repeats and candidate defense gene markers. *Euphytica*; 131: 275–284.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*; 10: 4321–4325.
- Rahman MS, Sohag MKH, Rahman L (2010) Microsatellite based DNA fingerprinting of 28 local rice (*Oryza sativa* L.) varieties of Bangladesh. *Bangladesh Agril. Univ.*; 8(1): 7–17. DOI: 10.3329/jbau.v8i1.6391
- Ram SG, Thiruvengadam V, Ram SG, Vinod K (2007) Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. *Journal of Applied Genetics*; 48(4): 337–345.
- Ravi M, Geethanjali S, Sameeyafarheen F, Maheswaran M (2003)

- Bangladesh Agril Molecular Marker based Genetic Diversity Analysis in Rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*; 133: 243–252. DOI: 10.1023/A:1025513111279
- Siwach P, Jain S, Salni N, Chowdhury VK, Jain RK* (2003) Allelic diversity among basmati and non-basmati long-grain indica rice varieties using microsatellite markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*; 13: 25–32.
- Suprun II, Kovalev VS* (2015) Testing multiplex SSR analysis for DNA certification of rice varieties (Aprobaciya mul'tipleksnogo SSR-analiza dlya DNK-pasportizacii sortov risa). *Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal KubGAU — Scientific Journal of KubSAU*; 10(114): 1417–1427 [in Russian] (Супрун И. И., Ковалев В. С. Аprobация мультиплексного SSR-анализа для ДНК-паспортизации сортов риса // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. Краснодар: КубГАУ. 2015. № 10(114). С. 1417–1427).
- Thomson MJ, Septiningsih EM, Suwardjo F, Santoso TJ, Silitonga TS, McCouch SR* (2007) Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*; 114: 559–568. DOI: 10.1007/s00122-006-0457-1
- Weiguo Z, Jong-Wook C, Ma K-H, Kim T-S, Kim S-M, Shin D-I, Kim C-H, Koo H-M, Park Y-J* (2009) Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Rice Cultivars from Korea, China and Japan using SSR Markers. *Genes and Genomics*; 31(4): 283–292. DOI: 10.1007/BF03191201
- Yelome OI, Audenaert K, Landschoot S, Dansi A, Vanhove W, Silue D, Damme PV, Haesaert G* (2018) Analysis of population structure and genetic diversity reveals gene flow and geographic patterns in cultivated rice (*O. sativa* and *O. glaberrima*) in West Africa. *Euphytica*; 214: 21. DOI: 10.1007/s10681-018-2285-1

СОЗДАНИЕ СОРТОВ РИСА, УСТОЙЧИВЫХ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ, НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ

Дубина Е. В.¹, Шиловский В. Н., Костылев П. И.,
Рубан М. Г., Оглы А. М.

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт риса
350921, Россия, Краснодар, пос. Белозерный, 3

e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Болезни сельскохозяйственных культур являются основной причиной снижения урожайности и качества продукции. Пирикулярриоз (возбудитель *Pyricularia oryzae* Cav.) самое опасное заболевание на рисовых полях. Экономический ущерб, наносимый патогеном, значителен во всех зонах мирового рисосеяния. Наиболее эффективной, экономически оправданной и экологически щадящей стратегией борьбы с ним является создание устойчивых сортов. Актуально в данном направлении применение ДНК-маркеров, сцепленных с локусами устойчивости к пирикулярриозу. Это существенно сокращает селекционный процесс и позволяет в короткие сроки создавать устойчивые к заболеванию формы риса. Цель работы заключалась в интродукции эффективного на юге России гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* в генотип высокопродуктивного сорта риса отечественной селекции Флагман для получения на его основе новых, резистентных к *P. oryzae* форм. Для достижения поставленной цели в 2007 году проведена гибридизация сорта Флагман с устойчивым к пирикулярриозу сортом IR-36, который имеет период вегетации более 150 дней. Однако для местной зоны рекомендуется возделывать сорта с периодом вегетации не более 125 дней. В связи с этим было проведено три беккросса и получен селекционный материал, который изучался по хозяйственно-ценным признакам в селекционных питомниках. По результатам молекулярной идентификации доминантного и рецессивного аллелей гена устойчивости *Pi-ta*, а также по данным фитопатологического теста выделено несколько образцов с высокими показателями по качеству крупы, устойчивости к пирикулярриозу, урожайности и другим хозяйственно ценным признакам. В 2017 году высокоурожайный образец риса КП-171-14 с геном *Pi-ta*, адаптированный к условиям выращивания на юге России, устойчивый к краснодарской популяции патогена, а также имеющий высокое качество крупы, передан в Государственное сортоиспытание (ГСИ) под названием Альянс. Сорта Ленарис (КП-30) и Капитан (КП-23) переданы на ГСИ в 2018 году. Возделывание таких сортов в производстве позволит сократить применение химических средств защиты и избежать загрязнения зерновых экосистем.

Ключевые слова: рис, ПЦР, ген *Pi-ta*, селекция, молекулярные маркеры

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР по теме № 0685-2018-0068 «Создать новые линии риса, устойчивые к пирикулярриозу, с использованием методов маркерной селекции. Получить синтетическую популяцию патогена *Pyricularia oryzae* Cav. с высокой спорулирующей способностью, состоящую из штаммов, выделенных из рисосеющих районов Краснодарского края».

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Дубина Е. В., Шиловский В. Н., Костылев П. И., Рубан М. Г., Оглы А. М. Создание сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, на основе применения ДНК-технологий. Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 16-23. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-16-23

Dubina E. V., Shilovsky V. N., Kostylev P. I., Ruban M. G., Ogly A. M. Development of blast-resistant rice varieties based on application of DNA technologies. Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 16-23. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-16-23

Дубина Е. В. orcid.org/0000-0002-8010-0137
Костылев П. И. orcid.org/0000-0002-4371-6848

DEVELOPMENT OF BLAST-RESISTANT RICE VARIETIES BASED ON APPLICATION OF DNA TECHNOLOGIES

Dubina E. V.¹, Shilovsky V. N., Kostylev P. I.,
Ruban M. G., Ogly A. M.

¹ All-Russian Rice Research Institute
3, pos. Belozerny, Krasnodar, 350921, Russia

e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Diseases of agricultural crops are the main reason for decreased yield and quality of product. Blast (causative agent: *Pyricularia oryzae* Cav.) is the most harmful disease on rice fields. Economic damage caused by the pathogen is significant in all areas of the world's rice cultivation. The most effective, economically justified and environmentally friendly strategy for combating it is development of resistant varieties. The application of DNA markers linked to loci of resistance to blast is relevant in this area. This makes it possible to significantly shorten the breeding process and promptly develop disease-resistant rice forms. In this regard, the aim of the work was to develop source material for breeding as well as highly productive rice varieties and lines with genes of resistance to blast based on the use of molecular marking method. To achieve this goal, we have launched a program since 2007 aimed at introduction of the blast resistance *Pi-ta* gene, effective for the south of Russia, into the domestic rice cultivar Flagman. After a number of recurrent crosses, the breeding material was obtained, which was studied for economically valuable traits in breeding nurseries. As a result of evaluation and rigorous discarding as well as according to the results of a phytopathological test for blast resistance, several lines were identified that have high indicators of milled rice quality, resistance to blast, yield and economically valuable traits. Rice accession KP-171-14 with the *Pi-ta* gene, adapted to growing conditions in the south of Russia, resistant to the Krasnodar population of *P. oryzae*, and having high yield and grain quality, in 2017 was submitted for State Variety Trials (SVT) under the name Alyans. Accessions KP-30 and KP-23 are tested for economically valuable traits and disease resistance in competitive variety trials. The best accession will be submitted to SVT. The introduction and cultivation of such varieties will reduce the use of chemical protection products, obtain environmentally friendly agricultural products and avoid contamination of grain ecosystems.

Keywords: rice, PCR, *Pi-ta*, breeding, molecular markers

УДК 18:632.488.42:575

Поступила в редакцию: 20.09.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Введение

В селекции растений, основанной на классических методах — гибридизации и отборе, в настоящее время широко используются методы молекулярного маркирования, которые позволяют идентифицировать целевые гены и отбирать желаемые генотипы, основываясь на ДНК-анализе (Cho et al., 1994; Jena et al., 2003). В мировой практике возникло такое направление, как маркер-опосредованная селекция (marker assisted selection – MAS). С ее помощью осуществляется молекулярно-генетическое сопровождение селекционного процесса, начиная с подбора исходного материала, наличия желательных генов и заканчивая паспортизацией нового сорта (Khavkin, 1997).

Для успеха MAS при идентификации целевых генов в гибридном материале важно свести к минимуму расстояние между маркером и геном, поэтому лучше использовать маркеры, расположенные в непосредственной близости к гену, в пределах 5 сМ (Ashkani et al., 2011). Кроме того, надежность маркерного отбора возрастает при использовании фланкирующих, окружающих ген с двух сторон, или внутригенных маркеров, напрямую идентифицирующих нужный аллель (Khavkin, 1997).

Маркеры, тесно сцепленные с целевым геном или локусом хромосомы, в котором такой ген находится, значительно облегчают селекционную работу и позволяют ускоренными темпами создавать генотипы, имеющие необходимые гены, в том числе гены резистентности к биотическим стрессовым факторам среды (Jena et al., 2003).

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

Гены устойчивости к заболеваниям защищают растения риса от грибной, бактериальной и вирусной угрозы, являясь первым уровнем сложной генетической защитной системы. Растения, несущие доминантный (или кодоминантный) ген устойчивости (R), реагируют на патогены, содержащие соответствующий ген авирулентности (AVR), запуская сигнальный трансдукционный путь, который активирует защитную систему (Frisch et al., 1999; Matsumura et al., 2003; Yu et al., 1996).

Идентификация генов устойчивости была начата еще в начале двадцатого века, когда Sasaki открыл физиологические расы *P. oryzae*, различающиеся по способности заражать сорта риса (Sasaki, 1922).

Первым изученным геном, придающим устойчивость к пирикулярриозу, был *Pi-a*, определенный Н. Shinoda (Shinoda et al., 1971). В дальнейшем широкое генетическое изучение привело к открытию 25 генов устойчивости к пирикулярриозу и подбору сортов риса, защищенных генами устойчивости, дифференциально взаимодействующими с изолятами патогена (George et al., 1998). К настоящему времени известно более 50 генов, контролирующих устойчивость. Среди них есть гены, имеющие более одного аллеля устойчивости. Например, пять аллелей известно в локусе *Pi-k* на 11 хромосоме, два – у *Pi-ta* локуса на хромосоме 12 (Kiyosawa, 1989) и два – в локусе *Pi-z* на хромосоме 6. В центромерном регионе шестой хромосомы также картированы такие гены устойчивости, как *Pi-9*, *Pi-40*, *Pi-13*, *Pi-z*, *Pi-zt* и др.; в одиннадцатой – *Pi-a*, *Pi-1*, *Pi-18*, *Pi-k*, *Pi-kh* и др.; в двенадцатой хромосоме идентифицированы гены *Pi-4a (t)*, *Pi-4b (t)*, *Pi-6 (t)* и *Pi-12 (t)* (Bonman et al., 1992).

Для успешной селекции на устойчивость к данному заболеванию у селекционера в первую очередь должны быть информация об эффективных генах устойчивости для местной зоны возделывания культуры риса, а также сведения о биоразнообразии *P. oryzae* (Dubina et al., 2015).

Согласно нашим исследованиям, ген расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* эффективен на юге России (Dubina et al., 2017; Kharchenko et al., 2017). Он хорошо изучен и секвенирован (Cho et al., 1994). Ген локализован в центромерном регионе двенадцатой хромосомы; он кодирует полипептид длиной 928 аминокислотных остатков и молекулярной массой 105 кДа (Jena et al., 2003). Сотрудниками нашей лаборатории разработана маркерная система, позволяющая идентифицировать ген *Pi-ta* в гибридных растениях (Myagkih, 2009). В 2016 году сотрудниками института сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) был разработан внутригенный молекулярный маркер, напрямую идентифицирующий целевой ген, а также его аллельное состояние (Shilov et al., 2016).

Целью работы было введение эффективного на юге России гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* в генотип высокопродуктивного сорта риса отечественной селекции Флагман для получения на его основе новых резистентных форм.

Материалы и методы

Донором для введения гена устойчивости к пирикулярриозу в сорт риса Флагман (материнская форма) стал сорт зарубежной селекции IR-36. В условиях Краснодарского края он показал себя как позднеспелый (период вегетации 155 дней). В местной зоне рисосеяния предпочтительно возделывание сортов, созревающих не более чем за 125 дней, поэтому материнская форма для гибридизации была высажена в три срока, с разницей в 10 дней, тем самым увеличивая вероятность совпадения периодов цветения родительских форм. При гибридизации растений использовали пневмокастрацию материнских форм и опыление «ТВЕЛЛ»-методом (Los, 1987). Растения выращивали в камерах искусственного климата.

Для контроля наличия, а также аллельного состояния гена *Pi-ta* в гибридных растениях использовали

кододоминантный внутригенный молекулярный маркер, позволяющий идентифицировать доминантный и рецессивный аллели, размер ПЦР-продуктов которых отличается почти на 300 пар оснований, что позволяет визуально различать продукты ПЦР-реакции как в полиакриламидном,

так и в агарозном геле. Размер ПЦР-продукта у сортов с доминантным аллелем гена, детерминирующим устойчивость, составляет 270 п.о.; у сортов с рецессивным аллелем – 563 п.о. (Myagkih, 2009; Shilov et al., 2016; таблица 1).

Таблица 1. Последовательности праймеров для идентификации гена *Pi-ta*
Table 1. Sequences of primers for identification of the *Pi-ta* gene

| Название / Name | Нуклеотидная последовательность / Nucleotide sequence |
|-----------------|---|
| F1-N | GCC GTG GCT TCT ATC TTTA CAT G |
| R1 | ATC CAA GTG TTA GGG CCA ACA TTC |
| F2 | TTG ACA CTC TCA AAG GAC TGG GAT |
| R2-N | TCA AGT CAG GTT GAA GAT GCA TCG A |

Экстракцию ДНК осуществляли методом СТАВ (Murray, Thompson, 1980). Метод заключается в использовании цетилтриметиламмония бромида (СТАВ) в качестве основного компонента буфера экстракции и преципитации.

ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей 40–50 нг ДНК, 0,1 мМ dNTPs, 25 мМ KCL, 60 мМ Tris-HCL (рН 8,5), 0,1 % Тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5 мМ MgCl₂, 1 е.а. Taq-полимеразы и по 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров в конечном объеме 25 мкл. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 1.

Для проведения амплификации нами были оптимизированы условия и составлен протокол условий ПЦР: начальная денатурация 5 мин при 94 °С – 1 цикл. Следующие 35 циклов: денатурация – 35 сек при 94 °С; отжиг праймеров 45 сек при 60 °С; синтез 30 сек при 72 °С. Финальная элонгация 5 мин при 72 °С.

Для разделения ПЦР-продуктов использовали 8 %-ный полиакриламидный гель. Электрофорез проводили при напряжении 250 V в течение трех часов. После электрофореза гелевые пластины помещали на 20–30 мин в раствор бромистого этидия и затем фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Устойчивость донорной линии риса IR-36 и сорта Флагман к местной популяции *P. oryzae* оценивали в полевых условиях инфекционного питомника рисовой оросительной системы Всероссийского научно-исследовательского института риса (ВНИИ риса) в соответствии с методическими указаниями (Averyanov et al., 1990; Frolova et al., 1983). В качестве восприимчивого контроля использовали сорт Победа 65, устойчивого – сорт Авангард.

Инокуляцию растений проводили культурой гриба, выделенной из гербарного материала, собранного на полях Краснодарского края. Суспензию конидий для заражения

приготавливали путем смыва с поверхности колоний спорово-мицелиальной массы. Инокуляцию осуществляли суспензией концентрации 10⁵ конидий/мл. Растения заражали в фазы кушения, выметывания-цветения из расчета 0,5 мл на одно растение. При обработке использовали опрыскиватель. В суспензию для лучшей адгезии добавляли Tween 80 из расчета 1 капля на литр воды.

Учет степени поражения растений проводили на 14-й день после инокуляции, согласно экспресс-методу оценки устойчивости риса к пирикулярриозу.

Оценку осуществляли, учитывая два показателя: тип реакции (в баллах) и степень поражения (в процентах), используя при этом десятибалльную шкалу Международного института риса (Kolomiets, 1990):

- **устойчивые:** 0–1 балла – 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 26–50% общей поверхности листьев;
- **неустойчивые:** 6–10 баллов – типичные пирикулярриозные пятна эллиптической формы, 1–2 см длиной, покрывающие 51% и более общей поверхности листьев.

Интенсивность развития болезни (ИРБ, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИРБ} = \frac{\sum(a \times b)}{N \times k} \times 100$$

где N – число учетных растений, а – количество больных растений, b – соответствующий балл поражения, k – высшее значение балла по шкале.

В зависимости от балла поражения все сорта делили на 4 группы: устойчивый тип, промежуточный, восприимчивый, сильновосприимчивый.

Для оценки по хозяйственно ценным признакам исследуемые образцы высевали в ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса на рисовой оросительной системе по предшественнику многолетние травы. Все агротехнические работы выполнялись по общепринятой методике ВНИИ риса (Dospikhov, 1979; Smetanin et al., 1972).

Посев опытных образцов проводили 9 мая 2018 года сеялкой центрального высева по схеме конкурсного сортоиспытания на делянках площадью 20 м². Расположение делянок рендомизированное в четырехкратной повторности, с нормой высева 7 млн всхожих семян на гектар. В качестве стандартов использовали сорт Флагман. Залив опытного полигона проводился 10 мая 2018 года. Всходы наблюдали 24–26 мая.

В течение вегетации проводили фенологические наблюдения по принятой во ВНИИ риса методике. Учитывали сроки фаз вегетации до цветения и полной спелости. В фазе полной спелости проводили оценку полеглости и осыпавости согласно рекомендациям «Практического руководства по интенсивной технологии возделывания риса в Краснодарском крае» (1986).

Перед уборкой проводили сортовую прополку с удалением нетипичных растений в делянках. Уборка проведена комбайном ДКС-685 с очесывающим молотильным аппаратом. Семена высушивали и очищали на лабораторных семяочистительных машинах СМ-1,5 и Петкус К-531 Гигант.

Статистическую обработку полученных данных проводили по Б. А. Доспихову (Dospikhov, 1979).

Результаты и обсуждение

Для получения новых резистентных форм к *P. oryzae* в 2007 году на основе использования технологии MAS нами проведена гибридизация сорта IR-36 – донора гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* с сортом Флагман, в результате получено поколение F₁, растения которого имели высокую степень стерильности (до 95%). После проведения первой серии беккроссов в 2008 году в камерах искусственного климата получены поколения BC₁ и BC₂. В популяциях BC₁ фертильность возросла и в среднем составляла около 50%. Начиная с первого возвратного скрещивания, проводили маркерный контроль присутствия переносимых донорных аллелей в гибридном потомстве. Отбирали растения, которые по результатам ДНК-анализа несли донорный доминантный аллель гена устойчивости к патогену, а также отмечали те растения, которые имели наименьший период вегетации до цветения. Растения, в генотипе которых доминантные аллели не были обнаружены, выбраковывали.

В популяции BC₂ по данным ДНК-анализа отбирали растения, несущие донорные аллели, которые вовлекали в

следующий беккросс, предварительно выбраковав формы с нежелательным морфотипом.

Известно, что восстановление генома рекуррентного родителя при возвратных скрещиваниях в BC₃ составляет 93,75 % (Openshau, 1994), поэтому было проведено три беккросса.

В 2009 году получено поколение BC₃. Среди растений BC₃ отобрали формы с наименьшим вегетационным периодом и наибольшей фертильностью метёлки. Семена этих растений высадили для получения сегрегирующей популяции F₂BC₃. Самоопыление растений риса, гетерозиготных по селективируемым генам, дает возможность перевести приоритетный аллель в гомозиготное состояние. Маркерный анализ полученной популяции выявил образцы, несущие вводимый доминантный аллель гена устойчивости *Pi-ta* в гомозиготном состоянии (рис. 1).



Рис. 1. Идентификация гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* с помощью ПЦР-анализа; 1 – сорт Флагман (материнская форма), 2 – сорт-донор IR-36 (отцовская форма), 3-8 – гибридные растения F₂BC₃, маркер мол. веса – маркер молекулярного веса pBR322/BsuRI. Указаны размеры диагностических фрагментов гена устойчивости

Fig. 1. Identification of the *Pi-ta* gene determining resistance to *Pyricularia oryzae* with the use of PCR analysis; 1 – the variety Flagman (maternal form); 2 – the donor variety IR-36 (paternal form); 3-8 – F₂BC₃ hybrid plants; маркер мол. веса – molecular weight marker pBR322/BsuRI. The sizes of the resistance gene diagnostic fragments are indicated

В селекции риса желательным является низкорослый тип растений, с высокой интенсивностью первоначального роста, устойчивый к полеганию, с продуктивной метелкой и неосыпающимися в фазу полной спелости колосками. Среди растений, которые по результатам ДНК-анализа несли доминантный аллель гена *Pi-ta* 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, кото-

рые в 2010 году были переданы в селекционный процесс для оценки по хозяйственно-ценным признакам. Растения, не удовлетворявшие таким требованиям, выбраковывали. Далее в 2010–2013 гг переданные нами в селекционный процесс линии риса с интродуцированным геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* проходили оценку по комплексу хозяйственно-ценных признаков в селек-

ционном питомнике. После оценки и жесткой браковки для контрольного питомника отобрано 23 линии, из которых в 2014 году по комплексу признаков были выделены три устойчивые к пирикулярриозу линии риса с хорошим качеством крупы и высокой урожайностью, содержащие ген *Pi-ta*: КП-171-14 (Альянс), КП-30 (Ленарис) и КП-23 (Капитан). Результаты их оценки приведены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика сортов и линий риса конкурсного сортоиспытания

Table 2. Characteristics of rice varieties and lines in competitive variety trials

| Линия/сорт Name of line /variety | Урожайность, т/га Productivity, t/ha | Вегетационный период, дни Vegetative period, days | Высота растения, см The height of the plant, cm | Масса 1000 зерен, г Weight 1000 grains, g | l/b | Выход крупы, % Cereals yield, % | ИРБ, % Disease development index, % |
|---|---|--|---|--|-----|--|---|
| КП-171-14/ Альянс КР-171-14/ Alyans) | 9,2 | 120 | 85,3 | 29,1 | 2,6 | 73,2 | 32,3 |
| КП-30/Ленарис КР-300/Lenaris | 10,6 | 115 | 77,8 | 30,4 | 2,6 | 72,3 | 16,7 |
| КП-23/Капитан КР-23/Kapitan | 9,9 | 115 | 75,6 | 30,2 | 2,4 | 71,2 | 21,3 |
| Флагман/ Flagman (Ref) | 7,1 | 116 | 91,0 | 26,7 | 1,9 | 71,6 | 59,1 |
| НСП ₀₅ | 0,5 | 2,0 | 6,7 | 2,3 | 0,3 | 1,4 | 3,5 |

Примечание: l/b – отношение длины к ширине зерновки; ИРБ – индекс развития болезни;
Ref – стандарт

Note: l/b – the length-to-width ratio of the grain; IRB – index of disease development;
Ref – reference variety

Данные таблицы показывают, что растения изученных селекционных линий и сортов адаптированы к условиям выращивания на юге России. Они имеют оптимальный вегетационный период (115–120 дней), высокую фертильность колосков метелки, короткостебельны (77–85 см), устойчивы к полеганию, а также к краснодарской популяции *P. oryzae*. Метелка у них слегка пониклая, компактная, длиной 16–19 см. Зерно удлиненное ($l/b = 2,4–2,6$), масса 1000 зерен около 30 и более граммов.

Выход крупы – 71–73 %. При пересчете на 1 га формируют урожайность 9,0–12,0 т зерна (рис. 2, 3).

Сорт риса Альянс в 2017 году передан на Государственное сортоиспытание. Сорты риса Ленарис и Капитан в 2018 году переданы на государственное сортоиспытание. Кроме того, на разных этапах селекционного процесса продолжается изучение новых линий риса с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*.



Рис. 2. Сорту риса Ленарис с геном устойчивости к пирикулярнозу *Pi-ta*
Fig. 2. Rice variety Lenaris with the *Pi-ta* gene determining resistance to blast



Рис. 3. Делянка сорта Ленарис, ФГУЭСЦ «Красное» ВНИИ риса, 2017 г.
Fig. 3. Variety Lenaris, FSE E «Krasnoe» ARRI, 2017

Заключение

Проведена интрогрессия эффективного на юге России гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* в генотип отечественного сорта риса Флагман методом возвратных скрещиваний при контроле донорных аллелей с помощью ДНК-маркеров. Среди гибридных растений отобраны формы с оптимальным вегетационным периодом и наибольшей фертильностью колосков метелки. Маркерный анализ, а также фитопатологическое тестирование полученных популяций выявили устойчивые к пирикулярриозу образцы риса, несущие целевые гены в гомозиготном состоянии. Сорт риса Альянс (КП-171-14) в 2017 году передан на государственное сортоиспытание. Сорта Ленарис (КП-30) и Капитан (КП-23) в 2018 году изучались в КСИ (конкурсное сортоиспытание) третьего

года. Они переданы на государственное сортоиспытание. Все три сорта устойчивы к краснодарской популяции патогена и адаптированы к условиям выращивания на юге России, имеют высокую урожайность и качество крупы.

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

Устойчивые к пирикулярриозу сорта риса необходимы в производстве, а также для повышения конкурентоспособности и импортозамещения. Они позволят увеличить урожайность и валовые сборы зерна, а также избежать эпифитотий. При этом сократится применение химических средств защиты, что снизит фунгицидную нагрузку на экосистему и будет препятствовать загрязнению зерновых экосистем, а также позволит получать экологически чистую сельхозпродукцию.

References/Литература

- Ashkani S, Rafii M, Sariah M, Siti NAA, Rusli I, Harun A, Latif M (2011) Analysis of simple sequence linked with blast disease resistance genes in a segregating repeat markers population of rice (*Oryza sativa*). *Genet. Mol. Biol.*; 10: 1345–1355
- Averyanov AA, Lapikova VP, Petelina GG (1990) Rapid laboratory method for assessing varietal resistance of rice to blast (Laboratornyj ehkspress-metod ocenki sortovoj ustojchivosti risa k pirikulyariozu). *Bol'shie Vyazemy: VNIIF*: 12 p. [in Russian] (Аверьянов А. А., Лапикова В. П., Петелина Г. Г. Лабораторный экспресс-метод оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу. Большие Вяземы : ВНИИФ, 1990. 12 с.).
- Bonman J, Khush G, Nelson R (1992) Breeding rice for resistance to pest. *Annu. Rev. Phytopatol.* 30: 507–528.
- Cho YG, Eun MY, McCouch SR, Chae YA (1994) The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.*; 89: 54–59.
- Correa-Victoria FJ, Tharreau D, Martinez C, Vales M (2003) Gene combinations in rice for the development of durable resistance to *Pyricularia grisea* in Colombia. *Proc. 3rd Int. Temperate Rice Conference*. Punta del Este.
- Dospekhov BA (1979) Methods of the Field Experiments (Basis of Statistical Processing of the Research Results) (Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy)). М. : Kolos. 416 p. [in Russian] (Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Изд. 4-е, перераб. и доп. М. : Колос. 1979. 416 с.).
- Dubina EV, Mukhina ZM, Kharitonov EM, Shilovskiy VN, Kharchenko ES, Esaulova LV, Korkina NN, Maximenko EP, Nikitina IB (2015) Creation of blast disease-resistant rice varieties with modern DNA markers. *Russian Journal of Genetics*; 51(8): 881–886 [in Russian] (Дубина Е. В., Мухина Ж. М., Харитонов Е. М., Шиловский В. Н., Харченко Е. С., Есаулова Л. В., Коркина Н. Н., Максимова Е. П., Никитина И. Б. Создание устойчивой к пирикулярриозу генплазмы риса с использованием технологий ДНК-маркирования // Генетика. 2015. Т. 51 № 8. С. 881–886).
- Dubina EV, Kostylev PI, Ruban MG, Aniskina YuV, Shilov IA, Velishaeva NS, Esaulova LV (2017) The study of biodiversity of *Pyricularia oryzae* Cav. in rice-growing zones of the south of Russia on the basis of the methods of PCR. *Grain economy of Russia*; 54(6): 29–35 [in Russian] (Дубина Е. В., Костылев П. И., Рубан М. Г., Анискина Ю. В., Шилов И. А., Велишаева Н. С., Есаулова Л. В. Изучение биоразнообразия *Pyricularia oryzae* Cav. в рисосеющих зонах юга России на основе метода ПЦР // Зерновое хозяйство России. 2017. Т. 54, № 6. С. 29–35).
- Frisch M, Bohn M, Melchinger AE (1999) Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Science*; 39: 967–975.
- Frolova VS, Kovalenko ED, Naskidashvili ZhG, Silicheva TM et al. (1983) Guidelines for assessing the resistance of rice varieties to blast in an infectious nursery (Metodicheskiye ukazaniya po otsenke ustoychivosti sortobraztsov risa k pirikulyariozu v infektsionnom pitomnike). М. VASKHNIL. 14 p. [in Russian] (Фролова В. С., Коваленко Е. Д., Наскидашвили Ж. Г., Силичева Т. М. и др. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике. М. : ВАСХНИЛ. 1983. 14 с.).
- Girish Kumar K, Hittalmani S, Srinivasachary K (2000) Marker assisted backcross gene introgression of major genes for blast resistance in rice. *Advances in Rice Blast Research*: 43–53.
- Hittalmani S, Parco A, Mew TV, Zeigler RS, Huang N (2000) Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.*; 100: 1121–1128.
- Jena KK, Moon HP, Mackill DJ (2003) Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding. *Korean J. Breed.*; 35: 133–140.
- Kharchenko ES, Dubina EV, Garkusha SV, Ruban MG, Esaulova LV, Avakyan ER, Balyasny IV (2017) A study of the biodiversity of the causative agent *Pyricularia oryzae* Cav. in the south of Russia (Izuchenie bioraznoobraziya populyacii vzbuditelya *Pyricularia oryzae* Cav. na yuge Rossii). *Science of the Kuban*; 1: 20–27 [in Russian] (Харченко Е. С., Дубина Е. В., Гаркуша С. В., Рубан М. Г., Есаулова Л. В., Авакян Э. Р., Бальясный И. В. Изучение биоразнообразия популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. на юге России // Наука Кубани. № 1. С. 20–27).
- Khavkin EE (1997) Molecular markers in plant breeding (Molekulyarnyye markery v rasteniyevodstve). *Agricultural Biology*; 5: 3–21 [in Russian] (Хавкин Э. Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. № 5. С. 3–21).
- Kiyosawa S (1989) Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. Pages 251–283 in: *Plant Disease Epidemiology*. K. J. Leonard and W. E. Fry, eds. McGraw-Hill Publishing Company, New York: 251–283.
- Kolomiets TM (1990) The selection of the source material of rice for breeding for immunity to blast (Otkor iskhodnogo materiala risa dlya selekcii na immunitet k pirikulyariozu). Avtoref. dis. kand. biol. nauk.–Summary of PhD thesis. Golicyno: 21 c.
- Los GD (1987) A promising method of rice hybridization. *Agricultural Biology*; 12: 15–17 [in Russian]. (Лось Г. Д. Перспективный способ гибридизации риса // Сельскохозяйственная биология. 1987. Т. 12. С. 15–17).
- Matsumura H, Nirasawa S, Kiba A, Urasaki N, Saitoh H, Ito M, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Terauchi R (2003) Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J.*; 33: 425–434.

- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*; 8(10): 4321–4325.
- Myagkih YuA (2009) The use of molecular marking to improve the efficiency of rice selection (Primenenie molekulyarnogo markirovaniya dlya povysheniya ehffektivnosti selektsii risa). Dissertatsiya na soiskanie uchenoj stepeni kandidata biologicheskikh nauk - Thesis for the degree of candidate of biological sciences. Krasnodar, 2009: 100 p. [in Russian] (Myagkih Yu. A. Применение молекулярного маркирования для повышения эффективности селекции риса. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Краснодар, 2009: 100 с.).
- Openshaw SJ, Jarboe SJ, Bears WD (1994) Marker assisted selection in backcross breeding. In: Analysis of molecular marker data. Joint Plant Breed. Symp. Ser., Corvallis, Oregon, USA: 41–43.
- Osterman LA (1981) Methods for studying nucleic acids (Metody issledovaniya nukleinovykh kislot). M.: Nauka Publ. 288 p. [in Russian] (Osterman LA. Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981. 288 с.).
- Practical Guide to Intensive Rice Cultivation Technology in the Krasnodar Territory (reference edition) (Prakticheskoe rukovodstvo po intensivnoj tekhnologii vozdelvaniya risa v Krasnodarskom krae (spravochno-metodicheskoe izdanie). Krasnodar. 1986: 38 p. [in Russian] (Prakticheskoe rukovodstvo po intensivnoj tekhnologii vozdelvaniya risa v Krasnodarskom krae (spravochno-metodicheskoe izdanie). Краснодар, 1986. 38 с.).
- Smetanin AP, Dzyuba VA, Aprod AI (1972) Methods of experimental work on breeding, genetics, seed production, seed science and quality control of rice seeds (Metodiki opytnykh rabot po selektsii, genetike, semenovodstvu, semenovedeniyu i kontrolyu za kachestvom risa). Krasnodar: 156 p. [in Russian] (Сметанин А. П., Дзюба В. А., Аprod А. И. Методики опытных работ по селекции, генетике, семеноводству, семеноведению и контролю за качеством семян риса. Краснодар, 1972. 156 с.).
- Shilov IA, Kolobova OS, Aniskina YuV, Shalaeva TV, Velishaeva NS, Kostylev PN, Dubina EV (2016) Improvement of the identification method of the genes *Pi-ta*, *Pi-b* for resistance to rice blast (Usovershenstvovaniye metoda identifikatsii genov ustoychivosti k pirikulyariozu risa *Pi-ta*, *Pi-b*). *Achievements of science and technology of agroindustrial complex*; 30(8): 45–48 [in Russian] (Шилов И. А., Колобова О. С., Анискина Ю. В., Шалаева Т. В., Велишаева Н. С., Костылев П. Н., Дубина Е. В. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикулярнозу риса *Pi-ta*, *Pi-b* // Достижения Науки и Техники АПК. № 8. С. 45–48).
- Sasaki R (1922) Inheritance of rice blast resistance. *Japan. J. Genet.*; 1: 81–85.
- Tabien RE, Li Z, Paterson AH, Marchetti MA, Stansel JW, Pinson SRM (2000) Mapping of four major blast resistance genes from “Lemont” and “Teqing” and evaluation of their combination effect for field resistance. *Theor. Appl. Genet.*; 101(8): 1215–1225.
- Witcombe JR, Hash CT (2000) Resistance gene deployment strategies in cereal hybrids using marker-assisted selection: gene pyramiding, three-way hybrids, and synthetic parent population. *Euphytica*; 112(2): 175–186.
- Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Guiderdoni E (1996) Molecular mapping of genes for resistance to rice blast. *Theor. Appl. Genet.*; 93: 859–863.

АНЕУПЛОИДИЯ ПРИ СКРЕЩИВАНИЯХ *FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH. × *POTENTILLA* ANSERINA L.

БАТУРИН С. О., ФИЛИПЕНКО Е. А.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Россия, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10
e-mail: SO_baturin@mail.ru

ANEUPLOIDY IN INTERGENERIC CROSSES BETWEEN *FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH. × *POTENTILLA* ANSERINA L.

Baturin S. O., Filipenko E. A.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10, Lavrentjeva Ave., Novosibirsk, 630090, Russia
e-mail: SO_baturin@mail.ru

В настоящее время таксономическое родство представителей *Fragaria* L. и *Potentilla* L. активно обсуждается на основе филогенетического анализа по молекулярным маркерам и результатам гибридизации. Согласно опубликованным сведениям при скрещивании *F. × ananassa* Duch. (8x) × *P. anserina* L. (4x) возникают гаплоиды, 8x-потомки партеногенетического происхождения и анеуплоиды. Жизнеспособных гибридов не было получено. Нами проводились многолетние исследования по гибридизации *F. × ananassa* × *P. anserina* с целью получения 8x-агамоспермного потомства и изучения в этом потомстве характера генетической изменчивости. В одном из экспериментов при использовании в скрещиваниях пыльцы *P. anserina*, наряду с матроморфными потомками с $2n = 56$ был получен один сеянец (№ 89-3), который являлся полностью стерильным, фенотипически незначительно отличался от *F. × ananassa*, т. е. соответствовал *Fragaria*-типу. Подсчет чисел хромосом в клетках корневой меристемы этого сеянца показал $2n = 6x = 42$ промежуточное число хромосом между скрещиваемыми родительскими формами. Отсутствие каких-либо морфологических признаков опылителя (*P. anserina*) инициировало нас на проведение молекулярно-генетического анализа, чтобы окончательно прояснить его происхождение. Проведен RFLP-анализ гена ингибитора полигалактуроназы, а также ITS внутреннего транскрибируемого спейсера, входящего в состав кластера генов, кодирующих рРНК, который показал, что сеянец № 89-3 и партеногенетические потомки по молекулярным маркерам соответствовали материнской форме *F. × ananassa*, т. е. сеянец № 89-3 является анеуплоидом. В связи с этим наиболее вероятным сценарием формирования у исследуемого образца № 89-3 хромосомного набора $2n = 42$ следует считать элиминацию 14 хромосом *P. anserina* и 14 хромосом *F. × ananassa* во время первых делений гибридного зародыша ($2n = 70$), который возник в результате оплодотворения нередуцированной яйцеклетки *F. × ananassa* ($n = 56$) редуцированным спермием *P. anserina* ($n = 14$). В итоге это событие исключило геномный материал лапчатки в соматических клетках сеянца. Появление анеуплоидов и партеногенетических 8x-потомков при скрещиваниях *F. × ananassa* × *P. anserina*, позволяет изучать дополнительные механизмы формирования изменчивости в роде *Fragaria*. Репродуктивная изоляция анеуплоида, ввиду его полной стерильности, позволяет использовать его лишь как почвопокровное растение. Кроме того, его фитомасса может быть пригодна для производства ферментированных чайных напитков.

Ключевые слова: *Fragaria × ananassa*, *Potentilla anserina*, межродовая гибридизация, ПЦР, RFLP, межродовые гибриды, анеуплоидия, элиминация хромосом

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Благодарности: Работа выполнена по бюджетному проекту № 0324-2019-0039.

Батурин С. О., Филипенко Е. А. Анеуплоидия при скрещиваниях *Fragaria × ananassa* Duch. × *Potentilla anserina* L. Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 24-31. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-24-31

Baturin S. O., Filipenko E. A. Aneuploidy in intergeneric crosses between *Fragaria × ananassa* Duch. × *Potentilla anserina* L. Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 24-31. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-24-31

Батурин С. О. orcid.org/0000-0002-7003-6661
Филипенко Е. А. orcid.org/0000-0002-5244-2893

Taxonomic relationship between *Fragaria* L. and *Potentilla* L. representatives is actively discussed today in the context of phylogenetic analysis by molecular markers and hybridization results. According to the data published, crosses between *F. × ananassa* Duch. (8x) × *P. anserina* L. (4x) produce haploids, parthenogenetic seedlings (8x) and aneuploids. No viable progenies have been obtained. Our long-standing research in *F. × ananassa* × *P. anserina* hybridization was targeted at obtaining 8x agamospermic progenies and studying their genetic variability. In one of the experiments, when *P. anserina* pollen was used in crosses, along with $2n = 56$ matromorphous seedlings, an absolutely sterile seedling No. 89-3 was produced, which insignificantly differed from *F. × ananassa* by its phenotype, thus matching the *Fragaria* type. Chromosome number in root apical meristem cells appeared to be $2n = 6x = 42$, being intermediate between the crossed parental forms. The absence of any morphological traits of the pollen parent (*P. anserina*) showed the need to make molecular genetic analysis in order to prove its hybrid origin. Methods. To trace its origin, the techniques of Polygalacturonase Inhibitor Proteins (PGIPs) PCR and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) PCR analysis of internal transcribed spacer (ITS) were applied to *F. × ananassa* × *P. anserina* seedlings. The study showed that seedling No. 89-3 and the parthenogenetic progenies are identical and correspond to the mother form (*F. × ananassa*). Hence, eliminating 14 chromosomes of *F. × ananassa* and 14 chromosomes of *P. anserina* during the first divisions of a zygote ($2n = 70$) should be considered as the most likely scenario for the $2n = 42$ chromosome number development in the studied No. 89-3, so the genetic material of *P. anserina* was absent in the embryo's somatic cells. Development of aneuploids and parthenogenetic seedlings (8x) in the crosses of *F. × ananassa* × *P. anserina* makes it possible to study additional mechanisms of variability appearing in the *Fragaria* genus. Reproductive isolation of an aneuploid, due to its complete sterility, limits its use solely to a cover plant's role. In addition, its herbage biomass may be used for making fermented tea.

Keywords: *Fragaria × ananassa*, *Potentilla anserina*, intergeneric crosses, PCR, RFLP, intergeneric hybrids, aneuploidy, chromosome elimination

УДК: 575.222.73: 634.75

Поступила в редакцию: 12.10.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Введение

В настоящее время род *Fragaria* L. (Rosaceae) предлагается как удобная модель для исследований по экологической и эволюционной геномике (Liston et al., 2014), а также изучения естественных механизмов формообразовательного процесса. Этому способствуют наличие естественного полиплоидного ряда: $2n = 14, 28, 42, 56, 70$, при $x = 7$, позволяющего проводить межвидовую гибридизацию в различных направлениях, наличие полового полиморфизма и различных способов размножения: половой (гамоспермия и агамоспермия) и вегетативный. Помимо исследований по межвидовой гибридизации имеются успешные результаты и по межродовой гибридизации. При этом представители рода *Fragaria* использовались лишь в качестве материнской формы, а отцовской формой были представители родов *Potentilla* L. (Mangelsdorf, East, 1927; Asker, 1971; Barrientos, Bringham, 1973; Jelenkovic et al., 1984; Niemirowicz-Szczytt, 1987; Sukhareva, Baturin, 1985; Baturin, 1997), *Comarum* L. (Ellis, 1962; Asker, 1971); *Pentaphylloides* Duham. (Harland, 1957; Ellis, 1962; Asker, 1971; Jelenkovic et al., 1984; Niemirowicz-Szczytt, 1987; Sayegh, Hennerty, 1993; Kaczmarek, 2005) и *Duchesnea* (Smith) M. Shah & Wilcock. (Marta et al., 2004). Возможность получения растений при межродовой гибридизации *Fragaria* и *Potentilla*, пригодных для подсчета числа хромосом и анализа биоморфологических признаков, включая в отдельных случаях цветение, указывает на таксономическую близость данных родов. В настоящее время таксономическое родство представителей *Fragaria* и *Potentilla* активно обсуждается на основе филогенетического анализа с использованием молекулярных маркеров (Potter et al., 2000; Rousseau-Gueutin et al., 2009; DiMeglio et al., 2014; Faghir et al., 2014).

Нами проводятся многолетние исследования по гибридизации *Fragaria* × *ananassa* Duch. ($8x$) × *P. anserina* L. ($4x$) с целью получения $8x$ -агамоспермного потомства для изучения характера генетической изменчивости в потомстве при агамоспермии (Sukhareva, Baturin, 1985; Baturin, 1997, 2001). В результате таких скрещиваний реализуется альтернативный путь развития зародыша, а именно из нередуцированной яйцеклетки по схеме псевдогамной диплоспории (Sukhareva, 1970; Kunz, Gröber, 1988; Baturin, 1997). При этом в семенном потомстве сохраняется материнское число хромосом ($2n = 56$), а численность потомства варьирует в зависимости от генотипа исходной материнской формы (Батурин, 1997). В агамоспермном потомстве проявляется генотипическая изменчивость по маркерным признакам, позволяющая судить о генотипе исходной материнской формы и глубине прохождения мейотических процессов при формировании нередуцированных женских гамет (Maletskii et al., 1994; Baturin et al., 1995). Жизнеспособные межродовые гибриды в семенных потомствах *F. × ananassa* при таких скрещива-

ниях отсутствуют, что делает межродовую гибридизацию удобным методом получения $8x$ -агамоспермных потомков. В одном из экспериментов при использовании в скрещиваниях пыльцы *P. anserina*, наряду с матроморфными потомками с $2n = 56$ был получен сеянец, который оказался полностью стерильным и фенотипически незначительно отличался от видовых признаков *F. × ananassa* (рис. 1). Подсчет чисел хромосом в клетках корневой меристемы этого сеянца показал $2n = 6x = 42$ – промежуточное число хромосом между скрещиваемыми родительскими формами. Сеянец был размножен вегетативно, зафиксирован как образец № 89-3 и предварительно зарегистрирован как «межродовой гибрид».

Однако отсутствие каких-либо морфологических признаков опылителя (*P. anserina*) инициировало нас на проведение молекулярно-генетического анализа, чтобы окончательно убедиться в его гибридном происхождении. Таким образом, целью исследования стал анализ происхождения сеянца № 89-3, полученного от межродового скрещивания *F. × ananassa* × *P. anserina*.

Материалы и методы

В эксперимент включены семенные потомки, полученные при опылении в полевых условиях *F. × ananassa* (гибрид № Л-11-51) × *P. anserina* ($4x$), а именно: образец № 89-3 ($6x$) и четыре фертильных партеногенетических ($8x$) потомка. Исходная материнская форма гибрида № Л-11-51 имела пестичный тип цветков, что исключило кастрацию. Тем не менее, во избежание посещения насекомыми опылителями раскрывающихся цветков, цветочек еще на стадии бутонизации был помещен в изолятор из прозрачного упаковочного целлофана. Цветки, опыленные пыльцой *P. anserina*, сразу были вновь помещены в изолятор и до созревания ягод изолятор не открывался. Опыление проводили однократно при помощи мягкой кисточки. Семена, полученные от скрещивания с *P. anserina*, после стратификации в холодильнике в течение 3-х месяцев при температуре $+3-4^{\circ}\text{C}$, проращивали в земляной смеси (1 часть дерновой земли, 1 часть торфяного перегноя, 1 часть чистого крупнозернистого речного песка), пикировали на стадии 3-4-х настоящих листочков и в фазе развития 6–8 листьев сеянцы высаживали на экспериментальном участке в подготовленную почву и регулярным поливом. Подсчет чисел хромосом у сеянцев проводили на кончиках корешков путем окрашивания хромосом лактопропионовым орсеином (Preeda et al., 2007).

Происхождение семенных потомков определяли, анализируя особенности строения гена ингибитора полигалактуроназы, а также ITS – внутреннего транскрибируемого спейсера, входящего в состав кластера генов, кодирующих рРНК, характерные для каждого из скрещиваемых видов. Известно, что ген ингибитора полигалактуроназы у *P. anserina* короче аналогичного гена *F. × ananassa* на 83 пн вследствие имеющейся в нем делеции (данные Gene Bank).

В дополнение к этому последовательности исследуемого фрагмента гена у *F. × ananassa* и *P. anserina* содержат разное число сайтов рестрикции *TaqI*, расположенных в разных позициях, что позволяет использовать RFLP для эффективной дискриминации ДНК изучаемых видов растений. Эти характеристики определили выбор данного гена в качестве молекулярного маркера в нашем исследовании. ДНК из листьев изучаемых образцов была выделена с помощью набора для выделения Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas. Для проведения ПЦР с геном ингибитора полигалактуроназы были использованы специфические праймеры:

MarFxAPA_F 5'-CAAATTCTAGCATGTTCTGGACAAATC-3'

MarFxAPA_R 5'-СТСAGTCCCTGACTTCTTCAGC-3'.

Для амплификации фрагментов ITS:

P1 5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3'

и P2 5'-TATGCTTAAACTCAGCGGG-3'

Далее амплифицированные фрагменты гена ингибитора полигалактуроназы были подвергнуты обработке эндонуклеазой рестрикции *TaqI*, а ПЦР-фрагменты ITS – *BsuRI* или *MspI*, в буферах и при температурах, оптимальных для каждого из перечисленных ферментов. Электрофоретическое разделение получившихся рестрикционных фрагментов проводили в 6% акриламидном геле.

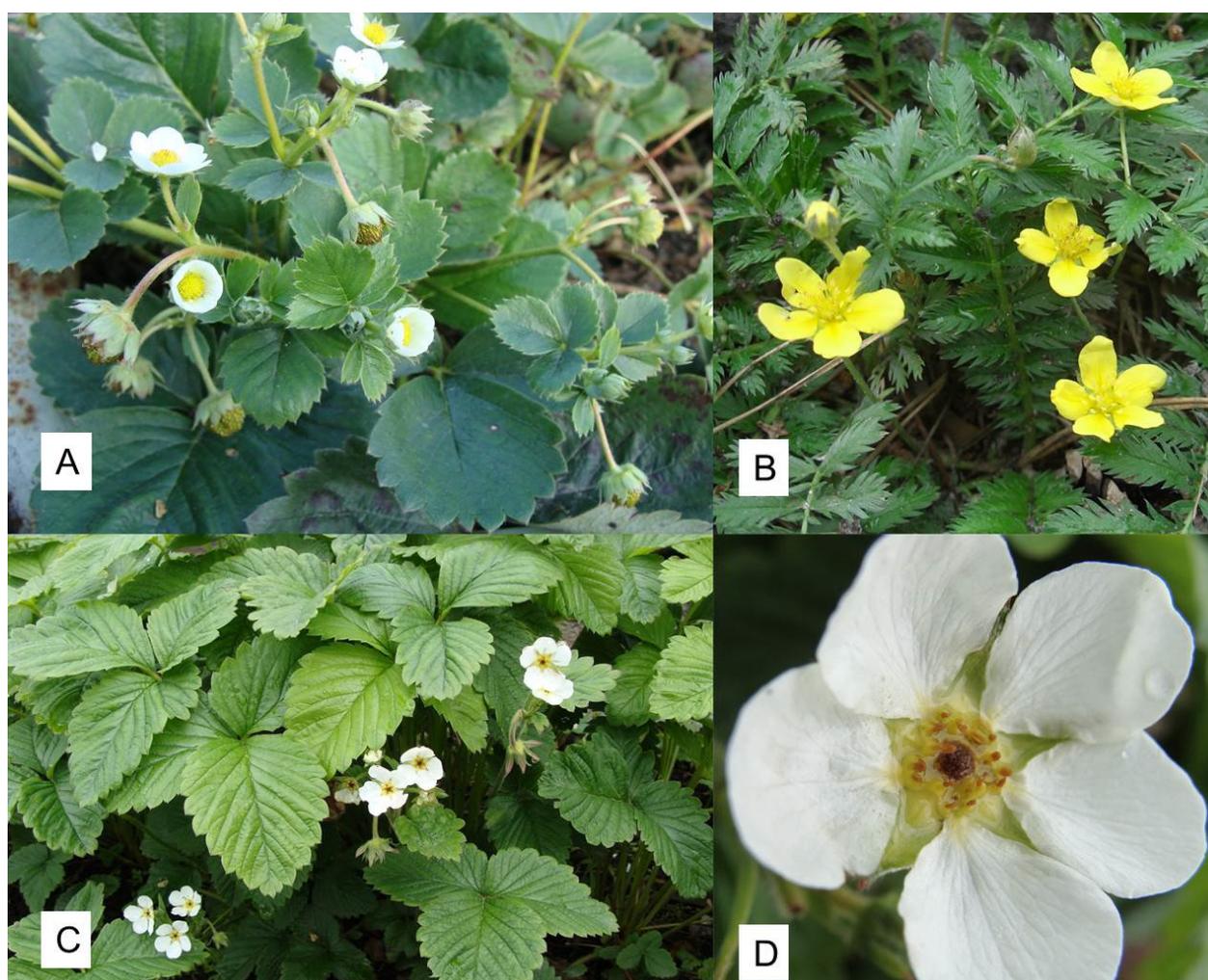


Рис. 1. Материнская форма *F. × ananassa* Duch. № L-11-51 ($2n = 56$) (A), отцовская форма *P. anserina* L. ($2n = 28$) (B) и их семенной потомок образец № 89-3 ($2n = 42$) (C). Полностью стерильный цветок образца № 89-3 (D).

Fig. 1. The maternal form *F. × ananassa* Duch. № L-11-51 ($2n = 56$) (A), paternal form *P. anserina* L. ($2n = 28$) (B) and their seed descendant specimen № 89-3 ($2n = 42$) (C). Fully sterile flower specimen № 89-3 (D).

Результаты

Результаты RFLP-анализа структуры гена ингибитора полигалактуроназы у родительских форм *F. × ananassa* и *P. anserina* и их потомков представлены на рисунке 2. В результате амплификации родительских ДНК у *F. × ananassa* (трек 2) синтезировалось два фрагмента вместо ожидаемого одного. В дополнение к ожидаемому фрагменту, характерному для материнского генома, синтезировался второй, более короткий, по размеру совпадающий с ПЦР-фрагментом *P. anserina* (трек 12). Возможной причиной расхождения ожидаемого и полученного результатов ПЦР следует считать недостаточную информацию об особенностях организации исследуемого гена. Кроме того, возможно наличие в геноме *F. × ananassa* дополнительных гомологичных районов с используемыми

для ПЦР олигонуклеотидными праймерами. Для всех потомков обеих групп характерно наличие двух ПЦР-фрагментов, один из которых (более длинный) свидетельствует о вкладе материнского генома, в то время как происхождение короткого, совпадающего по длине с отцовским, невозможно однозначно интерпретировать (треки 4, 6, 8 и 10). Тем не менее, полученные *TaqI* – рестриционные профили ПЦР-фрагментов семенного потомства *F. × ananassa × P. anserina*, т. е. образца № 89-3 (трек 9) и партеногенетических потомков (треки 3, 5 и 7) выявили их идентичность материнской форме *F. × ananassa* (трек 1), тогда как после обработки эндонуклеазой рестрикции у *P. anserina* был выявлен фрагмент (трек 11), присущий лишь ему, а у других образцов он отсутствовал. Результат анализа гена ингибитора полигалактуроназы указывает на отсутствие у потомков генетического материала *P. anserina*, включая исследуемый образец № 89-3.

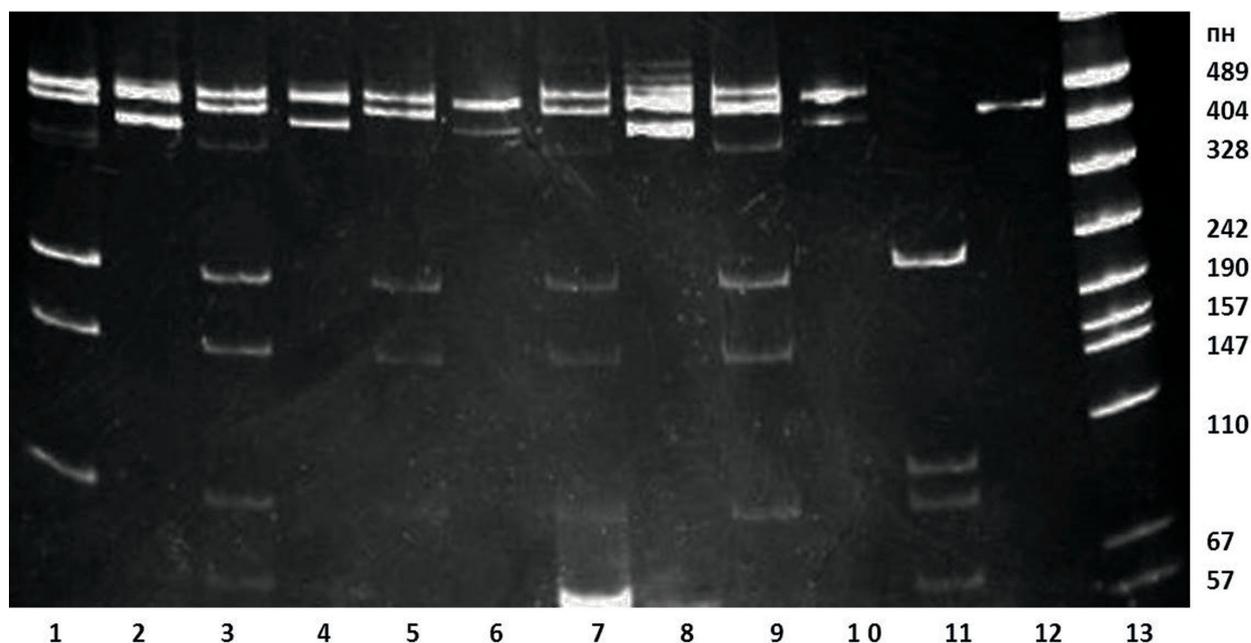


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР фрагментов (четные треки) и рестриционных фрагментов после обработки эндонуклеазой рестрикции *TaqI* (нечетные треки): *F. × ananassa* Duch. (треки 1 и 2), партеногенетические потомки *F. × ananassa* (треки 3–7, 10 – разные генотипы), образец № 89-3 (треки 8, 9), *P. anserina* L. (треки 11, 12), ДНК pBluescript/*MspI* (трек 13).

Fig. 2. The electrophoregram of PCR fragments (even tracks) and the restrictional fragments after the treatment with *TaqI* restriction endonuclease (odd tracks): *F. × ananassa* Duch. – maternal form (tracks 1, 2), parthenogenetic seedlings of *F. × ananassa* (tracks 3-7 and 10 different genotypes); specimen № 89-3 (tracks 8, 9); *P. anserina* L. – paternal form (tracks 11, 12), DNA marker pBluescript / *MspI* (track 13).

В продолжение эксперимента с выяснением происхождения образца № 89-3 был дополнительно проведен молекулярно-генетический анализ с использованием транскрибируемого спейсера ITS, входящего в состав кластера генов, кодирующих рРНК. В настоящее время считается общепринятым, что последовательности спейсера, расположенные между структурными генами рРНК, обладают всеми характеристиками молекулярного маркера, поскольку ITS имеются в геномах всех представителей исследуемого таксона (в нашем случае семейства Rosaceae) и ITS достаточно вариабельны для того, чтобы выявлять различия у разных представителей внутри исследуемой группы. Достаточно информативным представляется ПЦР фрагмента спейсера ITS с последующей обработкой синтезированного фрагмента одной из «частотных» эндонуклеаз рестрикции, образующей полиморфные по длине фрагменты ДНК, которые визуализируются на электрофореграмме. Полное совпадение по

длине и количеству *MspI*- и *BsuRI*-фрагментов у потомков (треки 7 и 8, 1 и 2) и *F. × ananassa* (треки 9, 3) (рис. 3) согласуется с результатом генетического исследования о том, что потомки являются партеногенетическими, а значит, содержат только материнскую ДНК, и свидетельствует о достоверности результата, полученного молекулярными методами. Расположение и длина *MspI*-фрагментов у сеянца № 89-3 (трек 10) идентичны партеногенетическим потомкам и *F. ananassa*. Обращают на себя внимание *BsuRI*-рестрикционные фрагменты сеянца № 89-3, которые совпадают по длине с таковыми у других исследуемых потомков и матери, кроме одного дополнительного, имеющегося только у него одного (трек 4). Однако этот фрагмент отсутствует у *P. anserina* (трек 5), а один из фрагментов уникален для *P. anserina*, и отсутствует у других образцов, включая № 89-3. Таким образом, это дает нам основание исключить присутствие генетического материала *P. anserina* в геноме сеянца № 89-3

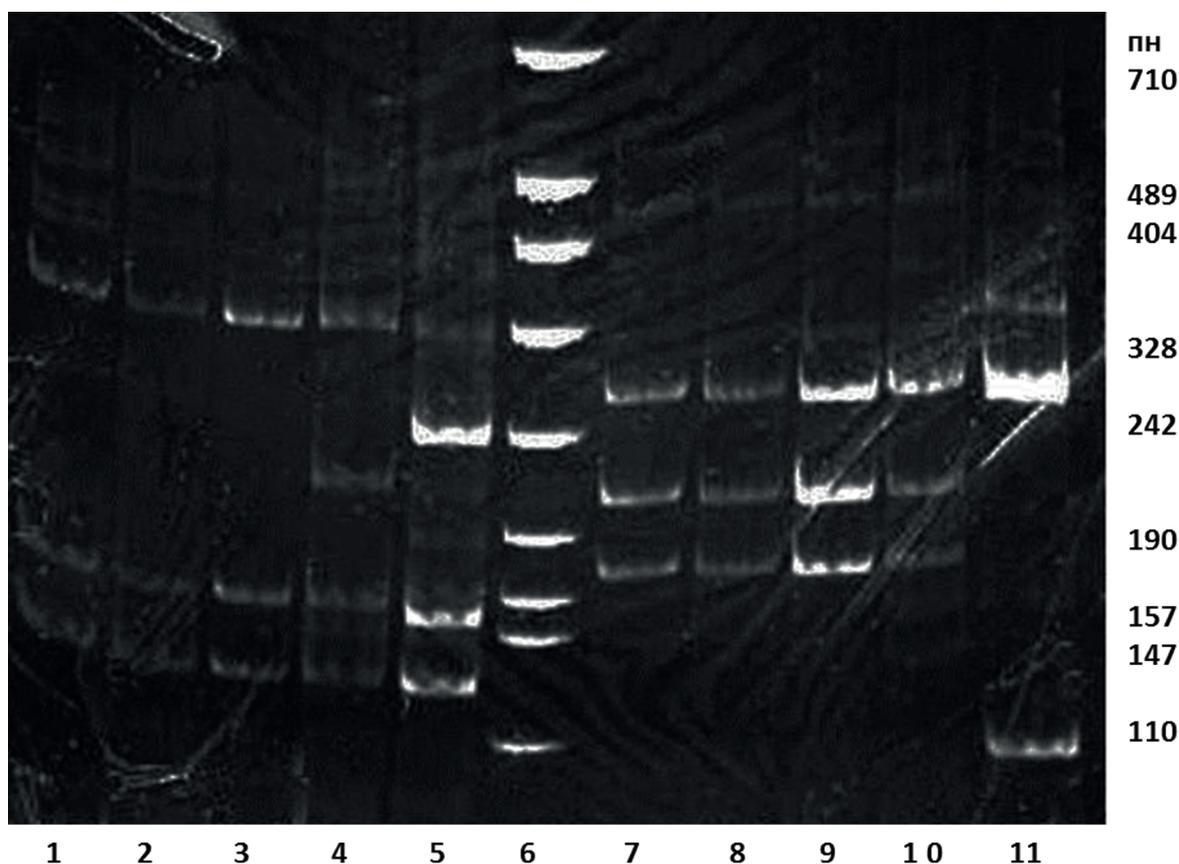


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК, подвергнутых обработке эндонуклеазами рестрикции *BsuRI* (треки 1-5) и *MspI* (треки 7-11): *F. × ananassa* Duch. – материнская форма (треки 3 и 9); партеногенетические потомки (треки 1, 2, 7, 8); образец № 89-3 (треки 4 и 10); *P. anserina* L. – отцовская форма (треки 5 и 11); ДНК-маркер pBluescript/*MspI* (трек 6).

Fig. 3. The electrophoregram of DNA amplification products subjected to *BsuRI* restriction processing (tracks 1-5) and *MspI* (tracks 7-11): *F. × ananassa* Duch. – maternal form (tracks 3 and 9); parthenogenetic seedlings of *F. × ananassa* (tracks 1, 2, 7, 8); specimen № 89-3 (tracks 4 and 10); *P. anserina* L. – paternal form (tracks 5, 11); DNA marker pBluescript / *MspI* (track 6).

Обсуждение

Наиболее простым молекулярно-генетическим методом, позволяющим выявлять происхождение потомков при отдаленной гибридизации, является выявление особенностей строения одного и того же гена у материнской и отцовской формы, а также у их потомков. Однако это не всегда является возможным вследствие того, что в настоящее время первичная нуклеотидная последовательность всего генома определена лишь у небольшого числа растений. Особенно сложно проводить дифференциальный анализ генов у видов, геномы которых являются полиплоидными как у *F. × ananassa*.

Использование при отдаленной гибридизации полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, обладающих видоспецифичностью, в качестве маркерных систем, позволяет безошибочно выявлять в семенном потомстве межвидовые и межродовые гибриды. Одним из таких молекулярных маркеров является внутренний транскрибируемый спейсер ITS. Показано, что ITS как некодирующие последовательности эволюционируют с высокой скоростью и могут существенно отличаться даже у близкородственных видов. Эти характеристики позволяют использовать ITS для филогенетических исследований и классификации растений на разных таксономических уровнях – родовом, видовом и подвидовом (Feliner, Rosselló, 2007). Важным отличием внутренних транскрибируемых спейсеров является двуродительское наследование ITS, поскольку в случае однородительского (цитоплазматического, агамоспермного) наследования маркера невозможно точно идентифицировать недавно возникшие гибриды (Alvarez, Wendel, 2003). Проведенный нами анализ ПЦР фрагментов ITS с последующей их обработкой эндонуклеазами рестрикции показал, что в геноме предполагаемого «межродового гибрида» (образец № 89-3) отсутствует генетический материал *P. anserina*. Проанализированные потомки от скрещивания *F. × ananassa* и *P. anserina* – образец № 89-3 и партеногенетические сеянцы, по ITS соответствуют материнской форме *F. × ananassa*. Дополнением к полученному результату явился анализ особенностей строения гена ингибитора полигалактуроназы у родительских видов *P. anserina* и *F. × ananassa*, а также партеногенетических потомков и предполагаемого «межродового гибрида» – образца № 89-3. Данный анализ также подтвердил отсутствие генетического материала *P. anserina* в геноме образца № 89-3, что в конечном итоге позволяет идентифицировать образец № 89-3 как анеуплоид, а не межродовой гибриды. Появление дополнительных сайтов рестрикции *BsuRI*, в результате чего образовался новый фрагмент после обработки эндонуклеазой рестрикции в исследуемом районе сеянца № 89-3 – предмет дальнейших исследований. Одной из причин его появления можно предположить наличие

внутривидового и внутриорганизменного полиморфизма ITS района (Alvarez, Wendel, 2003).

Следует отметить, что скрещивания *F. × ananassa* с участием пыльцы *P. anserina* (4x) предпринимались неоднократно. Первые упоминания об использовании пыльцы *P. anserina* в скрещиваниях с представителями *Fragaria* приводятся в работе J. K. Jones (1955). Однако ни один из полученных проростков не достиг полноценного развития. В опытах Г. Н. Шангина-Березовского (Shangin-Berezovsky, 1962) по скрещиванию *F. × ananassa × P. anserina*, все полученные сеянцы в своем развитии достигли лишь фазы 1–2 настоящих листочков и затем погибли. С. Asker (1971) получил жизнеспособные сеянцы, однако они оказались агамоспермного происхождения, т.е. содержали $2n = 8x = 56$. Автор предполагает происхождение октоплоидного набора хромосом у сеянцев благодаря редупликации яйцеклетки, развивающейся партеногенетически. Исследователи F. Barrientos и R. Bringhurst (1973) при скрещивании крупноплодной земляники сорта Tioga с *P. anserina* из 34 семян получили 2 сеянца. Один из них оказался тетраплоидом ($2n = 28$), цвет и образовывал столоны, другой был полустерильным октоплоидом ($2n = 56$). При опылении сортов крупноплодной земляники пыльцой *P. anserina* H. Hughes и J. Janick (1974) получили гаплоидные и октоплоидные сеянцы, а G. Jelenkovic с соавторами (1984) получили 6 матроморфных сеянцев (8x) с изменчивостью по многим признакам. Гибридов получить не удалось. Таким образом, из опубликованных сведений по гибридизации *Fragaria × Potentilla* использование в качестве опылителя *P. anserina* не дало положительного результата в получении межродовых гибридов.

Следует отдельно остановиться на одном из самых объемных экспериментов по скрещиванию различных сортов *F. × ananassa* с представителями *Potentilla* (19 видов), который был осуществлен K. Niemirowicz – Szczytt (1987). За период 1977–1980 гг. ею было получено 99 194 семян при межродовой гибридизации *Fragaria × Potentilla*. Большая часть семян оказалась невсхожей. Всхожие семена были получены лишь при использовании пыльцы диплоидных видов *P. geoides* Bieb., *P. rupestris* L., *P. purpureoides* L., *P. glandulosa* Lindl., *P. fruticosa* L. и гексаплоидного вида *P. fragiformis* Willd. В комбинациях скрещиваний с участием этих видов автору удалось получить 153 растения, пригодных для определения числа хромосом. Из них большая часть растений (41%) были тетраплоиды – 63 шт., пентаплоиды – 29 шт., гексаплоиды – 27 шт., октоплоиды – 13 растений, триплоиды – 9, по одному растению указано в группе диплоидов и гектаплоидов и 10 растений отнесены к миксоплоидам и анеуплоидам. Тщательный биоморфологический анализ 123 растений из этой группы не выявил присутствия у них каких-либо признаков *Potentilla*. Автор заключает, что все растения, полученные в результате опыления земляники пыльцой *Potentilla*, характеризовались признаками, присущими

только материнским формам (Niemirowicz-Szczytt, 1987). Таким образом, в выводах автора нет однозначного утверждения о гибридном происхождении 29 пентаплоидов, полученных в комбинациях скрещиваний $8x \times 2x$.

Схожий результат был получен W. Macfarlane и J. Jones (1985) в скрещиваниях *F. moschata* Duch. ($2n=42$) с *P. fruticosa* ($2n = 14$). Из 554 семян было получено лишь 9 взрослых растений. Пять растений погибло до цветения, а остальные четыре были мощными, но стерильными. Четыре растения имели ожидаемое для гибрида число хромосом ($2n=28$), одно растение имело ($2n=21$) в соматических клетках, а четыре были анеуплоидами с 23, 24, 25 и 27 хромосомами в соматическом наборе соответственно. Авторы полагают, что все девять растений произошли от нормального оплодотворения, которое в некоторых случаях сопровождалось устранением хромосом на ранней стадии развития эмбриона.

Итак, анализируемый образец № 89-3 не обнаруживает морфологических признаков опылителя – *P. anserina*, хотя и содержит промежуточное число хромосом $2n = 6x = 42$, ожидаемое для межродового гибрида. Анализ его происхождения по молекулярным маркерам подтвердил отсутствие генетического материала опылителя. В таком случае возникает вопрос о происхождении промежуточного числа хромосом для гибрида у этого образца. Показано, что в скрещиваниях *Fragaria* × *Potentilla* пыльцевые трубки представителей *Potentilla* прорастают сквозь ткани столбика и достигают зародышевого мешка (Niemirowicz-Szczytt, 1987; Baturin, 1997). Кроме того, возможность оплодотворения в скрещиваниях *Fragaria* × *Potentilla* подтверждается наличием немногочисленных межродовых гибридов в скрещиваниях *F. × ananassa* × *P. fruticosa* (Harland, 1957; Ellis, 1962; Jelenkovic et al., 1984; Sayegh, Hennerty, 1993); *F. × ananassa* × *P. palustris* L. (Ellis, 1962); *F. moschata* × *P. fruticosa* (Asker, 1970) и др. Причем в оплодотворении могут принимать участие как нередуцированные женские гаметы (Bringhurst, Gill, 1970; Sukhareva, 1978; Nosrati et al., 2013), так и мужские нередуцированные гаметы (Sukhareva, 1970, 1978; Yanagi et al., 2010), образуя алополиплоиды и анеуплоиды при гетероплоидных скрещиваниях. В связи с этим мы полагаем, что наиболее вероятным сценарием формирования у исследуемого образца № 89-3 хромосомного набора $2n = 42$ следует считать элиминацию 14 хромосом *P. anserina* и 14 хромосом *F. × ananassa* во время первых митотических делений зиготы ($2n = 70$), образовавшейся при оплодотворении нередуцированной яйцеклетки *F. × ananassa* ($n = 56$) редуцированным спермием *P. anserina* ($n = 14$). В итоге геномный материал гусиной лапчатки в последующих делениях зародыша отсутствовал, и сеянец проявляет лишь признаки *F. × ananassa*. Подобное преобразование гибридного генома вплоть до уменьшения размера генома (Eilam et al., 2008), в настоящее время интерпретируется как проявление «геномного шока», присутствующего постзиготической несовместимости при отдаленной

гибридизации. Согласно Л. А. Першиной и Н. В. Трубацеевой (Pershina, Trubacheeva, 2016) при отдаленной гибридизации: «Ранние этапы постзиготического периода являются критическими для развивающихся гибридных семян из-за гибели зародышей, в том числе связанной с однородительской элиминацией хромосом из гибридных клеток и аномальным развитием эндосперма». Обсуждая перспективы практического использования образца № 89-3, первоначально стоит отметить его высокую зимостойкость (0 баллов подмерзания), плотную облиственность, высокую силу роста и обилие усов, которые он показывает в течение многих лет наблюдения за ним (с 2010 года) при выращивании в открытом грунте. Эти качества анеуплоида в совокупности с наличием в листьях каротиноидов и хлорофиллов «а» и «в» на уровне содержания таковых в листьях фармакопейного лекарственного растения *Fragaria vesca* L. (неопубликованные данные) обуславливают перспективность его использования для производства ферментированных чайных напитков (Baturin et al., 2001). Безусловно, наличие у образца полной стерильности исключает его непосредственное использование в селекционных программах. Тем не менее, он может быть перспективен для использования в проектах по озеленению как почвопокровное растение.

Заключение

Скрещивания *F. × ananassa* ($8x$) × *P. anserina* ($4x$) представляют собой привлекательную модель изучения геномных взаимодействий. При таких скрещиваниях наличие $8x$ -потомков указывает на агамоспермный путь их происхождения, а отсутствие межродовых гибридов – на постзиготический характер несовместимости при объединении в зиготе геномов родительских форм. Однако появление $6x$ -анеуплоида следует рассматривать как возможность преодоления постзиготического барьера несовместимости при отдаленных скрещиваниях за счет элиминации части генома зиготы, включающего хромосомы отцовского родителя. Репродуктивная изоляция анеуплоида, ввиду его полной стерильности, обуславливают перспективность использования его лишь как почвопокровное растение, а также получения фитомассы для производства ферментированных чайных напитков.

References/Литература

- Alvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*; 29: 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- Asker S (1970) An intergeneric *Fragaria* × *Potentilla* hybrid. *Hereditas* 64: 135–139. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1970.tb02281.x>
- Asker S (1971) Some viewpoints on *Fragaria* × *Potentilla* intergeneric hybridization. *Hereditas* 67: 181–190. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1971.tb02372.x>
- Barrientos F, Bringhurst RS (1973) A haploid of an octoploid strawberry cultivar. *Hort. Science*; 8: 44.
- Baturin SO (1997) Experimental apomixis in garden strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) (Eksperimental'nyj apomiksiz u sadovoj zemlyaniki (*Fragaria × ananassa* Duch.)) : Extended

- Abstract of Cand. Sci. Dissertation. Novosibirsk, 1997. 16 p. [in Russian] (Батури́н С. О. Экспериментальный апоми́ксис у садовой земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1997. 16 с.).
- Baturin SO (2001) The morphology of apomictic progenies of *Fragaria* × *ananassa* Duch. analysis. *Agricultural Biology*; 1: 39-43 [in Russian] (Батури́н С. О. Сравнительно-морфологический анализ апоми́ктического потомства крупноплодной земляники. Сельскохозяйственная биология. 2001. № 1. С. 39-43).
- Baturin SO, Sukhareva NB, Bagautdinov RG, Kondratieva IV (2001) Prospects for utilization and ways to increase the productivity of strawberry phytomass (Perspektivy utilizatsii i puti povysheniya produktivnosti fitomassy zemlyaniki). In : Mater. mezhd. nauchno-prakt. konf. "Pishcha. Ekologiya. Kachestvo". In : Mater. of the intern. scien.-pract. conf. "Food. Ecology. Quality". Novosibirsk: 56-58 [in Russian] (Батури́н С. О., Сухарева Н. Б., Багаутдинов Р. Г., Кондратьева И. В. Перспективы утилизации и пути повышения продуктивности фитомассы земляники – В Сб. матер. межд. научно-практ. конф. «Пища. Экология. Качество.» Новосибирск, 2001. С. 56-58).
- Baturin SO, Sukhareva NB, Maletskii SI (1995) Application of apomixis for studying inheritance of everbearing habit in garden strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Russian Journal of Genetics*; 31(10): 1207-1212 [in Russian] (Батури́н С. О., Сухарева Н. Б., Малецкий С. И. Использование апоми́ксиса для изучения наследования ремонтантности у Земляники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1995. Т. 31, № 10. С. 1418-1424).
- Bringham RS, Gill T (1970) Origin of *Fragaria* polyploids. II Unreduced and doubled-unreduced gametes. *J. Bot.* 57(8): 969-976.
- DiMeglio LM, Staudt G, Yu H, Davis TM (2014) A phylogenetic analysis of genus *Fragaria* (strawberry) using intron-containing sequence from the *ADH-1* gene. *PloS ONE*, 9(7):e102237. doi: 10.1371/journal.pone.0102237
- Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Feldman M (2008) Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome*; 51: 616-627. DOI: 10.1139/G08-043
- Ellis JR *Fragaria-Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria* (1962). *Proc. Linn. Soc. Lond.*; 173: 99-106. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1962.tb01300.x>
- Faghir MB, Attar F, Farazmand A, Kazempour Osaloo S (2014) Phylogeny of the genus *Potentilla* (Rosaceae) in Iran based on nrDNA ITS and cpDNA *trnL-F* sequences with a focus on leaf and style characters' evolution. *Turk. J Bot.*; 38: 417-429. DOI:10.3906/bot-1303-67
- Feliner GN, Rossello JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // *Mol. Phylogenet. Evol.*; 44(2): 911-919. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.01.013>
- Jelenkovic G, Wilson ML, Harding PJ (1984) An evaluation of intergeneric hybridization of *Fragaria* spp. × *Potentilla* spp. as a means of haploid production. *Euphytica*; 33: 143-152. <https://doi.org/10.1007/BF00022760>
- Jones JK Cytogenetic studies in the genera *Fragaria* and *Potentilla* (1955) Ph. D. thesis. Univ. of Manchester, UK.
- Harland SC (1957) Cytogenetical investigations on soft fruits. *Progr. Rep. for the period ending 31 May 1957*, Univ. Manchester, Dep. Bot., A.R.C. 57: 347.
- Hughes HG, Janick J (1974) Production of tetrahaploids in the cultivated strawberry. *Hort. Science*; 9(5): 442-444.
- Kaczmarzka E (2005) Ocena zró nicowania genetycznego potomstwa *Fragaria moschata* × *Potentilla fruticosa* przy użyciu markerów RAPD. *Annales Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Lublin-Polonia*. XV: 145-155.
- Kunz E, Gröber K (1988) Über das Vorkommen meiotischer und apomeiotischer Embryosacke in der Gattung *Fragaria* (L.). *Kulturpflanze* 36(3): 317-330. <https://doi.org/10.1007/BF02034814>
- Liston A, Crownn R, Ashman T (2014) *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *Amer. J. of Bot.*; 101(10): 1686-1699. DOI: 10.3732/ajb.1400140
- Macfarlane Smith WH, Jones JK (1985) Intergeneric crosses with *Fragaria* and *Potentilla*. I. Crosses between *Fragaria moschata* and *Potentilla fruticosa*. II. Crosses between the progeny of *Fragaria moschata* × *Potentilla fruticosa* and the original parents. *Euphytica*; 34(3): 725-744. <https://doi.org/10.1007/BF00035410>
- Maletskii SI, Sukhareva NB, Baturin SO (1994) Sex inheritance in apomictic seedlings of the garden strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Russian Journal of Genetics*; 30(2): 214-219 [in Russian] (Малецкий С. И., Сухарева Н. Б., Батури́н С. О. Наследование пола у апоми́ктических сеянцев Земляники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 237-243).
- Mangelsdorf AJ, East EM (1927) Studies on the genetics of *Fragaria*. *Genetics*; 12: 307-339.
- Marta A, Camadro E, Diaz-Ricci J, Castagnaro A (2004) Breeding barriers between the cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa* and related wild germplasm. *Euphytica*; 136(2): 139-150. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000030665.95757.76>
- Niemirowicz-Szczytt K (1987) Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) haploids and their generative progeny. Induction and characteristics. Warsaw Agricultural University Press, 71.
- Nosrati H, Price AH, Gerstberger P, Wilcock CC (2013) The first report of an alloheptaploid from the genus *Fragaria* (Rosaceae) // *New Journal of Botany*; 3(3): 205-209. DOI: 10.1179/2042349713Y.0000000033
- Pershina LA, Trubacheeva NV (2016) Interspecific incompatibility in wide hybridization of plants and ways to overcome. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 20(4): 416-425 [in Russian] (Першина Л. А., Трубаچهва Н. В. Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. 20. № 4. С. 416-425). DOI 10.18699/VJ16.082
- Potter D, Luby JJ, Harrison RE (2000) Phylogenetic relationship among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Syst. Bot.*; 25(2): 337-348. <https://doi.org/10.2307/2666646>
- Preeda N, Yanagi T, Sone K, Taketa S, Okuda N (2007) Chromosome observation method at metaphase and pro-metaphase stages in diploid and octoploid strawberries. *Scientia Horticulturae*; 114(2): 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.001>
- Rousseau-Gueutin M, Gaston A, Ainouche A, Ainouche ML, Olbricht K, Staudt G, Richard L, Denoyes-Rothan B (2009) Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol. Phylog. Evol.*; 51: 515-530. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.12.024
- Sayegh AJ, Hennerty MJ (1993) Intergeneric hybrids of *Fragaria* and *Potentilla*. *Acta Horticulturae*; 348: 151-154. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.348.19>
- Shangin-Berezovsky GN (1962) The maternal inheritance in strawberries (O materinskome nasledovanii u zemlyaniki). *Trudy Instituta genetiki – Proceedings of the Institute of Genetics*; 26: 68-84 [in Russian] (Шангин-Березовский Г. Н. О материнском наследовании у земляники // Тр. Ин-та генетики. 1962. 26. С. 68-84).
- Sukhareva NB (1970) Elements of apomixis in strawberries (Elementy apomiksisa u zemlyaniki). In: Apomixis i selektsiya – In: Apomixis and Selection. Novosibirsk: 116-120 [in Russian] (Сухарева Н. Б. Элементы апоми́ксиса у земляники В кн.: Апоми́ксис и селекция. Новосибирск, 1970. С. 116-120).
- Sukhareva NB (1978) The value of unreduction of gametes in *Fragaria* (Znachenie neredukttsii gamet u *Fragaria*). In : Apomixis u rastenij i zhivotnykh – In : Apomixis in plants and animals. Novosibirsk: 118-128 [in Russian] (Сухарева Н. Б. Значение нереду́кции гамет у *Fragaria*. В кн. : Апоми́ксис у растений и животных. Новосибирск, 1978. С. 118-128).
- Sukhareva NB, Baturin SO (1985) Intergeneric crossings in *Fragaria* (O mezhrodovyykh skreshhivaniyakh *Fragaria*). In: Teoreticheskiye osnovy selektsii – Theoretical bases of selection. Novosibirsk: 151-162 [in Russian] (Сухарева Н. Б., Батури́н С. О. О межродовых скрещиваниях *Fragaria*: Теоретические основы селекции. Новосибирск, 1985. С. 151-162).
- Yanagi T, Hummer KE, Iwata T, Sone K, Nathewet P, Takamura T (2010) Aneuploid strawberry ($2n = 8x + 2 = 58$) was developed from homozygous unreduced gamete ($8x$) produced by second division restitution in pollen // *Scientia Horticulturae*; 125(2): 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.015>

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЗЕРНА ТЕТРАПЛОИДНОЙ КУКУРУЗЫ

Хатефов Э. Б.^{1,2}, Хорева В. И.¹, Керв Ю. А.¹,
Шеленга Т. В.¹

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, 190000, Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42–44

² Научно-исследовательский институт сельского хозяйства КБНЦ РАН, 360004, Кабардино-Балкарская республика, г. Нальчик, ул. Кирова, 224.

e-mail: haed1967@rambler.ru

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF TETRAPLOID MAIZE GRAIN

Khatefov E. B.^{1,2}, Horeva V. I.¹, Kerv Yu. A.¹,
Shelenga T. V.¹

¹ N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) 42–44 Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg 190000, Russia

² Research Institute of Agriculture, Kabardino-Balkar Scientific Center of the RAS, 224 Kirova St., Nalchik, Kabardino-Balkar Republic 360004, Russia

e-mail: haed1967@rambler.ru

Тетраплоидная кукуруза привлекает селекционеров крупными размерами зерна и початка, повышенным содержанием питательных веществ, высоким урожаем зеленой массы в сравнении с диплоидной, поэтому исследование ее биохимического состава и пищевой ценности для создания исходного селекционного материала актуально. Основной задачей работы являлось выявление различий между образцами тетраплоидной кукурузы из коллекции ВИР на уровне спектров метаболитов. Сравнение значений содержания общего сахара в зерновках, гомозиготных по гену *su2*, не выявило существенных различий между диплоидными и тетраплоидными генотипами, тогда как по фракциям сахаров обнаружены некоторые различия. Исследования показали, что в диплоидных зерновках отклонения от значения стандарта по содержанию общих сахаров составляют –8,2 мг/100 г, а в тетраплоидных –2,9 мг/100 г, хотя общее соотношение доминантных и рецессивных аллелей (1AA : 2aa) сохраняется одинаковым у обоих генотипов. Тетраплоидная сахарная кукуруза в сравнении с диплоидной показала большую вариативность (CV) по содержанию в зерне белка (CV = 6,80%), крахмала (CV = 8,27%) и масла (CV = 13,3%). Выделены потенциальные доноры высокого содержания белка, крахмала и масла в зерне тетраплоидной сахарной кукурузы. Создан новый сорт тетраплоидной сахарной кукурузы Баксанская сахарная с урожайностью до 16 т/га товарных початков молочной спелости, преимущественно двухпочаткового типа. Сорт характеризуется высокими вкусовыми качествами за счет того, что его зерно содержит 16,3% белка, 63,2% крахмала и 7,5% масла. Сорт отличается устойчивостью к биотическим факторам среды. Геном тетраплоидов за счет большей, чем у диплоидов, генетической емкости обеспечивает большую вариативность биохимического состава зерна и других селекционно ценных признаков. Создание новых, высокоурожайных гибридов сахарной кукурузы на основе тетраплоидных образцов коллекции ВИР позволит селекционерам существенно расширить генетический полиморфизм и сортимент современных селекционных достижений кукурузы, будет способствовать обеспечению качественным сырьем для пищевой и консервной промышленности.

Ключевые слова: кукуруза, тетраплоид, биохимический состав, мутация, селекция.

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР (№ 0662-2019-0006).

Хатефов Э. Б., Хорева В. И., Керв Ю. А., Шеленга Т. В.
Особенности биохимического состава зерна тетраплоидной кукурузы. Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 32-41.
DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-32-41

Khatefov E. B., Horeva V. I., Kerv Yu. A., Shelenga T. V.
Biochemical properties of tetraploid maize grain. Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 32-41.
DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-32-41

Хатефов Э. Б. orcid.org/0000-0001-5713-2328
Шеленга Т. В. orcid.org/0000-0003-3992-5353
Хорева В. И. orcid.org/0000-0003-2762-2777

Tetraploid maize attracts breeders because of its large kernel and cob sizes, high nutrient content, and higher yield of herbage mass than diploid maize. Hence, it is important to study its biochemical composition and nutritional value in order to develop original source material for breeding. Accessions of tetraploid sweet corn from VIR's genebank were used to analyze biochemical composition of the grain. The main task of the work was to identify differences among the accessions at the level of the metabolite spectra. A comparison of the values in the content of total sugars in kernels homozygous for the *su2* gene did not reveal significant differences between diploid and tetraploid genotypes, while the fractions of sugars revealed some differences. Studies have shown that in diploid grains deviations from the reference for the total sugars content are –8.2 mg/100g, and in tetraploid ones, –2.9 mg/100g, although the overall ratio of dominant and recessive alleles (1AA:2AA) remains the same in both genotypes. Tetraploid sweet corn showed greater variability of the coefficient of variation (CV) in the grain protein content (CV = 6.80%), starch (CV = 8.27%) and oil (CV = 13.3%) compared with the diploid one. Potential donors of high protein, starch and oil contents in the kernel of tetraploid sweet corn were identified. A new cultivar of tetraploid sweet corn, 'Baksanskaya Sakharnaya', was developed, with a yield up to 16 t/ha of cobs in a marketable milky ripeness state and representing predominantly the double-cob type. This cultivar has high flavor qualities due to the fact that its kernels contain 16.3% of protein, 63.2% of starch, and 7.5% of oil. Moreover, the cultivar is resistant to biotic environmental factors. The tetraploid genome provides greater variability of the kernel's biochemical composition and other economically valuable traits due to its greater genetic capacity, compared with the diploid genome. Development of new high-yielding hybrids of sweet corn based on VIR's holdings will allow breeders to significantly broaden the genetic polymorphism and assortment of modern breeding achievements, and contribute to providing high-quality raw materials for food and canning industry.

Keywords: maize, tetraploid, biochemical composition, mutation, breeding.

УДК: 633.15: 631.52

Поступила в редакцию: 12.10.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Введение

Кукуруза (*Zea mays* L.)—это одна из важнейших зерновых культур в мире, и ее удельный вес в мировом зерновом балансе составляет более 30% (Shpaar, 2008). В 2017 году мировой рынок кукурузы составил 1112 млн т (www.ab-centre.ru). На протяжении последних трех лет в России наблюдается как спад, так и подъем производства кукурузы на зерно. В 2017 году в России было произведено 13 235,7 тыс. т кукурузы на зерно, что на 13,5% ниже объема производства предыдущего года (<http://alto-group.ru>).

Показатели биохимического состава зерна кукурузы занимают важное место в селекционной работе, поэтому тетраплоидная кукуруза остается привлекательным объектом для исследований за счет повышенного содержания в зерне белка наравне с высокой урожайностью листостебельной массы и товарных початков. Селекционеры уделяют особое внимание содержанию в зерне сахарной кукурузы белка, поскольку от этого показателя зависят и вкусовые качества, и потребительский спрос товарной продукции (Pavlov, 1968). Особую ценность имеют генотипы, созданные на основе мутаций, несущих аллели генов, контролирующих аминокислотный состав белков и жирнокислотный состав содержащегося в зародыше масла. При этом селекционеры сталкиваются с проблемой расщепления признаков в последующих поколениях вследствие совмещения в исходном генотипе большого числа ценных генов. В случае селекции сахарной и других пищевых подвидов кукурузы на тетраплоидном уровне число хромосом возрастает в два раза, что позволяет селекционерам объединить в одном гибридном генотипе больше ценных аллелей генов, влияющих на химический состав зерна (Khatfov et al., 2018a, b). Следовательно, селекция пищевой кукурузы существенно увеличивает изменчивость изучаемых признаков путем введения в ее генотип нужных сочетаний и числа аллелей генов, контролирующих питательные и вкусовые свойства зерна.

Целью проведенных исследований было определение особенностей биохимического состава зерна кукурузы при взаимодействии аллелей генов *sugary endosperm* (*su2*) в гомозиготном и гетерозиготном состояниях в генотипах тетраплоидной и диплоидной кукурузы, изучение перспектив их селекции.

Материалы и методы исследований

Объектом для исследований являлись сорта и линии диплоидной и тетраплоидной сахарной кукурузы. Линии тетраплоидной сахарной кукурузы получены в результате инцухта потомства зерновок, несущих ген *su2* в гомозиготном состоянии, выделенных из популяции зубовидной тетраплоидной кукурузы МРПП-20 селекции КБНИИСХ, с последующим длительным позитивным отбором по селекционно ценным признакам. Сорт тетраплоидной сахарной кукурузы Баксанская сахарная создан на осно-

ве линий сахарной кукурузы, полученных из потомства зерновок с геном *su2*, выделенных из популяции МРПП-20. В качестве диплоидного стандарта использовали сорта сахарной кукурузы Ника-353 селекции КБНИИСХ и Ранняя лакомка селекции ООО ИПА «ОТБОР», а для определения биохимических особенностей зерна тетраплоидной сахарной кукурузы в качестве тетраплоидного стандарта – образец С-430 из генетической коллекции ВИР. Все образцы тетраплоидной сахарной кукурузы, использованные в опыте, переданы в коллекцию ВИР в 2018 г. Исследования проводили в период с 2008 по 2018 г. на территории Кабардино-Балкарии ОПХ «Нартан» при ИСХ КБНЦ РАН. Селекционный участок расположен в пределах предгорной зоны Северного Кавказа, на водоразделе рек Урвань – Нальчик. В основном, почвы представлены луговыми черноземами. Содержание гумуса в пахотном слое не превышает 2,64%, реакция почвенного раствора по всему почвенному профилю среднещелочная (рН = 8,1), со средней емкостью поглощения в пахотном слое (32 мг/экв на 100 г почвы), которая уменьшается постепенно с увеличением глубины. Значения содержания карбонатов в пахотном слое варьируют от среднего (6,7%) на поверхности до высокого (14,7%) на глубине. Обеспеченность почвы подвижным фосфором очень низкая (0,4 мг/100 г почвы), а обменным калием – очень высокая (8 г/100 г) (Grigoriev, 1948).

Климат зоны характеризуется как умеренно жаркий при сумме активных температур 3000–3200°C и умеренном увлажнении (коэффициент увлажнения 0,5–0,9), гидротермический коэффициент варьирует в пределах 0,9–1,2. В целом за период исследований рост и развитие кукурузы проходили при избытке тепла и дефиците влаги.

Опыты по изучению диплоидных и тетраплоидных генотипов кукурузы, фенологические наблюдения проводили по методикам ВАСХНИЛ и ВИР (Shmaraev, Matveeva, 1985), методическим указаниям по производству гибридных и сортовых семян кукурузы ВАСХНИЛ и ВНИИ кукурузы (Sokolov et al., 1975). Испытание образцов кукурузы проводили в двукратной повторности. Делянки двухрядковые, площадью 4,9 м². Ширина междурядий 0,7 м, густота стояния 60 тыс. растений на 1 га. Измерения и учеты проводились на 10 растениях и 10 початках в двукратной повторности. Изучение фенотипических признаков линий осуществляли в соответствии с Методическими указаниями по селекции кукурузы ВАСХНИЛ и ВНИИ кукурузы (Filev et al., 1980), а биометрические показатели и их описания даны согласно «Широкому унифицированному классификатору СЭВ и международному классификатору СЭВ видов *Zea mays* L.» (1977). Устойчивость к холоду и засухе определяли согласно методике «Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям» ВИР (Chumakov, 1974). Содержание в зерновках белка, крахмала, масла определяли методом инфракрасной спектроскопии на приборе Infracat 1241 Grain Analyzer (Швеция), содержание сахаров – по

А. И. Ермакову (Ermakov, 1972). Анализ метаболитов в зерне проводили с помощью газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ГЖХ МС) на хроматографе Agilent 6850 с квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 5975B VL MSD фирмы Agilent Technologies Inc. (США). Полученные результаты обрабатывались с помощью программы UniChrom (Shelenga et al., 2014). Экспериментальные данные анализировали различными методами биометрической статистики (Доспехов, 1972). Для проведения цитогенетического анализа использовали методику окрашивания хроматина мейоцитов ацетокармином по (Pausheva, 1970). Окрашивание и подсчет чисел хромосом в соматических клетках проводили по Фельгену с фуксинсернистой кислотой (Pausheva, 1970). Для мацерации фиксированного материала использовали пектиназу от *Aspergillus niger* и целлюлазу от *Trichoderma viride* фирмы SERVА. Анализ мультивалентных ассоциаций хромосом проводили по С. Д. Дарлингтону (Darlington, 1937).

Результаты и их обсуждение

Открытие генов *sugary endosperm (su)*, *waxy endosperm (wx)*, *amylase extender (ae)*, *dull endosperm (du)*, *shrunk endosperm (sh)*, *opaque-2 (o₂)*, *floury-2 (fl₂)* и других, несущих мутации эндосперма у кукурузы, значительно ускорило исследования, направленные на улучшение качественного (биохимического) состава зерна (Wilson, Alexander, 1967; Lebedev et al., 1979; Miku, 1981; Palii, 1989). Отечественными и зарубежными селекционерами были созданы сорта и гибриды, которые несут отдельные эндоспермовые мутации, положительно влияющие на качество зерна (Ugenheimer, 1979; Khadzhinov, 1975; Galeyev et al., 1971; Gurev, Kozubenko, 1976; Sotchenko, Novoselov, 1995). До настоящего времени все исследования таких мутаций проводились на диплоидной кукурузе, и лишь отдельные авторы сравнивали биохимический состав форм кукурузы различной пloidности (Palii, 1989). На пищевых подвидах кукурузы и, в частности, тетраплоидной сахарной кукурузе, подобные вопросы и вовсе не изучались. В селекции пищевой сахарной кукурузы нашли широкое применение гены *sugary endosperm (su)* и *shrunk endosperm (sh)*, которые за счет эффекта, нарушающего процесс перехода сахаров в крахмал, характеризуются способностью к накоплению сахаров в зерновке (Palii, 1989).

Коллекция тетраплоидной сахарной кукурузы ВИР

(300 образцов) создана на основе тетраплоидной популяции зубовидной кукурузы МРПП-20. Источник для получения популяции МРПП-20 создан в Краснодарском НИИСХ им. П. П. Лукьяненко В. С. Щербак на основе тетраплоидной популяции Синтетик В (США) с участием сорта Кубанская сахарная и 1/16 генома многолетнего тетраплоидного теосинте *Zea perennis Hitchc.* ($2n = 40$) (Khatfov, Shcherbak, 2002). В этой популяции проведено несколько циклов позитивного отбора на высокую семенную продуктивность початка по признакам предпочтительной бивалентной конъюгации хромосом в мейоцитах в стадии диакинеза (рис. 1, 2), а также минимального различия между фактической и ожидаемой семенной продуктивностью (озерненностью) початка. Отбор проводили в направлении накопления высоких значений частоты бивалентной конъюгации хромосом в мейозе против квадринагентной с последующим переопылением выделенных отдельных генотипов растений и последующим размножением полученного гибридного потомства. После размножения проводили анализ на семенную продуктивность початка. Для этого подсчитывали число зерен в початке, которое обозначали как фактическую семенную продуктивность початка. Затем обрушенный стержень початка обжигали на газовой горелке и после удаления цветковых чешуй подсчитывали число семенных гнезд, заложенных на початке. Удвоенную сумму числа семенных гнезд принимали за ожидаемую (потенциальную) семенную продуктивность початка. Для последующего участия в очередном цикле отбора отбирали репродукцию семян с початков, показавших минимальное значение разности между ожидаемой и фактической семенной продуктивностью початка.

В следующем году цикл отбора повторялся и выделенные генотипы снова переопыляли. С каждым циклом отбора в селектируемой популяции наблюдался рост значения «диплоидизации» тетраплоидного генома и семенной продуктивности початка со смещением мультивалентных ассоциаций хромосом в мейоцитах от квадринагентных к бивалентным (Khatfov, Shcherbak, 2002). В конце 10 цикла отбора была создана популяция МРПП-20, которая и послужила исходным материалом для выделения линий тетраплоидной сахарной кукурузы (рис. 3). В процессе селекционного улучшения проводился отбор и по другим селекционно ценным признакам, как раннеспелость, многорядность, скорость влагоотдачи, склонность к многопочатковости, устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды.

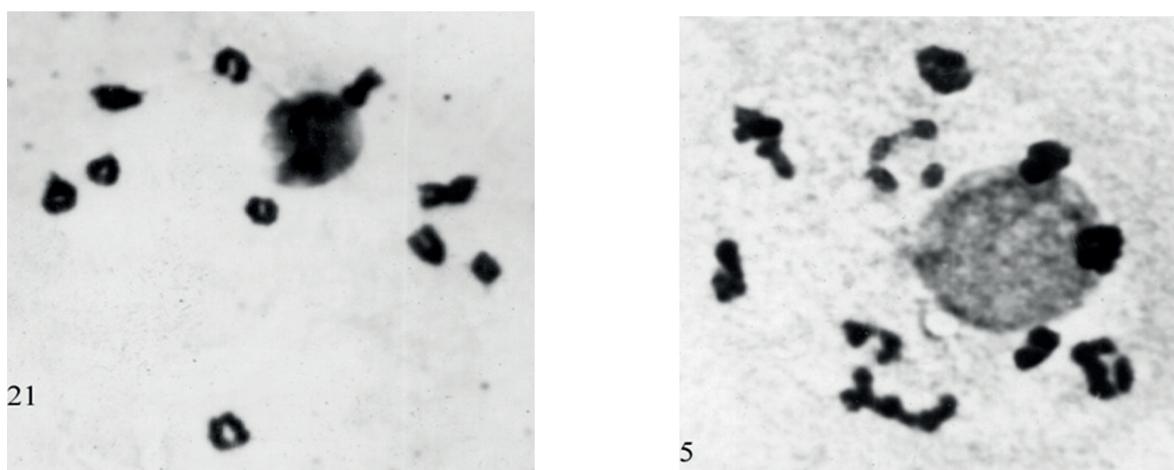


Рис. 1. Бивалентная конъюгация хромосом в мейозе диплоидной кукурузы (слева) и квадрилвалентная в мейозе тетраплоидной кукурузы, не прошедшей селекционный отбор

Fig. 1. Bivalent conjugation of chromosomes in the meiosis of diploid corn (left) and quadrivalent conjugation in the meiosis of non-selected tetraploid corn

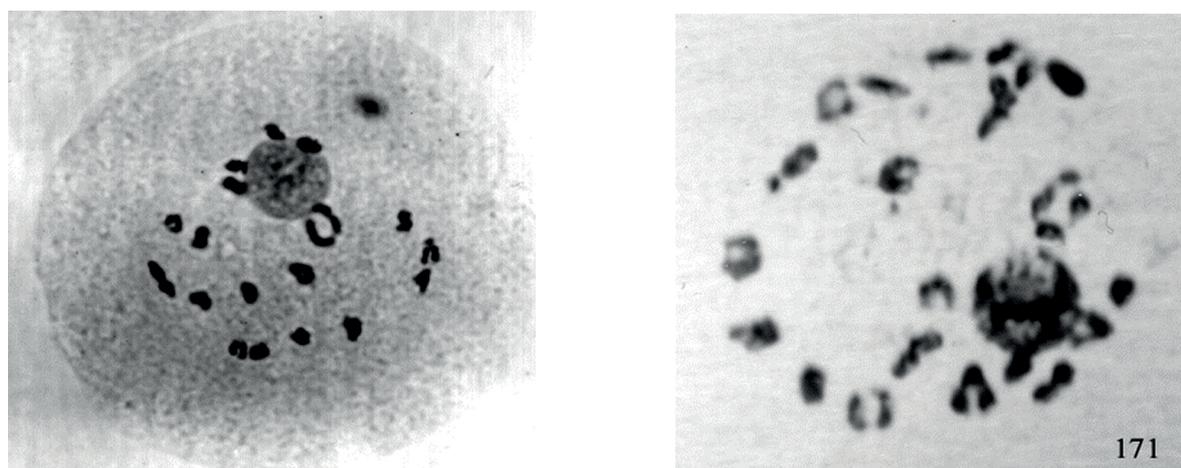


Рис. 2. Мейоциты тетраплоидной кукурузы с предпочтительной бивалентной конъюгацией хромосом, прошедшей селекционный отбор

Fig. 2. Meiocytes of tetraploid maize with preferred bivalent conjugation of chromosomes after selection

Включение в родословную популяции МРПП-20 сорта Кубанская сахарная способствовало высокой частоте обнаружения на початках отдельных зерновок с сахарным эндоспермом, предположительно гомозиготных по гену *su2* (*sugary endosperm*). Выделившийся материал был размножен и подвергнут многократному инцухту для повышения частоты гомозигот аллелей и в том числе гена *su2*, кодирующих один из основных фенотипических признаков сахарной кукурузы. На основе лучших линий тетраплоидной сахарной кукурузы, выделенных по признаку семенной продуктивности початка, методом полигибридных скрещиваний был создан сорт тетраплоидной сахарной кукурузы пищевого назначения Баксанская сахарная, который был внесен в Госреестр селекционных достижений РФ в 2011г. (рис. 4) (Khatefov, Shcherbak, 2012). Сорт тетраплоидной кукурузы Баксанская сахарная имеет ряд

преимуществ перед диплоидным стандартом за счет более крупного, многорядного початка с хорошей зерновой продуктивностью и более длинных и крупных зерновок на початке (табл. 1; рис. 4, 5).

В настоящее время в генетической коллекции тетраплоидной сахарной кукурузы ВИР насчитывается более 300 образцов, сочетающих с геном *su2* ряд других генов, кодирующих селекционно важные признаки.

Нами изучены эффекты аллелей гена *su2* в гомозиготном и гетерозиготном состояниях в эндосперме диплоидной (2n) сахарной кукурузы сорта Ника 353 и тетраплоидной сахарной кукурузы (4n) сорта Баксанская сахарная. Гетерозиготные сочетания доминантных и рецессивных аллелей гена *su2* были получены в результате гибридизации сахарной кукурузы с подвидом кремнистой кукурузы.

Таблица 1. Характеристика сорта тетраплоидной кукурузы Баксанская сахарная (2010, 2011 гг., НСР_{0,5} = 3,08 ц/га)

Table 1. Characteristics of tetraploid corn variety Baksanskaya Sakharnaya (2010, 2011 years, LSD_{0,5} = 3.08 c/ha)

| № | Признаки | Ника 353 (St) | Баксанская сахарная | Отклонения от стандарта |
|---|---|---------------|---------------------|-------------------------|
| 1 | Урожай початков молочной спелости, ц/га | 82,0 | 146,6 | +64,6 |
| 2 | Выход товарного зерна с початка, % | 64,0 | 85,5 | +21,5 |
| 3 | Содержание общих сахаров, мг/100г муки | 47,1 | 47,7 | +0,6 |
| 4 | Содержание протеина, % | 10,06 | 12,75 | +2,69 |
| 5 | Содержание масла, % | 4,55 | 2,9 | -1,65 |
| 6 | Число рядов зерен на початке | 12,7 | 22,4 | +9,7 |
| 7 | Число зерен в ряду на початке | 29,3 | 35,5 | +6,2 |
| 8 | Высота зерновки, мм | 7,0 | 11,0 | +0,4 |



Рис. 3. Початки исходной тетраплоидной популяции MRPP-20 до начала отбора (слева) и после отбора на повышенную озерненность (справа)

Fig. 3. Cobs of the initial tetraploid population of MRPP-20 before the beginning of the selection (left) and after the selection for increased fertility (right)

Результаты биохимического анализа зерновок гомозиготных и гетерозиготных генотипов тетраплоидной и диплоидной сахарной кукурузы показали, что содержание общих, водорастворимых и гидролизуемых сахаров не имеет существенных различий (табл. 2). Сравнение значений содержания общего сахара в гомозиготных по гену *su2* генотипах не выявило существенных различий между зерновками диплоидной и тетраплоидной сахарной кукурузы. Несмотря на увеличение числа аллелей *su2* в тетраплоидном эндосперме в два раза, содержание

общего сахара осталось на уровне значений диплоидного эндосперма. Введение доминантного аллеля *Su2* (♂) в гомозиготный по рецессивному аллелю *su2* (♀) генотип эндосперма способствует снижению содержания общих сахаров в зерновках как диплоидной, так и тетраплоидной кукурузы. В диплоидных зерновках кукурузы отклонения от значения стандарта по содержанию общих сахаров составляют $-8,2$ мг/100 г, а в тетраплоидных – только $-2,9$ мг/100 г.

Таблица 2. Содержание сахаров в эндосперме диплоидной и тетраплоидной кукурузы в зависимости от аллельного состояния гена *su2* (мг/100 г навески)
Table 2. Sugar content in the endosperm of diploid and tetraploid corn kernels depending on the allelic state of the *su2* gene (mg/100 g weighed weight)

| Варианты ♂ : ♀ | n | Содержание сахаров | | |
|---------------------------------|----|--------------------|-----------------|-------|
| | | Гидролизуемые | Водорастворимые | Общий |
| <i>su2:su2su2</i> (St) | 2n | 34,4 | 12,7 | 47,1 |
| <i>Su2:su2su2</i> | 2n | 36,7 | 2,2 | 38,9 |
| Отклонения от St | 2n | +2,3 | -10,5 | -8,2 |
| <i>su2su2:su2su2su2su2</i> (St) | 4n | 36,1 | 11,6 | 47,7 |
| <i>Su2Su2:su2su2su2su2</i> | 4n | 41,7 | 3,1 | 44,8 |
| Отклонения от St | 4n | +5,6 | 8,5 | -2,9 |
| HCP ₀₅ = | | | | 0,11 |



Рис. 4. Початки сорта тетраплоидной кукурузы Баксанская сахарная в фазе молочной (слева) и полной (справа) спелости

Fig. 4. Cobs of the tetraploid corn variety Baksanskaya Sakharnaya in the phase of milky (left) and full (right) ripeness

У тетраплоидных образцов кукурузы значения коэффициента вариации могут изменяться в более широких пределах, чем у диплоидных. Это вызвано тем, что у тетраплоидов в фенотипическом проявлении признака принимает участие большее число хромосом, чем у диплоидов. Но это не всегда приводит только к повышению или только к снижению значений фенотипических признаков, и в том числе, биохимических. В процессе селекции тетраплоидной сахарной кукурузы были выделены отдельные линии, которые значительно отличались от диплоидных

стандартов высокими и низкими значениями содержания белка, масла и крахмала в зерне. Следовательно, можно предположить, что наличие в геноме тетраплоидной кукурузы большего числа аллелей способствует изменчивости биохимического состава зерновки в более широких пределах. Анализ значений коэффициента вариации (CV) и их разности (CV_{4n} – CV_{2n}) у диплоидных и тетраплоидных генотипов по содержанию белка, крахмала и масла в зерновке подтверждает это предположение (табл. 3).

Проведенные исследования содержания сахаров в

гомозиготных и гетерозиготных по гену *su2* зерновках диплоидной и тетраплоидной кукурузы показали, что количественные значения могут изменяться в широких пределах либо оставаться неизменными в зависимости от состояния и числа аллелей. Кроме того, взаимодействия гена *su2* могут изменять значения содержания различных фракций сахаров в зависимости от соотношения доминантных и рецессивных аллелей в локусе как у диплоидных, так и у тетраплоидных генотипов кукурузы. Поэтому изучение новых сочетаний эндоспермовых мутаций

тетраплоидной кукурузы, влияющих на содержание белка и его аминокислотный состав, содержание крахмала и его различных фракций, содержание масла и его жирнокислотный состав, позволит не только получить новые знания о взаимодействиях этих генов, но и изменять в более широких пределах состав химических компонентов зерновки. Возможно, количественное содержание химических компонентов в зерне тетраплоидной кукурузы окажется выше в связи с большим размером зерновки и зародыша (рис. 5).



Рис. 5. Сравнение размера зерновки и зародыша сахарной кукурузы: (слева) тетраплоидной, (справа) диплоидной

Fig. 5. Comparison of kernel and germ size of tetraploid (left) and diploid (right) sweet corn

Таблица 3. Содержание белка, крахмала и масла в зерновке диплоидной и тетраплоидной кукурузы
Table 3. Protein, starch and oil content in the diploid and tetraploid corn kernel

| № | Варианты | n | Белок, % | Крахмал, % | Масло, % |
|----|-------------------------------------|---|----------|------------|----------|
| 1 | Ника 353 | 2 | 10,06 | 64,70 | 4,55 |
| 2 | Ранняя лакомка | 2 | 13,10 | 64,40 | 6,10 |
| 3 | Баксанская сахарная | 4 | 16,30 | 63,20 | 7,50 |
| 4 | Линия 1160-8 | 4 | 11,30 | 66,70 | 6,10 |
| 5 | Линия 1169-10 | 4 | 17,90 | 63,20 | 6,40 |
| 6 | Линия 1150-1 | 4 | 15,60 | 59,40 | 10,00 |
| 7 | Линия 1142-8 | 4 | 13,50 | 67,30 | 4,80 |
| 8 | Линия 1150-7 | 4 | 15,60 | 59,40 | 10,00 |
| 9 | Линия 1142-8 | 4 | 13,50 | 67,30 | 4,80 |
| 10 | CV, % | 2 | 11,60 | 0,23 | 12,70 |
| | | 4 | 18,40 | 8,50 | 26,00 |
| 11 | CV _{4n} – CV _{2n} | | +6,80 | +8,27 | +13,30 |
| 12 | HCP ₀₅ | | 0,11 | 0,31 | 0,20 |

Таблица 4. Содержание различных органических веществ в зерновках тетраплоидной кукурузы, гомозиготных по генам *su2* и *wx* (мг/100 г)

Table 4. The values of the content of various organic substances in the kernels of tetraploid corn homozygous for the *su2* and *wx* genes (mg/100 g)

| № | Сумма органических веществ | Номер образца ВИР | | Разность |
|----|----------------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| | | C1576 (<i>su2</i>) | C430 (<i>wx</i>) | C1576 – C430 |
| 1 | Органические кислоты | 61,76 | 29,74 | +32,02 |
| 2 | Многоатомные спирты | 60,35 | 40,70 | +19,65 |
| 3 | Свободные аминокислоты | 114,72 | 29,79 | +84,93 |
| 4 | Жирные кислоты | 867,85 | 440,64 | +427,21 |
| 5 | Пентозы | 5,77 | 4,23 | +1,54 |
| 6 | Гексозы | 515,73 | 329,87 | +185,86 |
| 7 | Моносахара | 1,23 | 4,11 | -2,88 |
| 8 | Дисахара | 20467,47 | 18671,54 | +1795,93 |
| 9 | Трисахариды | 1203,59 | 1645,10 | -441,51 |
| 10 | Фитостеролы | 120,10 | 243,89 | -123,79 |
| 11 | Моноацилглицеролы | 24,90 | 7,90 | +17,0 |

Метаболические процессы, происходящие при взаимодействии аллелей генов в генотипе тетраплоидного растения, несомненно, представляют научный интерес, поскольку оно является результатом совокупной реакции на воздействие окружающей среды в виде низкомолекулярных метаболитов. Следовательно, особенности течения и накопления различных биохимических веществ в клетке и тканях зерновки кукурузы могут служить дополнительным критерием фенотипической оценки различных генотипов кукурузы. Поэтому определение биохимических продуктов обмена веществ в клетке, ткани, органе стало эффективным инструментом анализа генофонда коллекций, в том числе для селекции (Smolikova et al., 2015; Shelenga et al., 2014).

Анализ значений разности сумм органических веществ между тетраплоидными генотипами сахарной (C1576) и восковидной (C430) кукурузы показывает высокий полиморфизм изменчивости по их содержанию, а также эффекты гена *su2* на процесс полимеризации сахаров в крахмал при созревании зерновки (табл. 4). Сравнение значений и их отклонений по суммам 11-ти органических веществ между образцами C1576 и C430 показало, что в исследованных линиях сахарной кукурузы выше содержание восьми (органические кислоты, многоатомные спирты, свободные аминокислоты, жирные кислоты, пентозы, гексозы, дисахара, моноа-

цилглицеролы) и ниже-трех веществ (моносахариды, трисахариды, фитостеролы), чем в образце восковидной кукурузы.

Различие говорит о более сложных процессах, чем обычное накопление сахаров в зерновке, у диплоидных и, особенно, тетраплоидных генотипов в результате аллельных и не аллельных взаимодействий генов. Сравнение накопления органических веществ в зерне тетраплоидных генотипов, гомозиготных по генам *su2* и *wx*, показывает зависимость биохимических процессов от этих мутаций, которые оказывают влияние на работу генов, регулируют процесс перехода сахаров в крахмал. Вероятно, в результате влияния эффекта гена *su2* в зерне сахарной кукурузы идет накопление не только сахаров, но и множества других биохимических компонентов, задействованных в процессе синтеза крахмала и не нашедших дальнейших биохимических трансформаций внутри клетки.

Заключение

Коллекция тетраплоидной сахарной кукурузы ВИР, созданная на основе высокопродуктивной тетраплоидной популяции МРПП-20, показала эффективность отбора зерновок с сахарным генотипом. Проведение отбора на предпочтительную бивалентную конъюгацию хромосом

в мейоцитах в исходной популяции МРПП-20 способствовало созданию высокоплодовитых, селекционно ценных линий тетраплоидной сахарной кукурузы. Лучшие линии составили генетическую основу сорта тетраплоидной сахарной кукурузы Баксанская сахарная, характеризующейся двухпочатковостью, высокой озерненностью початка, а также отличными вкусовыми и питательными свойствами за счет повышенного содержанием белка и масла в зерне. Анализ значений содержания общего сахара не выявило существенных различий между диплоидными и тетраплоидными генотипами, гомозиготными по гену *su2*. Несмотря на увеличение числа аллелей *su2* в два раза в эндосперме тетраплоидной зерновки, содержание общего сахара осталось на уровне значений диплоидного эндосперма. Введение доминантного аллеля *Su2* (δ) в генотип, гомозиготный по гену *su2* (ϕ), способствует снижению содержания общих сахаров в зерновках как у диплоидного, так и тетраплоидного генотипов. Исследования показали, что в зерновках диплоидных генотипов отклонения от значения стандарта по содержанию общих сахаров составляют $-8,2$ мг/100 г, а в тетраплоидных — только $-2,9$ мг/100 г, хотя общее соотношение доминантных и рецессивных аллелей (1АА: 2аа) сохраняется одинаковым у обоих генотипов. Тетраплоидная сахарная кукуруза в сравнении с диплоидной показала

большую вариабельность значений таких биохимических компонентов, как содержание в зерне белка ($CV = 6,80\%$), крахмала ($CV = 8,27\%$) и масла ($CV = 13,3\%$). При сравнении отклонений 11 значений сумм органических веществ между образцами сахарной тетраплоидной кукурузы С1576 и восковидной тетраплоидной кукурузы С-430 видно, что в исследованных генотипах сахарной кукурузы выше содержание восьми и ниже — трех органических веществ, что свидетельствует о сложном механизме эффекта гена *su2* на работу генов, контролирующих полимеризацию сахаров. Особенность тетраплоидной сахарной кукурузы по сравнению с диплоидной состоит в том, что в зерновках тетраплоидной кукурузы значения признаков и их изменчивость, в том числе и биохимического состава зерна, происходит в более широких пределах за счет участия большего числа генов и их комбинаций, чем у диплоидной. Накопление либо снижение определенных биохимических компонентов, участвующих в процессе полимеризации сахаров в крахмал, происходит за счет эффекта и большего числа генов *su2* в зерне тетраплоидной сахарной кукурузы. Поэтому селекция тетраплоидной сахарной кукурузы имеет существенные преимущества по ряду селекционно ценных признаков в сравнении с диплоидными аналогами.

References/Литература

- Balmer D, Flors V, Glauser G, Mauch-Mani B. (2013) Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. *Frontiers in Plant Science*; 4: 82. DOI: 10.3389/fpls.2013.00082
- Chumakov AE. (1974) The main methods of phytopathological research (Osnovnyye metody fitopatologicheskikh issledovaniy). Moscow. Kolos: 192 [in Russian] (Чумаков А. Е. Основные методы фитопатологических исследований. М.: Колос, 1974. 192 с.).
- Darlington CD. (1937) Recent advances in cytology. J&A Churchill LTD, London: 671 p.
- Dospekhov BA (1985) *Field experience (Metodika polevogo opyta)*. Moscow. Agropromizdat: 112–146. [in Russian] (Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. С. 112–146).
- Ermakov AI (1972) (Ed.) *Methods of biochemical studies of plants. (Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy)* Ed. 2nd, revised and enlarged — Izd. 2-ye, pererab. i dop. Leningrad: Kolos, 456 [in Russian] (Ермаков А. И. Методы биохимического исследования растений. Изд. 2-е, перераб. и доп. Ленинград: Колос. Ленингр. отд-ние, 1972. 456 с.).
- Galeyev GS, Kissel NI, Taova IA, Syritsa AK (1971) Selection of high-lysine corn (Seleksiya vysokolizinovoy kukuruzy). *Vestn. s.-kh. nauki—Bulletin of agricultural science*; 12: 59–64 [in Russian] (Галеев Г. С., Киссель Н. И., Таова А., Сирица А. К. Селекция высоколизиновой кукурузы // Вестн. с.-х. науки. 1971. Вып. 12. С. 59–64).
- Grigoriev ON (1948) Modern methods of studying the physicochemical properties of soils (Sovremennyye metody issledovaniya fiziko-khimicheskikh svoystv pochv) Ed. Academy of Sciences of the USSR — Izd. AN SSSR3: 185 [in Russian] (Григорьев О. Н. Современные методы исследования физико-химических свойств почв. Вып. 3. Изд. АН СССР. 1948. 185 с.).
- Gurev BP, Kozubenko AB (1976) The results of research on the creation of early ripe corn hybrids with improved grain quality (Rezultaty issledovaniy po sozdaniyu rannespelykh gibridov kukuruzy s uluchshennym kachestvom zerna). Collection of scientific papers — Sb. nauch. tr. KNIISKh, Krasnodar, issue II: 72–81 [in Russian] (Гурьев Б. П., Козубенко А. В. Результаты исследований по созданию раннеспелых гибридов кукурузы с улучшенным качеством зерна // Сб. науч. тр. КНИИСХ, Краснодар. Вып. 2. С. 72–81).
- Filev D. S., Tsikov V. S., Zolotov V. I. et al. (1980) Methodical guidelines for conducting field experiments with corn (Metodicheskiye rekomendatsii po provedeniyu polevykh opytov s kukuruzy). Dnepropetrovsk. All-Union Scientific Research Institute of Corn—Dnepropetrovsk VNII kukuruzy. 1980: 54 p. [in Russian] (Филев Д. С., Циков В. С., Золотов В. И. и др. Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой. Днепропетровск: ВНИИ кукурузы, 1980. 54 с.).
- Khadzhinov MI, Ryadchikov VG, Zima KI, Lebedev AB (1975) Issues of selection of high lysine corn. (Voprosy selektsii vysokolizinovoy kukuruzy). In: *Vegetable proteins and their biosynthesis — Rastitel'nyye belki i ikh biosintez*. Moscow. Nauka: 20–30 [in Russian] (Хаджинов М. И., Рядчиков В. Г., Зима К. И., Лебедев А. В. Вопросы селекции высоколизиновой кукурузы // В кн.: Растительные белки и их биосинтез. М.: Наука. 1975. С. 20–30).
- Khatefov EB, Appaev SP, Shomakhov BR (2018a) The breeding value of redloid lines isolated from tetraploid maize populations (Selektsionnaya tsennost' rediploidnykh liniy vydelennykh iz tetraploidnykh populyatsiy kukuruzy). *Corn and sorghum — Kukuruzha i sorgo*; 1: 27–35 [in Russian] (Хатефов Э. Б., Аппаев С. П., Шомахов Б. Р. Селекционная ценность редиплоидных линий выделенных из тетраплоидных популяций кукурузы // Кукуруза и сорго. 2018а. № 1. С. 27–35).
- Khatefov EB, Khachidogov AV, Kagermazov AM, Shomakhov BR, Kushkhova RS. (2018b) Creation and study of the breeding value of restored maize lines from tetraploid populations in the conditions of Kabardino-Balkaria (Sozdaniye i izucheniye selektsionnoy tsennosti vosstanovlennykh liniy kukuruzy iz tetraploidnykh populyatsiy v usloviyakh Kabardino-Balkarii). *Innovation and food security—Innovatsii i prodovol'stvennaya bezopasnost'*. Novosibirsk; 2(20): 104–116 [in Russian] (Хатефов Э. Б., Хачидогов А. В., Кагермазов А. М., Шомахов Б. Р., Кушхова Р. С. Создание и изучение селекционной ценности восстановленных линий кукурузы из тетраплоидных популяций в условиях Кабардино-Балкарии.

- Инновации и продовольственная безопасность. Новосибирск, 2018. № 2(20). С. 104–116).
- Khatfov EB, Shcherbak VS* (2012) The copyright certificate № 53859 Corn sugar variety "Baksan sugar" (patent number 6335 from 01.02.2012) (Avtorskoye svidetel'stvo № 53859 Kukuruzna sakharnaya sort «Baksanskaya sakharnaya») [in Russian] *Xatfov Э. Б., Щербак В. С.* Авторское свидетельство № 53859 Кукуруза сахарная сорт «Баксанская сахарная» (патент № 6335 от 01.02.2012).
- Khatfov EB, Shcherbak VS* (2002) Cytogenetic studies of tetraploid maize. (Tsitogeneticheskie issledovaniya tetraploidnoi kukuruzy). *Bulletin of KBSU — Vestnik KBGU. A series of biological sciences — Seriya biologicheskkiye nauki*; 5: 161–169 [in Russian] (*Xatfov Э. Б., Щербак В. С.* Цитогенетические исследования тетраплоидной кукурузы // Вестник КБГУ. Серия биологические науки. 2002. Вып. 5. С. 161–169).
- Kukekov VG* (1977) The wide unified classifier of the CMEA and the international classifier of the CMEA of the species *Zea mays* L. (Shirokiy unifikirovanny klassifikator SEV i mezhdunarodnyy klassifikator SEV vidov *Zea mays* L.). Leningrad. VIR1977: 82 p. [in Russian] (*Kukekov В. Г.* Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ видов *Zea mays* L. Л.: ВИР, 1977. 82 с.).
- Lebedev AB, Zima VG, Filipas TE* (1979) Amino acid and fractional composition of proteins of endosperm mutants and high-protein maize lines (Aminokislotoy i fraktsionnyy sostav belkov endospermovykh mutantov i vysokobelkovykh liniy kukuruzy). Collection of scientific works — Sbornik. nauchnykh trudov Krasnodar. KNIISKH; 19: 34–43 [in Russian] (*Лебедев А. В., Зима В. Г., Филипас Т. Е.* Аминокислотный и фракционный состав белков эндоспермовых мутантов и высокобелковых линий кукурузы // Сб. науч. тр. Краснодар: КНИИСХ, 1979. Вып. 19. С. 34–43).
- Miku VE* (1981) Genetic studies of corn (Geneticheskiye issledovaniya kukuruzy). *Chisinau. Shtiintsa*: 231 p. [in Russian] (*Муку В. Е.* Генетические исследования кукурузы. Кишинев: Штиинца, 1981. 231 с.).
- Palii AF* (1989) Genetic aspects of improving the quality of corn grain. (Geneticheskiye aspekty uluchsheniya kachestva zerna kukuruzy). *Chisinau: Shtiintsa*: 174 p. [in Russian] (*Палий А. Ф.* Генетические аспекты улучшения качества зерна кукурузы. Кишинев: Штиинца, 1989. 174 с.).
- Shmaraev GE, Matveeva GV* (1985) Methodical guidelines for studying and maintaining accessions of the corn collection (Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu i podderzhaniyu obraztsov kollektzii kukuruzy). Leningrad, VIR: 50 p. [in Russian] (*Шмараев Г. Е., Матвеева Г. В.* Методические указания по изучению и поддержанию образцов коллекции кукурузы. Л.: ВИР, 1985. 50 с.).
- Pausheva ZP* (1970) Workshop on cytology (Praktikum po tsitologii). Moscow. Kolos: 255 p. [in Russian] (*Паушева З. П.* Практикум по цитологии. М.: Колос, 1970. 255 с.).
- Pavlov NP* (1968) The accumulation of protein in the grain of wheat and corn. (Nakopleniye belka v zerne pshenitsy i kukuruzy). Moscow: 136 p. [in Russian] (*Павлов Н. П.* Накопление белка в зерне пшеницы и кукурузы. М., 1968. 136 с.).
- Shelenga TV, Solovyova AE, Shevard AL, Konarev AV* (2014) The study of the metabolom of crops of the VIR collection (Issledovaniye metaboloma kul'tur kollektzii VIR im. N. I. Vavilova.). Plant genetic resources are the basis of food security and improving the quality of life. Abstracts of the international scientific conference dedicated to the 120th anniversary of VIR— «Geneticheskiye resursy rasteniy — osnova prodovol'stvennoy bezopasnosti i povysheniya kachestva zhizni». Tezisy dokladov mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 120-letiyu VIR: 98 p. [in Russian] (*Шеленга Т. В., Соловьева А. Е., Шеварда А. Л., Конарев А. В.* Исследование метаболома культур коллекции ВИР им. Н. И. Вавилова // В кн.: Генетические ресурсы растений — основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни. Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 120-летию ВИР. СПб.: ВИР, 2014. С. 98).
- Shpaar D* (2008) Cereals (Cultivation, cleaning, refinement and use) (Zernovyye kul'tury (Vyrashchivaniye, uborka, dorabotka i ispol'zovaniye). Moscow. Publishing House LLC DLV AGRODELO. M.: ID OOO «DLV AGRODELO»: 656 p. [in Russian] (*Шпаар Д.* и др. Зерновые культуры (Выращивание, уборка, доработка и использование). М.: ИД ООО «DLV АГРОДЕЛО», 2008. 656 с.).
- Smolikova GN, Shavarda AL, Alekseychuk IV, Chantseva VV, Medvedev SS* (2015) Metabolomic approach to the assessment of varietal specificity of seeds of *Brassica napus* L. (Metabolomnyy podkhod k otsenke sortovoy spetsifichnosti semyan *Brassica napus* L.). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 19(1): 121–127 [in Russian] (*Смоликова Г. Н., Шаварда А. Л., Алексеичук И. В., Чанцева В. В., Медведев С. С.* Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19, № 1. С. 121–127).
- Sokolov BP et al.* (1975) Methodical guidelines for the production of hybrid and varietal seeds of corn (Metodicheskiye ukazaniya po proizvodstvu gibridnykh i sortovykh semyan kukuruzy). All-Union Scientific Research Institute of Corn–Vsesoyuz. nauch.-issled. in-t kukuruzy. Moscow, Selkhozgiz: 206 p. [in Russian] (*Методические указания по производству гибридных и сортовых семян кукурузы / соавт.: Б. П. Соколов и др.; ВНИИ кукурузы. М.: Сельхозгиз, 1975. 206 с.*).
- Sotchenko VS, Novoselov SN* (1995) Application of modified recurrent reciprocal selection in selection of sweet corn (Primeneniye modifikirovannogo rekurrentnogo retsiproknogo otbora v selektsii sakharnoy kukuruzy). *Corn and sorghum — Kukuruzna i sorgo*; 4: 2–5 [in Russian] (*Сотченко В. С., Новоселов С. Н.* Применение модифицированного рекуррентного реципрокного отбора в селекции сахарной кукурузы // Кукуруза и сорго. 1995. № 4. С. 2–5).
- Udovenko GV* (1988) Diagnostics of plant resistance to stress: a methodological guide (Diagnostika ustoychivosti rasteniy k stressovym vozdeystviyam: metodicheskoye rukovodstvo). L. VIR: 227 p. [in Russian] (*Удовенко Г. В.* Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям: методическое руководство. Л.: ВИР, 1988. 227 с.).
- Ugenheimer RU* (1979) Corn: improvement of varieties, seed production and use (Uluchsheniye sortov, proizvodstvo semyan, ispol'zovaniye). Moscow, Kolos: 519 p. [in Russian] (*Югенхеймер Р. У.* Кукуруза: Улучшение сортов, производство семян, использование. М.: Колос, 1979. 519 с.).
- Wilson CM, Alexander DE* (1967) Ribonuclease activity in normal an Opaque-2 mutant endosperm of maize. *Science*; 155(3769): 1575–1576. DOI: 10.1126/science.155.3769.1575
www.ab-centre.ru
http://alto-group.ru

ПОИСК ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К *GLOBODERA PALLIDA* И К PVX В КОЛЛЕКЦИИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Клименко Н. С.¹, Гавриленко Т. А.^{1,2}, Костина Л. И.¹,
Мамадбокирова Ф. Т.², Антонова О. Ю.^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР) 190000, Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42–44
e-mail: olgaant326@mail.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная 7–9

Большой ущерб картофелеводству наносят цистообразующие нематоды, к которым относятся два вида: *Globodera pallida* (Stone) Behrens – объект внешнего карантина и *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens – объект внутреннего карантина в Российской Федерации. Создание сортов картофеля, устойчивых к *G. rostochiensis* является одним из приоритетных направлений российской селекции уже несколько десятилетий, в то время как целенаправленный поиск источников устойчивости к *G. pallida* в нашей стране до последнего времени фактически не проводился, поскольку данный патоген в России не выявлен, хотя обнаружен в соседних странах. Возможности проведения отбора устойчивых к *G. pallida* генотипов с использованием традиционных фитопатологических методов предельно ограничены, поэтому информация о наличии в отечественном селекционном генофонде источников устойчивости к данному патогену имеет особое значение.

В статье представлены результаты молекулярного скрининга 160 сортов российской селекции и селекции стран ближнего зарубежья из коллекции ВИР на наличие аллель-специфичного маркера гена *Gpa2*, обеспечивающего устойчивость селекционных сортов картофеля к *G. pallida* (патотипам Pa2/Pa3). Показано, что среди 160 сортов выборки 19 имеют диагностический фрагмент маркера гена *Gpa2* – *Gpa2*–2. Выделенные в молекулярном скрининге 19 сортов одновременно содержали аллель-специфичные маркеры гена *Rx1*, контролирующего устойчивость к вирусу X картофеля (PVX).

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, селекционные сорта, маркер опосредованная селекция (MAS), ДНК-маркеры R-гены, *Globodera pallida*, вирус X картофеля

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Благодарности: Исследование выполнено в рамках темы НИР 0662-2019-0004.

Клименко Н. С., Гавриленко Т. А., Костина Л. И., Мамадбокирова Ф. Т., Антонова О. Ю. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к PVX в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров. Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 42-48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48

Klimenko N. S., Gavrilenko T. A., Kostina L. I., Mamadbokirova F. T., Antonova O. Yu. Search for resistance sources to *Globodera pallida* and potato virus X in the collection of potato varieties using molecular markers. Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 42-48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48

Клименко Н. С. orcid.org/0000-0002-5432-6466
Гавриленко Т. А. orcid.org/0000-0002-2605-6569
Костина Л. И. orcid.org/0000-0002-6413-9189
Мамадбокирова Ф. Т. orcid.org/0000-0002-7625-6892
Антонова О. Ю. orcid.org/0000-0001-8334-8069

SEARCH FOR RESISTANCE SOURCES TO *GLOBODERA PALLIDA* AND POTATO VIRUS X IN THE COLLECTION OF POTATO VARIETIES USING MOLECULAR MARKERS

Klimenko N. S.¹, Gavrilenko T. A.^{1,2}, Kostina L. I.¹,
Mamadbokirova F. T.², Antonova O. Yu.¹

¹ N. I. Vavilov All-Russian Institute, Plant Genetic Resources (VIR), Saint-Petersburg 190000, Russia
e-mail: olgaant326@mail.ru

² St. Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya Emb., St. Petersburg 199034, Russia

Great damage to potato production is caused by cyst nematodes, which include two species: *Globodera pallida* (Stone) Behrens, the object of external quarantine, and *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens, the object of internal quarantine in the Russian Federation. The breeding of varieties resistant to the *G. rostochiensis* has long been one of the priorities of Russian potato breeding, while a targeted search for sources of resistance to *G. pallida* in our country until recently was not actually carried out, since this pathogen was not detected in Russia, although it was traced in neighboring countries. The possibilities of selection of *G. pallida*-resistant genotypes using traditional phytopathological methods are extremely limited, so the information about the presence of markers of resistance genes to this pathogen in the domestic breeding gene pool is of particular importance.

Here we present the results of molecular screening of 160 varieties bred in Russia and in adjacent countries from the collection of VIR for the presence of markers of *Gpa2* gene, which provides resistance of potato varieties to *G. pallida* (Pa2/Pa3 pathotypes).

It is shown that among 160 varieties of the analyzed subset 19 have a diagnostic fragment of the allele-specific marker of the *Gpa2* gene – *Gpa2*–2. These 19 varieties isolated in molecular screening simultaneously contained allele-specific markers of the *Rx1* gene controlling resistance to potato virus X (PVX).

Keywords: *Solanum tuberosum*, potato varieties, MAS, DNA markers of R-genes, *Globodera pallida*, potato virus X

УДК: 635.21:631.523:631.527:632.6+631.467

Поступила в редакцию: 15.01.2019

Принята к публикации: 19.02.2019

Введение

Большой ущерб картофелеводству наносят цистообразующие нематоды, к которым относятся два вида: золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens и бледная картофельная нематода *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Вид *G. rostochiensis* имеет пять патотипов (Ro1 — Ro5), вид *G. pallida* имеет три патотипа (Pa1, Pa2/Pa3). Помимо значительных потерь урожая у восприимчивых сортов картофеля (до 50% согласно Trudgill, 1986), опасность распространения цистообразующих нематод связана с долговременной потерей зараженных территорий для возделывания картофеля, поскольку цисты могут сохранять жизнеспособность в почве до 20 лет (Evans, Stone, 1977).

G. rostochiensis и *G. pallida* широко распространены в странах Южной и Северной Америки, Азии, Африки и в странах западной Европы (EPPO, 2003, 2014; САВІ / EPPO, 2011, 2015). На территории Российской Федерации выявлен только один вид *G. rostochiensis* (и один его патотип — Ro1), который распространен очагами в 7 федеральных округах на территории общей площадью более полутора миллионов гектаров (Khiutti et al., 2017). Согласно Bradshaw et al. (2006) ген *HI* обеспечивает эффективную защиту сортов картофеля против патотипа Ro1 *G. rostochiensis* уже более 50 лет. Доминантный аллель гена *HI* широко распространен в зарубежных сортах и часто (30–60%) встречается в проанализированных российских сортах (Birjukova et al., 2008; Antonova et al., 2016; Klimenko et al., 2017). Создание сортов картофеля, устойчивых к золотистой картофельной нематоде является одним из приоритетных направлений отечественной селекции уже несколько десятилетий.

Второй вид цистообразующих нематод — *Globodera pallida* — является более агрессивным видом, так как способен поражать сорта картофеля устойчивые к *G. rostochiensis*, несущие доминантный аллель гена *HI* (Khiutti et al., 2017). Вид *G. pallida* в РФ пока не обнаружен (Limantseva et al., 2014; Khiutti et al., 2017). В то же время, существует большая опасность ухудшения фитосанитарной ситуации и появления в РФ бледной картофельной нематоды из-за регулярных поставок семенного картофеля из зарубежных стран, а также из-за обнаружения *G. pallida* в сопредельных с Россией государствах: Норвегии, Финляндии (Holgado, Magnusson, 2010; EPPO, 2014), и в Украине (Pylypenko et al., 2005). Поскольку бледная картофельная нематода является объектом внешнего карантина, целенаправленный поиск источников устойчивости к этому виду нематод в РФ до последнего времени фактически не проводился.

Использование маркер-ориентированной селекции позволяет выявлять источники устойчивости и проводить превентивную селекцию на устойчивость к объекту внешнего карантина — *G. pallida* — до момента появления патогена на территории России, а также проводить работы по пирамидированию *R*-генов устойчивости к разным видам нематод.

Ген *Gpa2* является основным (major) геном, контролирующим устойчивость селекционных сортов картофеля к бледной картофельной нематоде (патотипам Pa2/Pa3) (van der Voort et al., 1997; van der Vossen et al., 2000). *Gpa2* картирован на дистальном участке хромосомы XII, в составе небольшого кластера, включающего 4 гомологичные *RGH*-(*Resistance Gene Homologues*) последовательности, две из которых идентифицированы как гены *Gpa2* и *Rx1*, одна (*SH-RGH1*) — как ген устойчивости к неизвестному патогену, и еще одна является псевдогеном (Bendahmane et al., 1999; van der Vossen et al., 2000). В пределах этого кластера ген *Gpa2* расположен проксимально, а ген *Rx1* (детерминирующий устойчивость к вирусу X картофеля — PVX) — дистально по отношению к центромере. На основании ко-сегрегационного анализа расстояние между этими генами оценивается в 0,02 сМ (van der Vossen et al., 2000; van der Voort et al., 1999). Для скрининга на наличие доминантного аллеля гена *Gpa2* в разное время были разработаны несколько маркеров. CAPS-маркеры 77R/HaeIII (van der Voort et al., 1997) и GP34/TaqI (Milczarek et al., 2011), сцепленные с *Gpa2*, оказались недостаточно эффективны — совпадение результатов MAS анализа с данными фитопатологических тестов составило только 6,7% и 26,7% соответственно (Milczarek et al., 2011). Позднее были предложены внутригенные маркеры *Gpa2*-1 и *Gpa2*-2, которые в настоящее время преимущественно используются в MAS (Asano et al., 2012; Makhanko et al., 2014), в том числе российскими исследователями (Birjukova et al., 2015, 2016; Gavrilenko et al., 2018; Sajnakova et al., 2018).

Аналогично, для выявления доминантных аллелей гена *Rx1* первыми были разработаны многочисленные CAPS-маркеры (Bendahmane et al., 1997; Kanyuka et al., 1999). Из них наиболее часто в молекулярном скрининге применялся маркер CP60/DdeI_350 (Gebhardt et al., 2006), однако постепенно накапливалась информация о том, что этот маркер не способен дифференцировать разные гены устойчивости к PVX-*Rx1* (хромосома XII) и *Rx2* (хромосома V) (Ahmadvand et al., 2013).

Японскими исследователями (Mori et al., 2011) был разработан STS-маркер PVX_1230, сцепленный с геном *Rx1*. Этот маркер активно используется и в настоящее время (Birjukova et al., 2015, 2016; Sajnakova et al., 2018), но ряд авторов сообщает о его нестабильной амплификации и о наличии ложнопозитивных сигналов у восприимчивых сортов (Nie et al., 2017; Gavrilenko et al., 2018). На основе выравнивания последовательностей генов *Rx1* и *Rx2* были разработаны внутригенные маркеры 1Rx1 и 5Rx1, специфично детектирующие доминантные аллели гена *Rx1* (Ahmadvand et al., 2013). Эти маркеры эффективны при скрининге материала зарубежной селекции (Ahmadvand et al., 2013; Nie et al., 2017) и начинают использоваться российскими исследователями и селекционерами (Gavrilenko et al., 2018). Вирус X картофеля (PVX) распространен повсеместно и относится к экономически значимым патогенам картофеля.

Цель работы состояла в проведении молекулярного скрининга селекционных сортов картофеля из коллекции ВИР и идентификации генотипов с диагностическими фрагментами аллель-специфичных маркеров гена *Gpa2*, определяющего устойчивость к объекту внешнего карантина – бледной картофельной нематоды, а также маркеров гена *Rx1*, детерминирующего устойчивость к PVX. Следует отметить, что информация о распространении доминантного аллеля гена *Gpa2* в генофонде отечественных сортов ограничена, поскольку в известных нам работах указывались только MAS-позитивные сорта, а данные о MAS-негативных сортах не приводились (Makhanko et al., 2014; Birjukva et al., 2015, 2016).

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 160 отечественных селекционных сортов картофеля из коллекции ВИР, которые перечислены в разделе «Результаты». Сорта картофеля предварительно были верифицированы

куратором коллекции д-ром биол. наук Л. И. Костиной по комплексу морфологических характеристик. В качестве положительных контролей при проведении молекулярного скрининга использовали сорта, для которых в литературе было ранее показано присутствие диагностических фрагментов определенных маркеров — гена *Gpa2* для сорта Atlantic (Asano et al., 2012) и маркеров гена *Rx1* для сортов Cara и Sante (Ahmadvand et al., 2013).

Выделение ДНК. Для получения препаратов ДНК использовали листья растений из полевого генбанка ВИР. ДНК выделяли с использованием ранее модифицированного нами метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013); в случае сильного загрязнения препаратов полифенольными соединениями проводили дополнительную очистку при помощи поливинилпирролидона.

MAS. Молекулярный скрининг был проведен с использованием аллель-специфичных STS-маркеров *R*-генов, детерминирующих устойчивость к *G. pallida* (патотипы Pa2 и Pa3) и к PVX. Сведения об использованных маркерах и праймерах представлены в таблице 1.

Таблица 1. Используемые в работе маркеры *R*-генов устойчивости
Table 1. DNA markers of *R*-genes used in this study

| Ген | Хромосома | Маркер | T°m | Последовательности праймеров | Размер диагностического фрагмента (п. о.) | Литературный источник |
|--|-----------|--------|-----|--|---|------------------------|
| Устойчивость к <i>Globodera pallida</i> (патотипы Pa2 и Pa3) | | | | | | |
| <i>Gpa2</i> | XII | Gpa2-2 | 60 | F: GCACTTAGAGACTCATGCCA R: ACAGATTGTTGGCAGCGAAA | 452 | Asano et al. 2012 |
| Устойчивость к ХБК | | | | | | |
| <i>Rx1</i> | XII | PVX | 58 | RxSP-S3 (F): ATCTTGGTTTGAATACATGG RxSP-A2 (R): CACAATATTGGAAGGATTCA | 1230 | Mori et al., 2011 |
| | | 1Rx1 | 60 | F: GGAGAAATCCTGCAATATAAT R: CGACCGAACTTACATTTCCC | 974 | Ahmadvand et al., 2013 |
| | | 5Rx1 | 62 | F: TCAGGGCAAAACCCTAACAC R: ATCGGCCTAGAGTGACATCG | 186 | Ahmadvand et al., 2013 |

ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 40 нг ДНК картофеля, 1х реакционный буфер (Диалат, Москва), 2,5 мМ MgCl₂, по 0,5 мМ каждого из нуклеотидтрифосфатов (dNTP's), 200 нМ прямого и обратного праймеров, и 1 ед. *Taq*-полимеразы (фирма «Диалат», Москва, <http://dialat.ru/>). Условия ПЦР соответство-

вали предложенным разработчиками праймеров (табл. 1). ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и визуализировали в проходящем УФ свете. Все анализы проводили не менее чем в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Для идентификации носителей доминантного аллеля гена *Gpa2* устойчивости к бледной картофельной нематоде был проведен молекулярный скрининг 160 отечественных селекционных сортов картофеля с аллель-специфичным маркером *Gpa2-2*. Данные молекулярного скрининга анализируемой выборки представлены на рисунке 1 и в таблице 2. По результатам скрининга выборки были выделены 19 сортов (11,9%), генерирующих диагностический фрагмент размером 452 п. о. (рисунок 1 А). Из 160 проанализированных сортов, 154 были проанализированы впервые, а 6 сортов — Вектар, Живица, Одиссей (Makhanko et al., 2014), Дарковичский, Россиянка и Утенок (Birjukova et al., 2015) ранее уже участвовали в молекулярном скрининге с маркером *Gpa2-2*. Эти 6 сортов были MAS-положительными как по нашим данным, полученным при изучении образцов

коллекции ВИР, так и по данным указанных выше авторов, анализировавших сорта из коллекций институтов-оригинаторов.

Ранее большинство (144 из 160) изученных в данной работе сортов из коллекции ВИР было также протестировано нами на наличие маркеров генов устойчивости к другому виду цистообразующих нематод — золотистой картофельной нематоде *G. rostochiensis* (патотип Ro1) (Antonova et al., 2016; Klimenko et al., 2017). Сопоставление этих данных с результатами настоящей работы позволило выявить пять сортов (Бежицкий, Живица, Пранса, Пролисок, Россиянка) с маркерами генов устойчивости к обоим видам нематод — *G. pallida* и *G. rostochiensis* — объектам внешнего и внутреннего карантина соответственно. Маркерные профили сортов Живица и Россиянка совпадают с указанными ранее в литературных источниках (Makhanko et al., 2014, Birjukova et al., 2015).

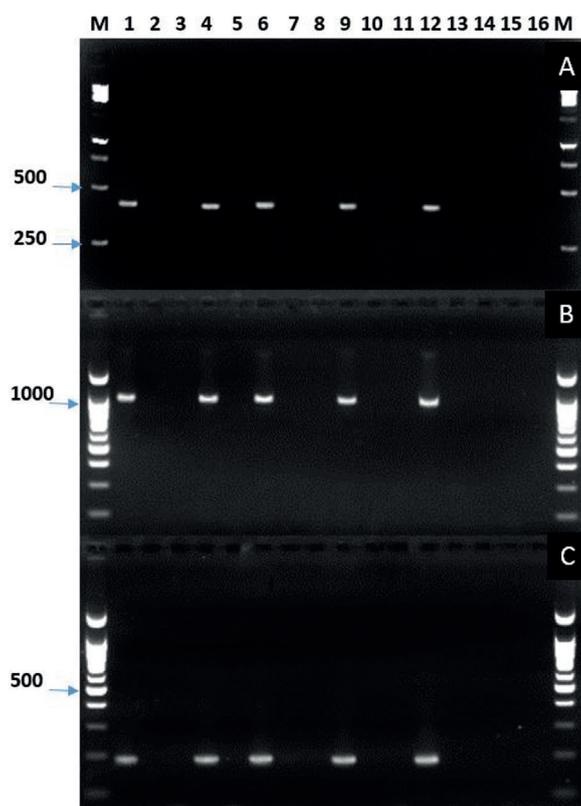


Рис. 1. Диагностические фрагменты маркеров гена *Gpa2* (А – маркер *Gpa2-2*) и гена *Rx1* (В – маркер 1Rx1, С – маркер 5Rx1) при ПЦР-анализе 16 сортов картофеля: 1 – Алиса, 2 – Антошка, 3 – Белоснежка, 4 – Приморский, 5 – Прикульский ранний, 6 – Рамзай, 7 – Прибрежный, 8 – Рассвет, 9 – Теща, 10 – Резерв, 11 – Северянин, 12 – Чайка, 13 – Фермер, 14 – Чая, 15 – Фокинский, 16 – Эффект. М – маркеры молекулярного веса (А – маркер «1 kb», В и С – маркер «100 bp+1500», оба маркера фирмы «СибЭнзим»)

Fig. 1. The diagnostic fragments of markers of genes *Gpa2* (A – marker *Gpa2-2*) and *Rx1* (B – marker 1Rx1, C – marker 5Rx1) detected in PCR analysis of 16 potato varieties: 1 – Alisa, 2 – Antoshka, 3 – Belosnezhka, 4 – Primorskij, 5 – Priekul'skij rannij, 6 – Ramzaj, 7 – Pribrezhnyj, 8 – Rassvet, 9 – Teshcha, 10 – Rezerv, 11 – Severyanin, 12 – Chajka, 13 – Fermer, 14 – Chaya, 15 – Fokinskij, 16 – Effekt. M – molecular weight markers (A – marker «1 kb», B and C – marker «100 bp+1500», both markers from SibEnzyme)

Та же самая выборка из 160 сортов была использована для молекулярного скрининга с тремя маркерами гена *Rx1* — PVX, 1Rx1 и 5Rx1. Ранее мы отмечали нестабильную амплификацию маркера PVX (Gavrilenko et al., 2018). В данном исследовании при использовании маркера PVX также периодически наблюдались регулярные несовпадения результатов разных повторностей у ряда образцов. Поэтому в дальнейшем мы опирались на результаты MAS с внутригенными маркерами 1Rx1 и 5Rx1 (рис. 1 В, С),

для которых все повторности совпадали. Все 160 сортов выборки были впервые проскринированы на наличие маркеров 1Rx1 и 5Rx1. Диагностические фрагменты обоих этих маркеров были выявлены у 19 сортов (11,9% выборки). Эти же сорта одновременно обладали и маркером *Gpa2-2* гена *Gpa2* (табл. 2), что, очевидно, объясняется тесным сцеплением генов *Gpa2* и *Rx1* (van der Vossen et al., 1999, 2000; van der Voort et al., 1999).

Таблица 2. Результаты молекулярного скрининга 160 сортов картофеля с использованием маркеров генов *Gpa2* и *Rx1*

Table 2. Results of molecular screening of 160 varieties with the markers of *Gpa2* and *Rx1* genes

| Ген | | | Название сорта |
|---------------|------------|------|--|
| <i>Gpa2</i> | <i>Rx1</i> | | |
| Маркер | | | |
| <i>Gpa2-2</i> | 1Rx1 | 5Rx1 | |
| 1 | 1 | 1 | <p><i>N=19</i></p> <ul style="list-style-type: none"> — Алиса, Бежицкий, Болвинский, Букет, Дарковичский, Победа, Пранса, Приморский, Рамзай, Россиянка, Теща, Утенок, Чайка, Юбилейный Осетии (RUS). — Вектар, Живица, Одиссей (BLR). — Бородянский розовый, Пролисок (UKR). |
| 0 | 0 | 0 | <p><i>N=141</i></p> <ul style="list-style-type: none"> — Аврора, Алена, Аметист, Амур, Антошка, Барин, Барон, Белоснежка, Белуха, Большевик, Брат-2, Бронницкий, Брянская новинка, Брянский деликатес, Брянский красный, Брянский надежный, Брянский ранний, Вармас, Веселовский 2–4, Ветеран, Виза, Волжский, Вятка, Горизонт, Горноуральский, Горянка, Губернатор, Диво, Донцовский, Дружный, Жаворонок, Загадка, Зауральский, Звездочка, Зольский, Имандра, Искра, Кабардинский, Калинка, Каменский, Камераз, Катюша (селекция ПСВИР), Кемеровский, Колпашевский, Корневский, Кормилец, Корона, Красавица, Красная горка, Красная заря, Красная роза, Красноуфимский, Кристалл, Кустаревский, Ладожский, Лазарь, Лакомка, Лекарь, Лидер, Лорх, Маугли, Москворецкий, Мурманский, Мусинский, Надежда, Нальчикский, Нарт 1, Нарымка, Наука, Никулинский, Огниво, Октябренок, Олимп, Парус, Погарский, Престиж, Прибрежный, Призер, Приобский, Рапсодия, Рассвет, Резерв, Ресурс, Русич, Рябинушка, Сапрыкинский, Свенский, Северянин, Сентябрь, Синева, Скороплодный, Смена, Сокольский, Солнышко, Томич, Успех, Фаленский, Фермер, Филатовский, Фокинский, Хибинский ранний, Чай, Шаман, Шурминский 2, Энергия, Эффект, Юбилей Жукова, Юпитер (RUS). — Альпинист, Архидея, Гарант, Гранат, Здабытак, Комсомолец-20, Лазурит, Ласунак, Лошицкий, Манифест, Нарочь, Пригожий 2, Росинка (Расінка), Синтез, Скарб, Темп, Явар (BLR). — Гарт, Зарево, Катюша (Украина), Луговской, Лыбидь, Незабудка, Нестеровский, Ромашка, Румянка, Русалка, Украинский розовый (UKR) — Варсна (LTU). — Лаймдота, Приекульский ранний (LVA). — Матс (EST). — Светлячок (MDA). |

В скобках указана страна происхождения сортов: RUS – Россия, BLR – Белоруссия, UKR – Украина, LTU – Литва, LVA – Латвия, MDA – Молдавия, EST – Эстония

Заключение

Результаты молекулярного скрининга с маркером гена *Gra2* позволяют идентифицировать потенциально устойчивые к *G. pallida* сорта картофеля и проводить в дальнейшем превентивную селекцию на устойчивость к данному объекту внешнего карантина. В данной работе среди 160 сортов выборки идентифицированы 19 (11,9%) сортов с диагностическим фрагментом аллель-специфичного маркера гена *Gra2* – *Gra2*–2.

С учетом полученных нами ранее данных молекулярного скрининга 33 сортов селекции ЛенНИИСХ «Белогорка» среди которых было выявлено пять с маркерами гена *Gra2* (Алый парус, Даная, Оредежский, Сиреневый туман, Чароит) (Gavrilenko et al., 2018), суммарно среди 193 отечественных сортов идентифицировано 24 (12,4%) потенциальных источников устойчивости к бледной картофельной нематоде. Отметим, что ряд MAS-позитивных сортов уже районированы в регионах РФ (<http://www.kartofel.org>), сопредельных со странами, в которых была

обнаружена бледная картофельная нематода. Так, сорта: Бородянский розовый, Живица, Одиссей, Чайка рекомендованы для выращивания в Северо-Западном регионе, граничащем с Финляндией, а сорта Бородянский розовый, Букет, Живица, Одиссей, Победа – в Центрально-Черноземном районе, граничащем с Украиной.

Все сорта с аллель-специфичным маркером *Gra2*–2 гена *Gra2* одновременно имели и аллель-специфичные маркеры 1Rx1 и 5Rx1 гена *Rx1*. Можно заключить, что отечественные селекционеры, создавая сорта, устойчивые к вирусу X картофеля, одновременно отбирали и потенциальные источники устойчивости к бледной картофельной нематоде.

Особый интерес для последующих селекционных работ, направленных на дальнейшее пирамидирование генов устойчивости к разным патогенам, представляют сорта, сочетающие маркеры генов устойчивости к обоим видам цистообразующих нематод *G. pallida*, *G. rostochiensis* и к вирусу X картофеля: Бежицкий, Живица, Пранса, Пролисок, Россиянка, а также Алый парус, Даная.

References/Литература

- Ahmadvand R, Wolf I, Gorji AM, Polgár Z, Taller J (2013) Development of molecular tools for distinguishing between the highly similar *Rx1* and *Rx2* PVX extreme resistance genes in tetraploid potato. *Potato Res*; 56(4): 277–291. DOI: 10.1007/s11540–013–9244-y
- Antonova OY, Shvachko NA, Novikova LY, Shuvalov OY, Kostina LI, Klimenko NS, Shuvalova AR, Gavrilenko TA (2016) Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 20(5): 596–606 [in Russian] (Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров *R*-генов устойчивости // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 5. С. 596–606). DOI: 10.18699/VJ16.181
- Asano K, Kobayashi A, Tsuda S, Nishinaka M, Tamiya S (2012) DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breed Sci*; 62(2): 142–150. DOI: 10.1270/jsbbs.62.142
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC (1997) High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet*; 95: 153–162. DOI: 10.1007/s001220050543
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*; 11: 781–791. DOI: 10.1105/tpc.11.5.781
- Biryukova VA, Zhuravlev AA, Abrosimova SB, Kostina LI, Hromova LM, Shmyglya IV, Morozova NN, Kirsanova SN (2008) Using of molecular markers of the *H1* and *Gro1* genes of *Globodera rostochiensis* resistance (Ispolzovanie molekulyarnykh markerov genov *H1* i *Gro1* ustojchivosti k zolotistoj kartofel'noj nematode). *Dokl. RASHN — Reports of the RAAS*; 6: 3–6 [in Russian] (Бирюкова В.А., Журавлев А.А., Абросимова С.Б., Костина Л.И., Хромова Л.М., Шмыгля И.В., Морозова Н.Н., Кирсанова С.Н. Использование молекулярных маркеров генов *H1* и *Gro1* устойчивости к золотистой картофельной нематоде // Доклады РАСХН. 2008. № 6. С. 3–6).
- Biryukova VA, Shmyglya IV, Abrosimova SB, Zapekina TI, Meleshin AA, Mityushkin AV, Manankov VV (2015) The search for sources of resistance genes to pathogens among the samples of plant breeding and genetics collections of All-Russian A. G. Lorch Research Institute of Potato Farming using molecular markers. *Zashhita kartofelya — Potato Protection*; 1: 3–7 [in Russian] (Бирюкова В.А., Шмыгля И.В., Абросимова С.Б., Запекина Т.И., Мелешин А.А., Митюшкин А.В., Мананков В.В. Поиск источников генов устойчивости к патогенам среди образцов селекционно-генетических коллекций ВНИИКХ с использованием молекулярных маркеров // Защита картофеля. 2015. № 5. С. 3–7).
- Biryukova VA, Shmyglya IV, Melyoshin AA, Mityushkin AV, Manankov VV, Abrosimova SB (2016) The study of genetic collections of the Lorch Potato Research Institute using molecular markers. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK — Achievements of Science and Technology of AIC*; 30(10): 22–26 [in Russian] (Бирюкова В.А., Шмыгля И.В., Мелешин А.А., Митюшкин А.В., Мананков В.В., Абросимова С.Б. Изучение генетических коллекций ВНИИ картофеля хозяйства с помощью молекулярных маркеров // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 10. С. 22–26).
- Bradshaw JE, Bryan GJ, Ramsay G. (2006) Genetic recourses (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Res*. 49: 49–65. DOI 10.1007/s11540–006–9002–5
- CABI/EPPO. *Globodera rostochiensis*. Distribution maps of plant diseases. 2011. <http://www.cabi.org>.
- CABI/EPPO. *Synchytrium endobioticum*. Distribution maps of plant diseases. 2015. <http://www.cabi.org>.
- EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. 2003. <https://www.eppo.int>.
- EPPO. Pest quarantine database. Paris, France. 2014. <http://www.eppo.int>.
- Evans K, Stone AR (1977) A Review of the Distribution and Biology of the Potato Cyst-Nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *International Journal of Pest Management*; 23(2): 178–189. DOI: 10.1080/09670877709412426
- Gavrilenko T, Antonova O, Shuvalova A, Krylova E, Alpatyeva N, Spooner D, Novikova L (2013) Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genet Resour Crop Evol*; 60(7): 1997–2015. DOI: 10.1007/s10722–013–9968–1
- Gavrilenko TA, Klimenko NS, Antonova OY, Lebedeva VA, Evdokimova ZZ, Gadjiyev NM, Apalikova OV, Alpatyeva NV, Kostina LI, Zoteyeva NM, Mamadbokirova FT, Egorova KV (2018) Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 22(1): 35–45 [in Russian] (Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Аналикова О.В., Алпатьева Н.В.,

- Костина Л. И., Зотеева Н. М., Мамадбокирова Ф. Т., Егорова К. В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 35–45. DOI: 10.18699/VJ18.329
- Gebhardt C, Bellin D, Henselewski H, Lehmann W, Schwarzfischer J, Valkonen JPT (2006) Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet*; 112(8): 1458–1464. DOI: 10.1007/s00122-006-0248-8
- Holgado R, Magnusson C (2010) Management of PCN (*Globodera* spp.) populations under Norwegian conditions. *Aspects of Applied Biology*; 103: 85–92.
- Kanyuka K, Bendahmane A, Rouppe van der Voort JNAM, Vossen EAG, Baulcombe DC (1999) Mapping of intra-locus duplications and introgressed DNA: Aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the *Rx* locus in tetraploid potato. *Theor Appl Genet*; 98(5): 679–689. DOI: 10.1007/s001220051121
- Khiutti AV, Antonova OY, Mironenko TA, Gavrilenko OS, Afanasenko OS (2017) Potato Resistance to Quarantine Diseases. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 7(8): 833–844 [in Russian] (Хютти А. В., Антонова О. Ю., Мироненко Н. В., Гавриленко Т. А., Афанасенко О. С. Устойчивость картофеля к карантинным болезням // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 1. С. 51–61). DOI: 10.18699/VJ17.223
- Klimenko NS, Antonova OY, Kostina LI, Mamadbokirova FT, Gavrilenko TA (2017) Marker-associated selection of Russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*; 178(4): 66–75 [in Russian] (Клименко Н. С., Антонова О. Ю., Костина Л. И., Мамадбокирова Ф. Т., Гавриленко Т. А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоды (патотип Ro1) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. Т. 178. № 4. С. 66–75). DOI: 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75
- Limantseva L, Mironenko N, Shuvalov O, Antonova O, Khiutti A, Novikova L, Afanasenko O, Spooner D, Gavrilenko T (2014) Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breeding*; 133(5): 660–665. DOI: 10.1111/pbr.12195
- Makhanko OV, Seliverstova AI, Drobot NI, Schurko KA, Yakovleva GA (2014) Detection of genes conferring resistance to nematodes in potato varieties using SCAR-markers (Detekcija genov ustojchivosti k cistoobrazujushhim nematodam v sortoobrazcah kartofelja s pomoshh'ju SCAR-markerov). *Zashhita kartofelya — Potato Protection*; 1: 17–18 [in Russian] (Маханько О. В., Силверстова А. И., Дробот Н. И., Щурко К. А., Яковлева Г. А. Детекция генов устойчивости к цистообразующим нематодам в сортообразцах картофеля с помощью SCAR-маркеров // Защита картофеля. 2014. № 1. С. 17–18).
- Milczarek D, Flis B, Przetakiewicz A (2011) Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am J Potato Res*; 88(3): 245–255. DOI: 10.1007/s12230-011-9189-0
- Mori K, Sakamoto Y, Mukojima N, Tamiya S, Nakao T, Ishii T, Hosaka R (2011) Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica*; 180(3): 347–355. DOI: 10.1007/s10681-011-0381-6
- Nie X, Dickison V, Brooks S, Nie B, Singh M, De Koeper D, Murphy A (2018). High resolution DNA melting assays for detection of *Rx1* and *Rx2* for high-throughput marker-assisted selection for extreme resistance to *Potato virus X* in tetraploid potato. *Plant Disease*; 102(2): 382–390. DOI: 10.1094/PDIS-07-17-0968-RE
- Ohbayashi K, Nakata N, Chaya M, Komura K (2010) Development of a detection method of resistance to potato disease and pest using DNA markers. 1. Detection methods of resistance to *potato virus X*, potato cyst nematode and late blight. *Bull Nagasaki Agri Fore Tech Dev Cen*; 1: 1–26.
- Pylypenko LA, Uehara T, Phillips MS, Sigareva DD, Blok VC (2005) Identification of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in the Ukraine by PCR. *European Journal of Plant Pathology*; 111(1): 39–46. DOI: 10.1007/s10658-004-2732-9
- Rouppe van der Voort J, Kanyuka K, van der Vossen E, Bendahmane A, Mooijman P, Klein-Lankhorst R, Stiekema W, Baulcombe D, Bakker J (1999) Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC1673 into cultivated potato. *Mol. Plant-Microbe Interact*; 12(3): 197–206. DOI: 10.1094/MPMI.1999.12.3.197
- Rouppe van der Voort J, Wolters P, Folkertsma R, Hutten R, van Zandvoort P, Vinke H, Kanyuka K, Bendahmane A, Jacobsen E, Janssen R, Bakker J (1997) Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*; 95(5–6): 874–880. DOI: 10.1007/s001220050638
- Sajnakova AB, Romanova MS, Krasnikov SN, Litvinchuk OV, Alekseev YA, Nikulin AV, Terent'eva EV (2018) Testing potato collection samples for the presence of genes for resistance to phytopathogens by means of DNA markers. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii — Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 22(1): 18–24 [in Russian] (Сайнакова А. Б., Романова М. С., Красников С. Н., Литвинчук О. В., Алексеев Я. И., Никулин А. В., Терентьева Е. В. Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 18–24. DOI: 10.18699/VJ18.326
- Trudgill DL (1986). Yield losses caused by potato cyst nematodes: a review of the current position in Britain and prospects for improvements. *Ann Appl Biol*; 108: 181–198. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1986.tb01979.x
- Van der Vossen EAG, van der Voort JR, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H., Baulcombe DC, Bakker J, Stiekema WJ, Klein-Lankhorst RM (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J*; 23(5): 567–576. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00814.x
- <http://www.dialat.ru>
<http://www.kartofel.org>

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РИСА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

Хлесткина Е. К.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42–44

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Россия, Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

RICE GENOME EDITING USING CRISPR/Cas SYSTEM

Khlestkina E. K.^{1,2}

¹ N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42–44, Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg, 190000, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10 Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Геномное редактирование при использовании системы CRISPR/Cas стало прорывной технологией в области генетики и селекции растений. Из всех возделываемых культур наиболее масштабное применение этой новой технологии наблюдается на рисе. В первую очередь данный факт объясняется не только значимостью культуры, но и относительно высокой эффективностью применения к ней методов генетической трансформации. Хотя конечным результатом геномного редактирования является получение нетрансгенного растения с заданной мутацией (мутациями), неотъемлемым этапом процесса создания такой новой мутантной формы служит применение комплекса методов генетической инженерии. На сегодняшний день система CRISPR/Cas апробирована на десятках генов-мишеней риса, из которых мутации более чем в 30 генах привели к желаемому улучшению селекционно значимых свойств. Остальные эксперименты связаны, главным образом, с проверкой функций генов, и относятся к области обратной генетики. Улучшение или приобретение новых свойств обусловлено внесением направленных мутаций в гены, влияющие на продуктивность, аромат зерна и его химический состав, сроки цветения, устойчивость к факторам биотического и абиотического стресса и гербицидам, а также контроль за опылением, используемый в гибридной селекции. Эти достижения рассматриваются в настоящем обзоре. Важно отметить, что в работы по улучшению сортов риса вовлечены уже около полсотни различных генотипов. Это создает предпосылки для широкого практического применения технологий геномного редактирования в программах по селекции риса.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, геномное редактирование, гены-мишени, индуцированная мужская стерильность, качество зерна, направленный мутагенез, урожайность, устойчивость к болезням, устойчивость к гербицидам

Genome editing using the CRISPR/Cas system is a breakthrough technology in plant genetics and breeding. The most large-scale application of this new technology on crop species is observed for rice. This fact is explained not only by the significance of this crop, but also by the relatively high transformation amenability. Although the end result of genome editing is a non-transgenic plant with desired mutation (mutations), an unavoidable step in the process of creating such a new mutant is the use of genetic engineering methods. To date, the CRISPR/Cas system has been tested on dozens of rice target genes, of which mutations in more than 30 genes have led to the desired improvement of economically important traits. The remaining experiments are related mainly to the verification of the genes' functions, and belong to the field of reverse genetics. Improvement or acquisition of new properties is associated with mutations in the genes that affect productivity, grain fragrance and chemical composition, flowering time, the resistance to biotic and abiotic stress factors, and herbicides, as well as pollination control needed in hybrid breeding. These achievements are reviewed in the current article. It is important to note that about fifty different genotypes are already involved in improving rice varieties with the help of genome editing. This creates the prerequisites for a wide practical application of genome editing technologies in rice breeding programs.

Keywords: CRISPR/Cas, genome editing, disease resistance, grain quality, herbicide resistance, induced male sterility, target genes, targeted mutagenesis

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Хлесткина Е. К.

Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR/Cas. Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 49-54.
DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54

Khlestkina E. K.

Rice genome editing using CRISPR/Cas system. Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 49-54.
DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54;

Хлесткина Е. К. orcid.org/0000-0002-8470-8254

УДК: 575.2+577.21+608.1:633

Поступила в редакцию: 30.11.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Рис относится к трем основным продовольственным культурам, являясь вместе с тем одним из основных модельных объектов в современной биологии растений из-за относительно небольшого размера генома и эффективности применения на нем методов биотехнологии, в частности генетической трансформации и культивирования *in vitro*. Геном риса был секвенирован в 2002 году первым среди геномов культурных растений (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002). Расшифровка большого числа генов, установление их функции при помощи методов прямой и обратной генетики привели к тому, что сегодня информация о генах и геноме риса используется как эталонная для проведения анало-

гичных исследований на других видах растений, в первую очередь представителях однодольных. Вместе с тем, богатые знания о генах самого риса своевременно обеспечили исследователей широким перечнем генов-мишеней для направленного мутагенеза. Потому с появлением прорывного метода, а именно технологии геномного редактирования на основе системы CRISPR/Cas, и с тех пор как эту технологию впервые применили на растениях в 2013 году (Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie, Yang, 2013) наибольший прогресс в ее практическом использовании достигнут именно на рисе (рисунок).

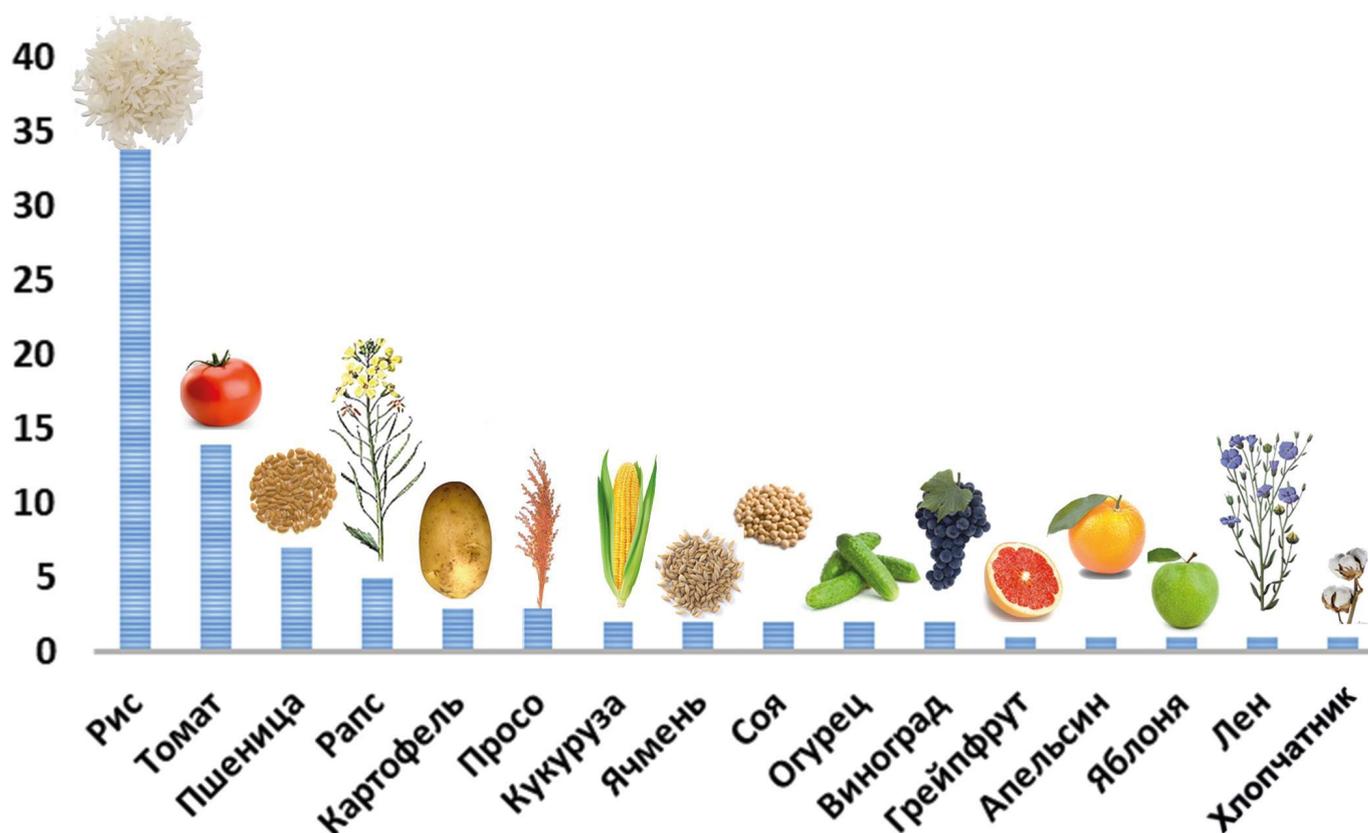


Рисунок. Количество генов, модифицированных при помощи системы геномного редактирования CRISPR/Cas с целью улучшения свойств сельскохозяйственных видов растений, за 5 лет с момента первого применения данной технологии на растениях (модифицировано по Korotkova et al., 2019).

Figure. The number of genes modified using the CRISPR/Cas genome editing system to improve the properties of crop species for 5 years since the first application of this technology to plants (modified according to Korotkova et al., 2019).

С помощью специальной направляющей РНК (нРНК) нуклеаза Cas, составляющая основу данной системы редактирования, находит ген-мишень в геноме растения и вносит целевые изменения в его структуру. Таким образом можно произвести нокаут гена, замену одного или нескольких нуклеотидов, вставку или делецию (Kolchanov et al., 2017). За 5 лет количество генов, модифицированных с помощью

системы CRISPR/Cas с целью улучшения свойств сельскохозяйственных растений, составило 81. Эти работы проведены на 16 культурах, из них у риса модифицировано больше всего генов — 34 и вовлечено больше всего генотипов — 45 в отличие от других культур, у которых большинство генотипов с трудом поддаются генетической трансформации (Korotkova et al., 2018). Следует отметить, что во многих из

представленных в настоящее время работ по модификации генов сельскохозяйственных растений продемонстрирована возможность получения нетрансгенных модифицированных растений, свободных от служебных конструкций. Это достигается в большинстве случаев за счет независимого наследования модифицированных локусов и локусов со встроенной служебной конструкцией. Такие растения можно отобрать уже в первом поколении (Zhou et al., 2016).

Одно из важных преимуществ системы CRISPR/Cas состоит в возможности одновременного внесения нескольких мутаций в выбранные участки генома («мультиплексное» редактирование). Таким способом можно скомбинировать в одном генотипе лучшие варианты генов, которые в природном и селекционном материале «разбросаны» по разным генотипам, причем осуществить это комбинирование не путем долгих скрещиваний, а с помощью быстрого редактирования генома (Kolchanov et al., 2017).

Среди рассматриваемых ниже примеров будет продемонстрировано мультиплексное редактирование генов, контролируемых как разные признаки, так и один и тот же признак. В последнем случае данная технология использовалась для усиления эффекта проявления количественного признака.

Качество и химический состав зерна

CRISPR/Cas-направленный нокаут генов перспективен для улучшения и различных свойств зерна. Например, нокаут гена *Waxy*, кодирующего гранул-связанную крахмалсинтазу (GBSS) позволил получить рис с низким содержанием амилозы (Zhang et al., 2018). В зависимости от содержания амилозы коммерческие сорта риса подразделяются на 5 групп: рис «waxy», иначе называемый глютинозным рисом (0–5%), рис с очень низким (5–12%), низким (12–20%), средним (20–25%) и высоким (25–33%) содержанием амилозы. При варке зёрна глютинозных сортов риса «склеиваются» друг с другом, что требуется для приготовления определенных блюд в азиатской кухне. Такой рис чаще используется для сладких блюд, так как при снижении количества линейных молекул крахмала (амилозы), увеличивается доля разветвленных молекул амилопектина, который легче расщепляется в пищеварительном тракте до простых сахаров и быстрее усваивается организмом. Напротив, увеличение содержания амилозы может иметь свои преимущества для диетического питания при диабете и ожирении. Переключение синтеза крахмала в сторону амилопектина связано с ферментом SBE (starch branching enzyme). Нокаут одного из генов *SBE* (*SBEIIb*) при помощи системы CRISPR/Cas привел к увеличению содержания амилозы у сорта Kitaake на 10% (повышению с 15% до 25%), тогда как нокаут другого гена (*SBEI*) не вызвал изменений (Sun et al., 2017).

Нокаут гена *FAD2-1*, кодирующего десатуразу жирных кислот, привел к увеличению содержания в зерне устойчивой к окислению олеиновой кислоты и отсутствию менее

стабильной линолевой кислоты (Abe et al., 2018).

Ярко выраженный аромат индийского риса Басмати и тайского риса Жасмин обусловлен присутствием в зерне 2-ацетил-1-пирролина. Его накопление связано с мутацией гена *BADH2* (*BAD2*), расположенного в хромосоме 8 и кодирующего бетаинальдегиддегидрогеназу. Формы со случайными мутациями гена *BADH2*, приведшими к утрате его функциональности, были отобраны в процессе селекции риса. С появлением технологий направленного мутагенеза стало возможным целенаправленно проводить нокаут гена *BADH2* для придания аромата зерну любого выбранного сорта. Так, с использованием системы CRISPR/Cas был произведен нокаут данного гена в сортах Xidao (Lu et al., 2017) и Nipponbare (Shen et al., 2017a). Эффективность мутагенеза составила 70 и 81% соответственно. Отметим, что в работе на сорте Nipponbare было применено мультиплексное редактирование, нацеленное не только на придание аромата, но и на улучшение продуктивности и укорочение вегетационного периода – для этого были одновременно отредактированы 7 генов (Shen et al., 2017a). При нацеливании на ген *BADH2* важно учитывать его сходство с расположенным в хромосоме 4 геном *BADH1*, связанным со стрессоустойчивостью растений риса, и конструировать направляющую РНК с учетом специфических различий между генами *BADH1* и *BADH2*, так чтобы использование системы редактирования приводило к нокауту гена *BADH2*, не затрагивая *BADH1*.

С помощью геномного редактирования, как было показано, можно контролировать содержание вредных веществ в зерне риса. Так, CRISPR/Cas-направленный нокаут генов *LCT1* и *Nramp5*, кодирующих транспортные белки, осуществляющие доставку в зерно поглощаемых из почвы ионов кадмия, позволил существенно снизить содержание ионов этого тяжелого металла в зерне риса (Lu et al., 2017, Tang et al., 2017).

Продуктивность и скороспелость

Удобными генами-мишенями, нокаут которых приводит к улучшению хозяйственно ценных признаков, являются негативные регуляторы роста, отрицательно влияющие на растяжение и деление клеток. Потеря функциональности этих генов приводит к увеличению продуктивности.

Например, у риса были одновременно нокаутированы три гена (*GW2*, *GW5*, *TGW6* – по отдельности и в разных комбинациях), негативно влияющих на длину зерна. Было показано увеличение зерна пропорционально числу нокаутированных генов (Xu et al., 2016).

С использованием системы CRISPR/Cas проводился нокаут четырех генов, разных по своим функциям, но потенциально так или иначе связанных с продуктивностью (Li et al., 2016a). Среди генов-мишеней были: негативный регулятор озерненности *Gn1a*; ген *DEP1*, нокаут которого связан с низкорослостью и формированием плотной прямостоячей метелки (последнее изменение также может

быть осуществлено путем нокаута гена *EP3*, Shen et al., 2017a); негативный регулятор размера зерна *GS3*; регулятор архитектуры растения *IPA1* (нокаут по нему должен приводить к снижению интенсивности кущения, уменьшению числа непродуктивных побегов, повышенной озерненности, утолщению и прочности стеблей). В дальнейшем у семи сортов риса были получены нокаутные генотипы по *GS3*, а также двойные нокауты *Gn1a + GS3*. Повышенная продуктивность (на 3–7%) была отмечена, однако, не у всех мутантов. У некоторых помимо ожидаемых изменений наблюдалось уменьшение числа продуктивных побегов, поэтому взамен ожидаемого повышения продуктивности происходило ее снижение (Shen et al., 2018).

Более быстрого роста и повышения урожайности риса Nirponbare удалось достичь путем мультиплексного редактирования (нокаута) генов *PYL1*, *PYL4* и *PYL6*, кодирующих PYR1-подобные регуляторные компоненты рецептора абсцизовой кислоты (Miao et al., 2018).

Низкорослость может быть достигнута при помощи направленного мутагенеза не только путем нокаута упомянутого выше гена *DEP1*, но и за счет замены одной аминокислоты в продукте гена *SLR1* — репрессоре ответа на гиббереллин (Lu, Zhu, 2017). Если для нокаута достаточно, чтобы РНК-направляемая нуклеаза Cas внесла двуцепочечный разрыв в заданном участке гена, а репарация разрыва (за счет функционирования естественных клеточных механизмов) привела к отсутствию гомологичной матрицы к inserции/делции 1–2 пар оснований, то для направленной замены отдельной пары оснований или целого участка гена требуется, чтобы при редактировании в клетке присутствовала матрица несущая новый вариант между участками ДНК, гомологичными последовательностям генома, фланкирующим разрыв. В этом случае также вступает в действие естественный клеточный механизм — происходит репарация двуниевых разрывов ДНК, сопровождаемая гомологичной рекомбинацией. Благодаря этому в заданный участок генома встраивается нужный вариант нуклеотидной последовательности или происходит замена одного аллельного варианта другим (в последнем случае производят два разрыва для удаления ненужного аллельного варианта и встраивания на его место другого). Заменяться может не вся последовательность гена, а лишь та его часть, по которой отличаются аллельные варианты, вплоть до замены одного нуклеотида. Например, произведенная однонуклеотидная замена в гене *NRT1.1B* позволила повысить эффективность усвоения азота (Li et al., 2018).

Нокаут факторов (*Hd2*, *Hd4*, *Hd5*), негативно влияющих на переход от вегетативной фазы к генеративной за счет супрессии гена *Ehd1* (*Early heading date 1*), позволил получить на основе нескольких сортов риса мутанты, отличающиеся очень ранними сроками цветения (Li et al., 2017). Более ранних сроков цветения в условиях длинного дня можно также достичь путем нокаута гена *Hd1*, контролирующего позднее цветение при длинном дне (Shen et al., 2017a).

Устойчивость к факторам биотического и абиотического стресса и к гербицидам

Как показал ряд работ, одна из перспективных областей применения CRISPR/Cas-направленного нокаута генов — повышение устойчивости растений к патогенам и вредителям за счет целенаправленного повреждения генов, обуславливающих чувствительность к заболеваниям. Например, нокаут гена *ERF922* риса позволил получить формы, устойчивые к пирикулярриозу (Wang et al., 2016).

Модификация генов, участвующих в ответе на повреждение клеток растений токсичными соединениями и на эффективность поглощения их из почвы, позволяет повысить устойчивость растений и редуцировать в них накопление вредных веществ. Так, нокаут гена *ARM1*, кодирующего транскрипционный фактор MYB R2R3-типа, который участвует в развитии ответа на стресс, вызываемый соединениями мышьяка, повысил устойчивость растений риса к этим токсическим веществам (Wang et al., 2017). Нокаут гена *HAK1*, кодирующего белок-транспортер ионов калия, позволил существенно уменьшить поглощение растением ионов цезия (Nieves-Cordones et al., 2017).

Модифицированные растения риса, устойчивые к гербициду хлорсульфону, удалось получить с помощью замены «чувствительного» аллеля гена *ALS* на «устойчивый» с использованием нуклеазы Cas двумя различными путями: (1) за счет внесения двуцепочечного разрыва с последующей гомологичной рекомбинацией (Sun et al., 2016) и (2) путем использования неактивного РНК-направляемого белка Cas, соединенного с цитидиндезаминазой (Shimatani et al., 2017, 2018). Первый способ был также использован для модификации гена *EPSPS* с целью повышения устойчивости риса к гербициду глифосату (Li et al., 2016b).

Гибридная селекция

Успешный пример CRISPR/Cas-направленного нокаута — получение форм с контролируемой мужской стерильностью для дальнейшего использования в гибридной селекции. В первом случае этого удалось достичь за счет нокаута гена *TMS5*, кодирующего негативный регулятор термочувствительной генной мужской стерильности (Zhou et al., 2016). Полученные нетрансгенные модифицированные формы фертильны при оптимальной для развития растений температуре, но полностью стерильны при ее повышении до 28 °С. Это позволяет препятствовать самоопылению растений данных линий при получении гибридов за счет осуществления данного этапа селекции в теплицах с повышенной в нужный момент температурой (при этом растения с мужской стерильностью опыляются пыльцой растений другой родительской линии и завязываются семена будущих гибридов F₁). Когда полученные таким образом гибриды используются далее в производственных посевах, выращен-

ные из них в оптимальных условиях растения фертильны и завязывают полноценные семена. Идея воздействовать на регулятор термочувствительной генной мужской стерильности риса возникла и ранее, однако попытки сделать это с помощью сайленсинга гена *TMS5* не давали стабильного результата, и только использование системы CRISPR/Cas позволило решить данную проблему (Zhou et al., 2016).

В другой работе были получены нетрансгенные линии риса, нокаутные по гену *CSA* – негативному регулятору фотопериодчувствительной генной мужской стерильности. Стерильность пыльцы достигается при выращивании в условиях короткого дня, тогда как в условиях длинного дня растения фертильны (Li et al., 2016c). Таким образом, при организации процесса семеноводства в естественных или искусственно созданных условиях короткого дня можно получать семена, реализуемые в дальнейшем для производства гибридов в географических зонах, отличающихся длинным фотопериодом.

Эти способы являются изящным решением проблемы контроля опыления в гибридной селекции и вместе с тем служат экологически безопасной альтернативой так называемой химической кастрации, используемой в настоящее время на тех культурах, для которых в силу биологических особенностей так и не удалось создать систему контроля на основе ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности).

Другая проблема на пути использования гетерозиса – гибридная несовместимость, проявляющейся в виде мужской стерильности у полученных гибридов между растениями риса разных подвидов (*indica* и *japonica*). Нокаут генов *Sc-j* (Shen et al., 2017b), *SaF* и *SaM* (Xie et al., 2017), контролирующих этот признак у риса, позволил преодолеть стерильность гибридов.

Заключение

Таким образом, за пять лет применения системы CRISPR/Cas на рисе удалось получить широкий спектр модифицированных генотипов, в которых направленные мутации, внесенные в гены-мишени, привели к улучшению широкого спектра хозяйственно ценных признаков, связанных с продуктивностью, качеством и химическим составом зерна, скороспелостью, устойчивостью к факторам биотического и абиотического стресса и гербицидам. Кроме того, применение данной технологии оказалось перспективным для использования в гибридной селекции для контроля опыления и преодоления гибридной несовместимости. Среди культур, на которых апробирована система CRISPR/Cas, именно на рисе достигнуты наиболее прорывные результаты, модифицировано больше всего генов с использованием уже около полусотни различных генотипов, что создает предпосылки для практического применения технологий геномного редактирования в программах по селекции риса.

References/Литература

- Abe K, Araki E, Suzuki Y, Toki S, Saika H (2018) Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiology and Biochemistry*; 131: 58–62. DOI: 10.1016/J.PLAPHY.2018.04.033
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*; 296(5565): 92–100. DOI: 10.1126/science.1068275
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu JK (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 111: 4632–4637. DOI: 10.1073/pnas.1400822111
- Kolchanov NA, Kochetov AV, Salina EA, Pershina LA, Khlestkina EK, Shumny VK (2017) Status and prospects of marker-assisted and genomic plant breeding. *Herald of the Russian Academy of Sciences*; 87(2): 125–131. DOI: 10.1134/S1019331617020113
- Korotkova AM, Gerasimova SV, Khlestkina EK Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2019;23(1): 29–37. DOI 10.18699/VJ19.458
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*; 31: 688–691. DOI:10.1038/nbt.2654
- Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H (2016a) Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*; 7: 377. DOI: 10.3389/fpls.2016.00377
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C (2016b) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. *Nat. Plant.*; 2: 16139. DOI 10.1038/nplants.2016.139
- Li Q, Zhang D, Chen M, Liang W, Wei J, Qi Y, Yuan Z (2016) Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. *Journal of Genetics and Genomics*; 43: 415–419. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.04.011
- Li X, Zhou W, Ren Y, Tian X, Lv T, Wang Z, Fang J, Chu C, Yang J, Bu Q (2017) High-efficiency breeding of early-maturing rice cultivars via CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Journal of Genetics and Genomics*; 44(3): 175–178. DOI: 10.1016/J.JGG.2017.02.001
- Li J, Zhang X, Sun Y, Zhang J, Du W, Guo X, Li X, Zhao Y, Xia L (2018) Efficient allelic replacement in rice by gene editing: a case study of the *NRT1.1B* gene. *Journal of Integrative Plant Biology*; 60(7): 536–540. DOI: 10.1111/jipb.12650
- Lu H, Liu S, Xu S, Chen W, Zhou X, Tan Y, Huang J, Shu Q (2017) CRISPR-S: an active interference element for a rapid and inexpensive selection of genome-edited, transgene-free rice plants. *Plant Biotechnology Journal*; 15(11): 1371–1373. DOI:10.1016/j.molp.2016.11.013
- Lu Y, Zhu J-K (2017) Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*; 10: 523–525.
- Miao C, Xiao L, Hua K, Zou C, Zhao Y, Bressan RA, Zhu JK (2018) Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 115(23): 6058–6063. DOI: 10.1073/pnas.1804774115
- Nieves-Cordones M, Mohamed S, Tanoi K, Kobayashi NI, Takagi K, Vernet A, Guiderdoni E, Perin C, Sentenac H, Véry AA (2017) Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter *OsHAK1* with the CRISPR–Cas system. *The Plant Journal*; 92: 43–56. DOI: 10.1111/tpj.13632
- Nekrasov V, Staskavicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*; 31: 691–693. DOI: 10.1038/nbt.265
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ,

- Qiu JL, Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*; 31: 686–688. DOI: 10.1038/nbt.2650
- Shen L, Wan C, Fu Y, Wang J, Liu Q, Zhan X, Yan C, Qian Q, Wang K. (2018) QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *Journal of Integrative Plant Biology*; 60: 89–93. DOI: 10.1111/jipb.12501
- Shen L, Hua Y, Fu Y, Li J, Liu Q, Jiao X, Xin G., Wang J, Wang X, Yan C, Wang K (2017a) Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Science China Life Sciences*; 60(5): 506–515. DOI: 10.1007/s11427-017-9008-8
- Shen R, Wang L, Liu X, Wu J, Jin W, Zhao X, Xie X, Zhu Q, Tang H, Li Q, Chen L, Liu YG (2017b) Genomic structural variation-mediated allelic suppression causes hybrid male sterility in rice. *Nature Communications*; 8(1): 1310. DOI: 10.1038/s41467-017-01400-y
- Shimatani Z, Fujikura U, Ishii H, Terada R, Nishida K, Kondo A (2018) Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data in Brief*; 20: 1325–1331. DOI: 10.1016/j.dib.2018.08.124
- Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*; 35(5): 441–443. DOI: 10.1038/nbt.3833
- Sun Y, Zhan X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zha Y, Xia L (2016) Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Molecular Plant*; 9: 628–631. DOI:10.1016/j.molp.2016.01.001
- Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du J, Francis F, Zhao Y, Xia L (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*; 8: 298. DOI: 10.3389/fpls.2017.00298
- Tang L, Mao B, Li Y, Lv Q, Zhang L, Chen C, He H, Wang W, Zeng X, Shao Y, Pan Y, Hu Y, Peng Y, Fu X, Li H, Xia S, Zhao B (2017) Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports*; 7(1): 14438. DOI: 10.1038/s41598-017-14832-9
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS ONE*; 11(4): e0154027. DOI: 10.1371/journal.pone.0154027
- Wang FZ, Chen MX, Yu LJ, Xie LJ, Yuan LB, Qi H, Xiao M, Guo W, Chen Z, Yi K, Zhang J, Qiu R, Shu W, Xiao S, Chen QF (2017) *OsARM1*, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in regulation of the response to arsenic stress in rice. *Frontiers in Plant Science*; 8: 1868. DOI: 10.3389/fpls.2017.01868
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*; 6: 1975–1983. DOI:10.1093/mp/sst119
- Xie Y, Niu B, Long Y, Li G, Tang J, Zhang Y, Ren D, Liu Y, Chen L (2017) Suppression or knockout of SaF / SaM overcomes the Sa-mediated hybrid male sterility in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*; 59(9): 669–679. DOI: 10.1111/jipb.12564
- Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, Li L, Wei P, Yang J (2016) Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of Genetics and Genomics*; 43: 529–532. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.07.003
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li L., Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*; 296(5565): 79–92. DOI: 10.1126/science.1068037
- Zhang J, Zhang H, Botella JR, Zhu JK (2018) Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. *Journal of Integrative Plant Biology*; 60(5): 369–375. DOI: 10.1111/jipb.12620
- Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, Zhu L, Ni E, Jiang D, Zhao B, Zhuang C (2016) Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Scientific Reports*; 6: 37395. DOI 10.1038/srep37395

Научный рецензируемый журнал

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Научный редактор: Анисимова И. Н., Соколова Е. А.

Перевод: Крылов А. Г., Шувалов С. В.

Компьютерная верстка: Чухин Г. К.

Корректор: Крылов А. Г.

Подписано в печать 20.02.2019 Формат бумаги 70×100 ¹/₈
Бумага офсетная. Печать офсетная
Печ. л. 7,0. Тираж 30 экз. Зак.

Сектор редакционно-издательской деятельности ВИР
190000, Санкт-Петербург, Большая Морская ул., 44



БИОТЕХНОЛОГИЯ
И СЕЛЕКЦИЯ
РАСТЕНИЙ

2019 2(1)