

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

5 (311)

**ҚЫРКҮЙЕК – ҚАЗАН 2015 ж.
СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ 2015 г.
SEPTEMBER – OCTOBER 2015**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

Ж. А. Арзықұлов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к ең е с і:

Абжанов Архат (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

Ж. А. Арзыкулов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахисhev**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

Абжанов Архат (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2015

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

Abzhanov Arkhat (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2224-5308

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2015

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 311 (2015), 84 – 91

IDENTIFICATION OF SOURCE OF RICE RESISTANCE TO PYRICULARIA ORYZAE

A. S. Rsaliyev, Zh. U. Pakhratdinova, N. T. Amirkhanova, G. Sh. Yskakova

RGE «Research institute for biological safety problems» CS ME&S RK Gvardeiskiy, Kazakhstan.
E-mail: aralbek@mail.ru

Keywords: rice, rice blast, isolate, resistance gene, molecular markers.

Abstract. In recent years, the rice-growing regions of Kazakhstan suffer from the most dangerous and harmful disease of rice – *Pyricularia oryzae*. Evaluation of varieties and lines rice resistance to rice blast was provided with using phytopathological and molecular methods. The selective materials of rice are differentiated on resistance level and susceptibility to diseases on the infectious background. More than 30 varieties and lines of rice with high level of vertical and horizontal resistance to rice blast are detected. The molecular screening showed that 8 samples of rice has Pi-ta resistance gene, 5 samples – Pi-z, 8 samples – Pi-2, respectively. It has been demonstrated that the detected varieties with Pi-genes can be resistance sources to rice blast not only in Kazakhstan, also worldwide. Involvement in selection process of rice varieties with highly effective Pi-genes raises possibility of creation of new resistance of rice to rice blast.

УДК633.18.03:632.4.01.08

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ РИСА К ПИРИКУЛЯРИОЗУ

А. С. Рсалиев, Ж. У. Пахратдинова, Н. Т. Амирханова, Г. Ш. Ыскакова

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК,
пгт. Гвардейский, Казахстан

Ключевые слова: рис, пирикулярриоз, изолят, гены устойчивости, молекулярные маркеры.

Аннотация. В последние годы в рисосеющих регионах Казахстана стала распространяться самая опасная и вредоносная болезнь риса – пирикулярриоз. С использованием фитопатологических и молекулярных методов проведена оценка устойчивости сортов и линии риса к пирикулярриозу. На инфекционном фоне селекционные материалы риса дифференцированы по уровню устойчивости и восприимчивости к болезни. Выявлено более 30 сортов и линии риса с высоким уровнем вертикальной и горизонтальной устойчивости к пирикулярриозу. Молекулярный скрининг показал наличие у 8 образцов риса гена устойчивости Pi-ta, у 5 образцов – Pi-z, у 8 образцов – Pi-2, соответственно. Установлено, что выявленные сорта с Pi-генами могут служить источниками устойчивости к возбудителю пирикулярриоза риса не только в Казахстане, также во всем мире. Вовлечение в селекционный процесс сортов риса с высокоэффективными Pi-генами повышает возможность создания новых устойчивых форм риса к пирикулярриозу.

Введение. Одним из опасных заболеваний риса во всем мире, в том числе и в Казахстане, является пирикулярриоз, вызываемый несовершенным грибом *Pyricularia oryzae* Br. et Cav. (синоним *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. Болезнь впервые был отмечен в Китае в 1637 году. Позже оно стало известно в Японии в 1704 году, в Италии в 1828 году и в США в 1876 году. Сейчас пирикулярриоз встречается во всех районах возделывания риса. Патоген поражает все надземные органы растения, что приводит к потере урожая на 30-60%, а в годы эпифитотий – на 80-100% [1-4].

В Казахстане основной ареал распространения и вредоносности болезни находится в Кызылординской области. При этом пирикулярриоз риса впервые в этом регионе был зафиксирован в 1950 году [5]. Затем до середины 1990 годов это заболевание здесь не отмечалось. Эпифитотии болезни в Сырдаринском, Жалагашском, Жанакорганском районах наблюдались в 1998 г. и были обусловлены благоприятными погодными условиями [6]. В 2005 году рис был поражен в отдельных хозяйствах, где были нарушены технологии применения минеральных удобрений, в 2006 году вновь зафиксирована вспышка этой болезни [7]. В 2012 году очаги пирикулярриоза обнаружены на рисовых чеках в Кармакшинском, Сырдарьинском, Шиелийском районах, где потери зерна доходили до 25% [8]. В 2013-2014 годы нами проведен фитосанитарный мониторинг на производственных посевах в Казалийском, Кармакшинском, Жанакорганском, Сырдаринском и Шиелийском районах Кызылординской области. В результате в конце июля – начале августа повсеместно отмечены очаги пирикулярриоза, заболевание выражено в листовой и метельчатой формах.

По научной и экономической важности возбудитель пирикулярриоза риса *P. oryzae* возглавляет «Топ-10» грибных болезней растений. Эксперты подчеркивают экономическое значение этого гриба, так как он может буквально уничтожать рисовые поля, являющиеся основой для питания половины населения Земли [9]. Возбудитель *P. oryzae* образует фитотоксины – пирикуляррин и α -пиколиновую кислоту, вызывающие у растений типичные симптомы заболевания. Устойчивые к пирикулярриозу сорта риса устойчивы и к действию этих токсинов [10].

В настоящее время наиболее практичным и экономичным подходом в борьбе с пирикулярриозом риса является использование сортов, имеющих гены устойчивости к болезни. Гены устойчивости к пирикулярриозу обозначаются символом «Pi» – от английского названия *Pyricularia* (пирикулярриоз). До настоящего времени в мире были определены 100 генов устойчивости к пирикулярриозу риса, и они локализованы в 11 хромосомах риса, за исключением хромосомы 3. Среди них некоторые гены были клонированы (*Pib, Pita, Pi9, Pi2, Piz-t, Pid2, Pi36, Pi37, Pik-m, Pit, Pi5, Pid3, pi21, Pb1, Pish, Pik, Pik-p, Pi54, Pia, NLS1* и *Pi25*) [11]. Все клонированные гены устойчивости принадлежат к наиболее распространенному классу генов устойчивости растений – NBS-LRR, кодирующих белки, в структуру которых входит нуклеотид-связывающий домен – *nucleotide binding site* (NBS), а также рецепторная область, богатая лейцином – *leucine rich repeat* (LRR). Полные нуклеотидные последовательности Pi-генов устойчивости доступны в открытой базе генетических данных GenBank (www.ncbi.nih.gov) и Gramene (www.gramene.org).

В соответствии с тем, какие гены представлены в генотипе, определяется уровень устойчивости растений риса к этому патогену. Вместе с тем, в селекционно-генетических программах могут использоваться комбинации разных генов. Успех создания сортов риса, резистентных к пирикулярриозу, во многом определяется наличием источников, несущих высокоэффективные гены устойчивости. В настоящее время во многих рисосеющих странах мира высокоэффективными к пирикулярриозу являются гены Pi-ta, Pi-z и Pi-2. В связи с этим целью нашей работы было выделить сорта и линии риса, которые могли бы служить источниками эффективных Pi-генов устойчивости к пирикулярриозу.

Материалы и методы

Материалом для исследований были коллекционные сорта и образцы риса, имеющиеся в генофонде НИИПББ, а также новые и коммерческие сорта в Казахстане и России. Всего использовано 146 сортообразцов риса мировой селекции. В качестве инфекционного материала использовали конидий разных изолятов возбудителя *P. oryzae* (Po_3-1, Po_4-1, Po_5-1, Po_9-6), выделенных из казахстанской популяции гриба (таблица 1).

Устойчивость образцов риса оценивали в лабораторных условиях на искусственном инфекционном фоне в фазе 2-3 листьев растений. Для создания инфекционного фона использовали метод «инокуляция отрезки листьев фильтровальной бумагой, пропитанной суспензией гриба» [12]. При этом отрезки листьев (2-3 см) раскладывали в чашки Петри на поверхность 0,5 % агара, приготовленного на 0,004 % растворе бензимидазола. На поверхность каждого листа прикладывали фильтровальные бумаги, пропитанные суспензией гриба. Чашки Петри с инокулированными

Таблица 1 – Характеристики изолятов возбудителя *P. Oryzae*

Изоляты	Форма пирикулярриоза	Происхождение	Тип колонии	Годы выделения изолята
Po_3-1	Листовая	Казалинский район, с/о Коларык, ЗАО «Жалантос батыр»	А	2013-2014
Po_4-1	Листовая	Казалинский район, с/о Карашенгел, ЗАО «Жалантос батыр»	Р	2014-2015
Po_5-1	Листовая	Кармакшинский район, с/о Дауылкол, ЗАО «Турмагамбет»	А	2014-2015
Po_9-6	Листовая	Сырдаринский район, с. Калжанахун, хозяйства «Бак»	В	2014-2015

отрезками листьев помещали в затемненное место на 24-36 ч при температуре 25 °С, затем переносили на светоустановку с 12-часовым режимом освещения и температурой 22-25 °С и удаляли фильтровальные бумаги с поверхности каждого листа. На 8 день после заражения проводили оценку устойчивости сортов риса к изолятам гриба по шкале Международного института риса [13]. При этом поражение сортов с типом реакции 0 балла – относился к иммунной группе, 1 балла – устойчивой, 2-3 балла – умеренно устойчивой, 4-5 балла – умеренно восприимчивой, 6-7 – восприимчивой, 8-9 балла – сильно восприимчивой.

Для проведения молекулярного скрининга использованы ДНК-маркеры, тесно сцепленные с эффективными Pi-генами устойчивости к пирикулярриозу (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристики ДНК маркеров к Pi-генам устойчивости к пирикулярриозу риса

Ген	Праймеры	Последовательность праймеров	Продукт амплификации, п.н.	Источник
Pi-ta	Pi-ta F1	GCCGTGGCTTCTATCTTTACCTG	290/563	14
	Pi-ta R1	ATCCAAGTGTTAGGGCCAACATTC		
	Pi-ta F2	TTGACACTCTCAAAGG ACTGGGAT		
	Pi-taR2	TCAAGTCAGGTTGAAGATGCATAGA		
Pi-z	Z60510Piz-F	GGAGTTGGTTGCGACGGTGCCGTTAT	390	15
	Z60510Piz-R	GCGCGGACCGGCCAGCTAGTTGAC		
Pi-2	AP22-F	GTGCATGAGTCCAGCTCAAA	143	16
	AP22-R	GTGTACTCCCATGGCTGCTC		

Праймеры синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов H-16 ДНК/РНК/LNA (Германия), согласно инструкции, прилагаемой к прибору. При этом полученные олигонуклеотиды разделили с колонок концентрированным раствором аммиака и выпаривали в вакуумном испарителе Centri Var Concentrator (Labsonco). Преципитат праймеров растворяли в ТЕ буфере и переосаждали этанолом. Полученные таким образом синтезированные праймеры использовали для постановки ПЦР.

Экстракцию ДНК риса осуществляли из листьев 7-10 дневных проростков, согласно методике Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. [17]. Для постановки ПЦР использовали геномная ДНК риса, 10x ПЦР буфер (без MgCl₂), 10 mM dNTP-Mix, 50 mM MgCl₂, праймеры (10 pmol), TaqDNA polymerase (5U/μl) и бидистиллированная вода. Реакционный состав и температурно-временные режимы подбирали согласно аннотации, прилагаемой к ферменту и характеристикам праймеров. В качестве положительного контроля использовали ДНК сортов риса Yashiro-mochi, Zenith и линии С 101A51, которые являются источниками генов устойчивости Pi-ta, Pi-z и Pi-2, а отрицательным контролем служила деионизированная вода. Нарботку специфических участков ДНК проводили в термоциклере «Termocycler-Pro» (Eppendorf).

Выявление продукта ПЦР проводилось при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле (iNtRON, Biotechnology Grade). Разделение амплифицированных фрагментов выполняли в электрофорезной камере «Scie-Plas» в TBE буфере с добавлением бромистого этидия в течение 1,5 часов

при напряжении электрического поля 80 V. Анализ результатов электрофореза проводилось с использованием гель-документирующей системы «MiniBISPro» с программным обеспечением GelCapture и GelQuantExpress. Определение длин амплифицированных фрагментов проводилось по сравнению с ДНК – маркерами «1kbDNALadder» (InvitrogenCorporation).

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты эксперимента показали, что изученные сорта и линии риса характеризуется широкой амплитудой изменчивости по устойчивости к пирикулярриозу. При использовании различных изолятов гриба встречаются образцы всех групп устойчивости – от сильно восприимчивых до абсолютно устойчивых. В результате анализа полученных данных, коллекционные образцы риса сгруппированы по типам реакции устойчивости к пирикулярриозу (рисунок 1).

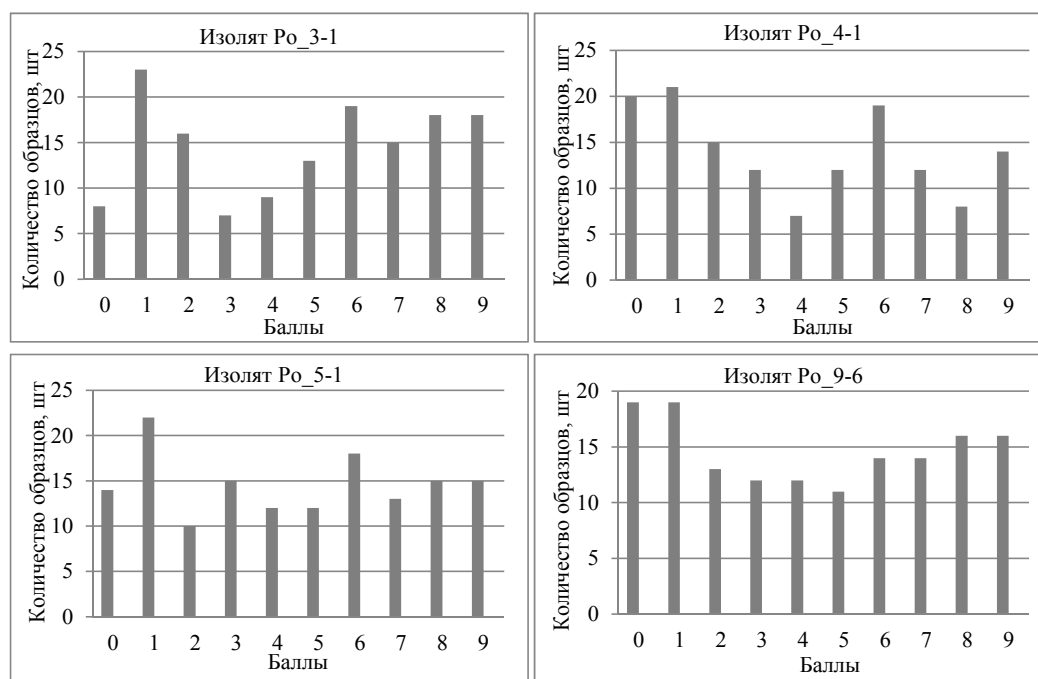


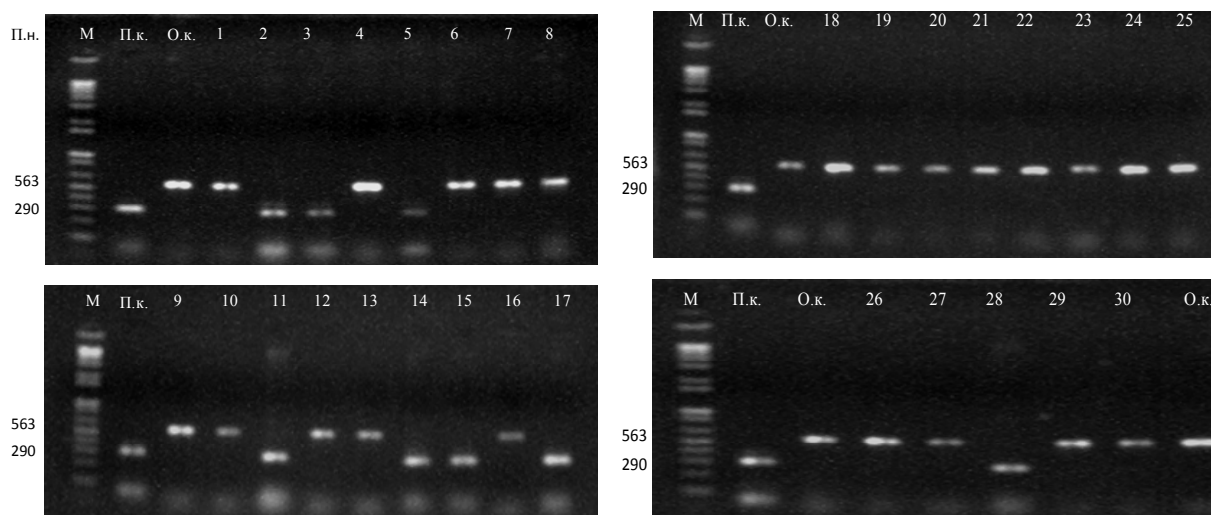
Рисунок 1 – Распределение сортообразцов риса по типам реакции устойчивости к изолятам пирикулярриоза

Как видно из данных рисунка 1, что среди использованных изолятов пирикулярриоза к сортам риса наиболее вирулентным был изолят Po_3-1. При этом из всего изученных материалов растений 8 сортов и линии риса оказались иммунными к данному изоляту, и соответственно, 23 – устойчивыми, 7 – умеренно устойчивыми, 22 – умеренно восприимчивыми, 34 – восприимчивыми и 36 – сильно восприимчивыми. Изоляты Po_4-1 и Po_9-6 показали наименьшую вирулентность к коллекционным сортам риса, а изолят Po_5-1 имеет среднюю вирулентность. В ходе экспериментов выявлены более 30 сортов и линии риса ближнего и дальнего зарубежья (Amerilambda B, Livorno, Matusaska, Лазурный, Shinsetsu, Sorachi, Iukara, Ishikari, Fujisaka 5, Shin 2, Садри Массол, Sollano, Caprogram, Юбилейный, Zurtu 10, Szarvasi 70, Nucleorisa, Камертон, Лиман, Американ шалы, Кзыл-шалы, Арпа-шалы, Кубанский 140, Краснодар 3352, Дин-сян, Апорна, China Feng, M-3902, M-1060, M-194I), обладающие высокой устойчивостью к четырем изолятам пирикулярриоза. Из использованных изолятов ни один не был вирулентным к указанным сортам. Следует отметить, что данные образцы в полевых условиях также были устойчивыми к листовой, узловой и метельчатой формам патогена. Кроме того, российские сорта Победа-65, ВНИИР-102-24, ВНИИР-101-77, ВНИИР-101-78, ВНИИР-102-20, ВНИИР-101-78, узбекский сорт Искандер и итальянский сорт Бальдо показали высокую устойчивость ко всем изолятам гриба, при этом имели тип реакции в 0 и 1 балла. Таким образом, на основе полученных результатов установлено, что выявленные сорта и линии риса с высокой устойчивостью могут быть носителями эффективных Pi-генов устойчивости к пирикулярриозу, и они являются ценными донорами для селекции на иммунитет.

Следующим этапом работы было проведение молекулярный скрининг сортов риса с целью выявления носителей эффективных генов устойчивости к пирикулярриозу. В общей сложности было протестировано 60 сортов риса. В их геноме с помощью ДНК-маркеров на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) определяли присутствие следующих генов устойчивости к пирикулярриозу – Pi-ta, Pi-z и Pi-2.

Доминантный ген устойчивости к пирикулярриозу Pi-ta секвенирован, он расположен в области центромеры 12-той хромосомы риса. Нуклеотидные последовательности доминантной (источник – сорт Yashiro-mochi) и рецессивной (источник – Tsuyake) аллелей гена Pi-ta находятся в базе генетических данных GenBank с номерами – AF207842 и AY196754, соответственно. При этом доминантная и рецессивная аллели этого гена отличаются одной аминокислотной заменой кодируемого геном белка: в положении 918 серина на аланин. Это обуславливает наличие двух аллелей данного гена: Pi-ta⁻ и Pi-ta⁺. Для идентификации гена Pi-ta подобрано две пары праймеров, так, что в каждой паре праймеров один является специфичным для конкретной аллели. При использовании специфичных праймеров размер ПЦР-продукта у сортов с устойчивой аллелью гена Pi-ta составляет около 290 п.н., а у сортов с восприимчивой аллелью – 563 п.н, соответственно.

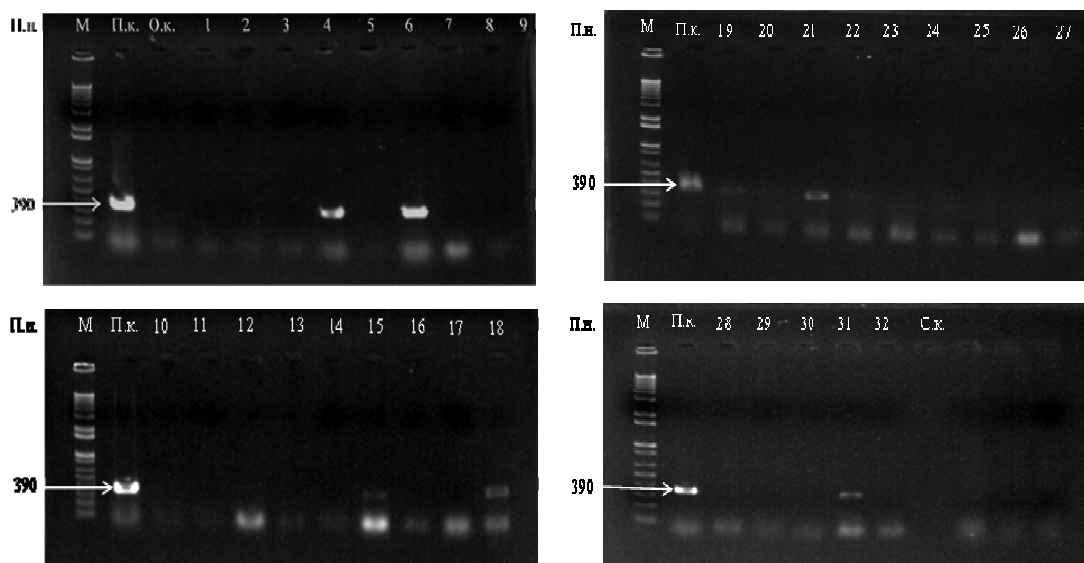
Результаты эксперимента показали, что у сортов Livorno, Matusaska, Shinsetsu, Садри Массол, Юбилейный, Zurgu 10, Nucleogisa и M-3902 присутствует только фрагмент, аналогичный по размеру ПЦР-продукту положительного контроля, что говорит о наличии у них доминантной аллели устойчивости в гомозиготном состоянии. Остальные исследованные сорта несут рецессивную аллель гена (рисунок 2).



М – маркер (1kbLadder), П.к – положительный контроль, О.к. – отрицательный контроль, 1 – AmerilambdaB, 2 – Livorno, 3 – Matusaska, 4 – Лазурный, 5 – Shinsetsu, 6 – Sorachi, 7 – Iukara, 8 – Ishikari, 9 – Fujisaka 5, 10 – Shin 2, 11 – СадриМассол, 12 – Sollano, 13 – Caprogramma, 14 – Юбилейный, 15 – Zurgu 10, 16 – Szarvasi 70, 17 – Nucleorisa, 18 – Камертон, 19 – Лиман, 20 – Американ шалы, 21 – Кзыл-шалы, 22 – Арпа-шалы, 23 – Кубанский 140, 24 – Краснодар 3352, 25 – Дин-сян, 26 – Апорна, 27 – China Feng, 28 – M-3902, 29 – M-1060, 30 – M-194

Рисунок 2 – Молекулярный скрининг коллекционных сортов риса для выявления доминантных и рецессивных аллелей устойчивости гена Pi-ta

Ген устойчивости к пирикулярриозу Pi-z, локализованный в хромосоме 6, был идентифицирован как объединенный в кластер с геном Pi-zt, определяемый как Pi-z локус. Кроме того, был создан ряд ДНК-маркеров к ним, основанных на полиморфизме единичных нуклеотидных замен (SNP) у доминантных и рецессивных аллелей генов. При использовании праймера Z60510Piz продукт амплификации размером 390 п.н. указывает на доминантной аллели данного гена. В результате ПЦР, специфический продукт амплификации размером 390 п.н. нарабатывался на следующих коллекционных сортах риса: Лазурный, Sorachi, Zurgu 10, Камертон и Кзыл-шалы. Следует отметить, что у сорта Zurgu 10 также был идентифицирован ген устойчивости Pi-ta. Результаты исследований представлены на рисунке 3.

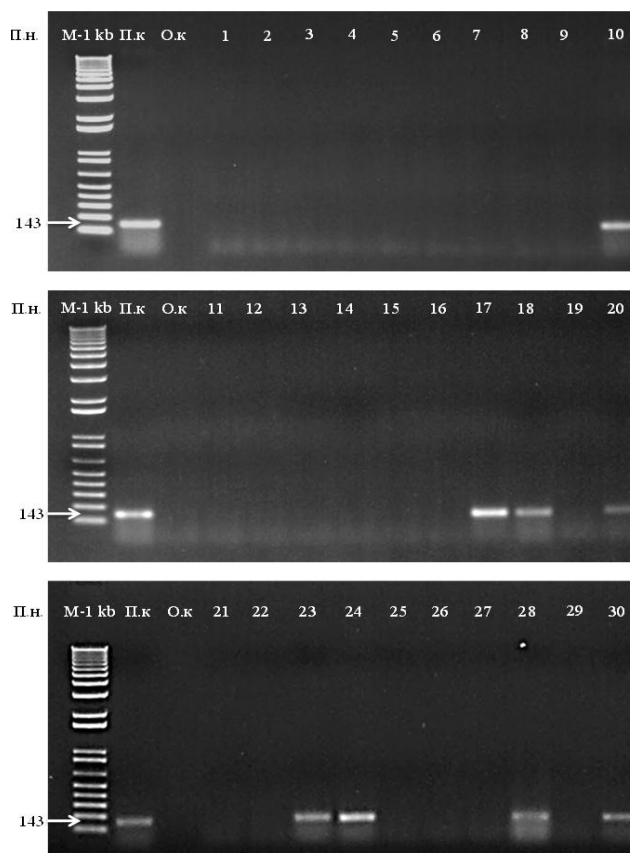


М – маркер (1kb Ladder), П.к – положительный контроль, О.к. – отрицательный контроль, 1 – AmerilambdaB, 2 – Livorno, 3 – Matusaska, 4 – Лазурный, 5 – Shinsetsu, 6 – Sorachi, 7 – Iukara, 8 – Ishikari, 9 – Fujisaka 5, 10 – Shin 2, 11 – Садри Массол, 12 – Sollano, 13 – Capgramma, 14 – Юбилейный, 15 – Zurru 10, 16 – Szarvasi 70, 17 – Nucleorisa, 18 – Камертон, 19 – Лиман, 20 – Американ шалы, 21 – Кызыл-шалы, 22 – Арпа-шалы, 23 – Кубанский 140, 24 – Краснодар 3352, 25 – Дин-сян, 26 – Апорна, 27 – China Feng, 28 – М-3902, 29 – М-1060, 30 – М-194, 31 – П.к, 32 – Лиман

Рисунок 3 – Молекулярный скрининг коллекционных сортов риса для выявления доминантного аллеля гена устойчивости Pi-z

М – маркер DNA Ladder, П.к. – положительный контроль, О.к. – отрицательный контроль, 1 – Маржан, 2 – Ару, 3 – Түгіскен, 4 – Арал-202, 5 – Казниир-5, 6 – КазЕр-6, 7 – Мадина, 8 – Лидер, 9 – Янтарь, 10 – Новатор, 11 – Анаит, 12 – Сонет, 13 – Фишт, 14 – Ивушка, 15 – Атлант, 16 – Шарм, 17 – Крепыш, 18 – Виола, 19 – Царин, 20 – Флагман, 21 – Рубин, 22 – Виолетта, 23 – Победа-65, 24 – ВНИИР-102-24, 25 – ВНИИР-101-77, 26 – ВНИИР-101-78. без ост., 27 – ВНИИР-102-20, 28 – ВНИИР-101-78. ост., 29 – Искандер, 30 – Бальдо

Рисунок 4 – Молекулярный скрининг коллекционных сортов риса для выявления доминантного аллеля гена устойчивости Pi-2



Ген Pi-2 расположен около центromеры в коротком плече хромосомы 6, тесно связан с генами Pi-9, Pi-z и Pi-z-t [18, 19]. Данный ген интoгрессирован в геном изогенной линии С101А51 из сорта риса *indica* 5173 [20]. К настоящему времени разработано несколько молекулярных маркеров,

тесно сцепленных с геном Pi-2. Ранее было установлено, что ген Pi-2 генетически отображается между маркерами 2123 и RG64, с интервалом расстояний 2.2 сМ [19]. Для идентификации носителей гена Pi-2 нами был выбран маркер AP22 к SSR-локусу, генетическое расстояние между маркером и геном оценивается в 1,2 сМ [21].

С целью выявления носителей данного гена нами протестированы 30 коммерческих и новых сортов риса Казахстана и России. При использовании специфичного праймера AP22, характерный фрагмент амплификации в размере 143 п.н. обнаружен у сортов Новатор, Крепыш, Виола, Флагман, Победа-65, ВНИИР-102-24, ВНИИР-101-78 и Бальдо. На основе полученных результатов можно предположить, что вышеотмеченные сорта являются носителями гена устойчивости Pi-2. Результаты исследований показаны на рисунке 4. Следует отметить, что данный ген еще широко не используется в селекции, в связи, с чем он должен играть определенную роль при создании новых сортов риса в комбинации с другими генами.

Выводы. Таким образом, в результате использования фитопатологических и молекулярно-генетических методов охарактеризовано 146 сортов и линии риса мировой селекции. Выявлено более 30 сортов и линии риса с высоким уровнем вертикальной и горизонтальной устойчивости к пирикулярриозу. Молекулярный скрининг показал наличие у 8 образцов риса гена устойчивости Pi-ta, у 5 образцов – Pi-z, у 8 образцов – Pi-2, соответственно. Выявление устойчивых форм риса на искусственном фоне развития пирикулярриоза способствуют увеличению селекционных работ по созданию болезнестойчивых сортов. В настоящее время отобранные нами источники устойчивости с эффективными Pi-генами используются селекционерами Казахского научно-исследовательского института рисоводства имени Ы. Жахаева для получения новых сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу. Следовательно, использование в селекции выделенных сортов и линий риса с эффективными генами устойчивости к пирикулярриозу способствует сохранению урожая на 15-40% и повышению качества зерна.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Wang X., Lee S., Wang J., Ma J., Bianco T., Jia Y. Current advances on genetic resistance to rice blast disease. Rice – Germplasm, Genetics and Improvement. 2014. – 195-217. <http://dx.doi.org/10.5772/56824>.
- [2] Wang G.L., Valent B. Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. Springer Science+Business Media B.V. 2009. – 27 p. DOI 10.1007/978-1-4020-9500-9.
- [3] Мухина Ж.М., Волкова С.А., Дубина Е.В. Изучение биоразнообразия фитопатогенного гриба *Magnaporthe grisea* (Herbert) Вагг с использованием методов молекулярного маркирования (Методические рекомендации). – Краснодар: ВНИИРиса. 2007. – 19 с.
- [4] Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding // Korean J. Breed. 2003. – Vol.35. – P. 133-140.
- [5] Казенас Л.Д. Болезни сельскохозяйственных растений Казахстана. – Алма-Ата: Кайнар, 1974 – 366 с.
- [6] Койшибаев М. Болезни зерновых культур. – Алматы: Бастау, 2002. – 368 с.
- [7] Абилдаева Ж.А. Основные болезни риса в Приаралье и меры борьбы с ними / Кызылординский Государственный Университет им. Коркыт-Ата – 2006. http://www.rusnauka.com/ESPR_2006/Agricole/5_abildaeva.doc.htm
- [8] Жакибаева М. Когда цветет рис // Кызылординские вести. http://kv.ucoz.kz/news/kogda_cvetet_ris/2012-07-26-11093. 26.07.2012.
- [9] Dean R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. // *Mol. Plant Pathol.* 2012. – Vol.13. – P.804-804.
- [10] Мусаев Ф.А., Захарова О.А., Морозова Н.И. Класс несовершенные грибы (Учебное пособие). – Рязань: Издательство РГАТУ. 2014. – 135 с.
- [11] Sharma T. R., Rai A. K., Gupta S. K., Vijayan J., Devanna B. N., Ray S. Rice Blast Management Through Host-Plant Resistance: Retrospect and Prospects. // *Agric Res.* DOI 10.1007/s40003-011-0003-5. 2012. – Vol.1. – P.3-18.
- [12] Takahashi W., Miura Y., Sasaki T. A novel inoculation method for evaluation of grey leaf spot resistance in Italian ryegrass // *Journal of Plant Pathology.* – 2009. – Vol. 91. – No. 1. – P. 171-176.
- [13] Standard Evaluation System for rice // 4th edition; IRRI, INGER Genetic Resources Center. – Manila, Philippines, 1996. – P. 49.
- [14] Мухина Ж.М., Токмаков С.В., Мягких Ю.А., Дубина Е.В. Создание внутригенных молекулярных маркеров риса для повышения эффективности селекционного и семеноводческого процессов. // *Научный журнал КубГАУ.* 2011. №67(03). – С.1-10.
- [15] Kim J.S., Ahn S.N., Kim C.K., Shim C.K. Screening of rice blast resistance genes from aromatic rice germplasms with SNP markers. // *Plant Pathol. J.* 2010. – Vol.26. – P.70-79.
- [16] Wu J.H., Jiang J.S., Chen H.L., Wang S.P. Fine mapping of rice blast resistance gene Pi2(t) // *Acta Agronica Sinica.* – 2002. – Vol. 28. – P.505-509.
- [17] Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II. // *Plant. Mol Biol. Rep.* 1983. – Vol.1. – P.19-21.
- [18] Hsuashi K., Hashimoto N., Daigen M., Ashikawa I. Development of PC-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2004. – Vol.108. – P.1212-1220.

- [19] Liu G., Lu G., Zeng L., Wang G.L. Two broad-spectrum blast resistance genes Pi9 (t) and Pi2 (t), are physically linked on rice chromosome 6 // *Mol.Genet.Genomics*. – 2002. – Vol. 267. – P.472-480.
- [20] Mackill D.J., Bonman J.M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice // *Phytopathology*. – 1992. – Vol. 82. – P.746-749.
- [21] Wu J.H., Jiang J.S., Chen H.L., Wang S.P. Fine mapping of rice blast resistance gene Pi2(t) // *ActaAgronicaSinica*. – 2002. – Vol. 28. – P.505-509.

REFERENCES

- [1] Wang X., Lee S., Wang J., Ma J., Bianco T., Jia Y. Current advances on genetic resistance to rice blast disease. *Rice – Germplasm, Genetics and Improvement*. 2014. – 195-217. <http://dx.doi.org/10.5772/56824>.
- [2] Wang G.L., Valent B. Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. Springer Science+Business Media B.V. 2009. – 27 p. DOI 10.1007/978-1-4020-9500-9.
- [3] Mukhina J.M., Volkov S.A., Dubina E.V. The study of biodiversity plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr using methods of molecular marking (Guidelines). Krasnodar Research Institute of rice. 2007. P.19. (in Russ.).
- [4] Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding // *Korean J. Breed*. 2003. – Vol.35. – P. 133-140.
- [5] Kazenas L.D. Diseases of agricultural plants in Kazakhstan. Alma-Ata: Kaynar, 1974. 366 p. (in Russ.).
- [6] Koishybayev M. Diseases of cereal crops. -Almaty Bastau, 2002. 368p. (in Russ.).
- [7] Abildaeva J.A. Main diseases of rice in the Aral Sea region and their control/Kyzylorda State University. Korkyt-Ata - 2006. http://www.rusnauka.com/ESPR_2006/Agricole/5_abildaeva.doc.htm (in Russ.).
- [8] Zhakibaeva M. When the blossoms // *Figure Kyzylordinskielead*. http://kv.ucoz.kz/news/kogda_cvetet_ris/2012-07-26-11093. 26.07.2012. (in Russ.).
- [9] Dean R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. // *Mol. Plant Pathol*. 2012. – Vol.13. – P.804-804.
- [10] Musayev F.A., Zakharova O., Morozova N.I. Class of imperfect fungi (Tutorial). - Ryazan: Publishing Framework. 2014. 135 p. (in Russ.).
- [11] Sharma T. R., Rai A. K., Gupta S. K., Vijayan J., Devanna B. N., Ray S. Rice Blast Management Through Host-Plant Resistance: Retrospect and Prospects. // *Agric Res*. DOI 10.1007/s40003-011-0003-5. 2012. – Vol.1. – P.3-18.
- [12] Takahashi W., Miura Y., Sasaki T. A novel inoculation method for evaluation of grey leaf spot resistance in Italian ryegrass // *Journal of Plant Pathology*. – 2009. – Vol. 91. – No. 1. – P. 171-176.
- [13] Standard Evaluation System for rice // 4th edition; IRRI, INGER Genetic Resources Center. – Manila, Philippines, 1996. – P. 49.
- [14] Mukhina J.M., Tokmak S.V., Soft J.A., Dubin E.V. Create intragenic molecular markers to improve the efficiency of rice breeding and seed production process. // *Scientific journal KubGAU*. 2011. №67 (03). P.1-10. (in Russ.).
- [15] Kim J.S., Ahn S.N., Kim C.K., Shim C.K. Screening of rice blast resistance genes from aromatic rice germplasms with SNP markers. // *Plant Pathol. J*. 2010. – Vol.26. – P.70-79.
- [16] Wu J.H., Jiang J.S., Chen H.L., Wang S.P. Fine mapping of rice blast resistance gene Pi2(t) // *ActaAgronicaSinica*. – 2002. – Vol. 28. – P.505-509.
- [17] Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA minipreparation: version II. // *Plant. Mol Biol. Rep*. 1983. – Vol.1. – P.19-21.
- [18] Hauashi K., Hashimoto N., Daigen M., Ashikawa I. Development of PC-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – Vol.108. – P.1212-1220.
- [19] Liu G., Lu G., Zeng L., Wang G.L. Two broad-spectrum blast resistance genes Pi9 (t) and Pi2 (t), are physically linked on rice chromosome 6 // *Mol.Genet.Genomics*. – 2002. – Vol. 267. – P.472-480.
- [20] Mackill D.J., Bonman J.M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice // *Phytopathology*. – 1992. – Vol. 82. – P.746-749.
- [21] Wu J.H., Jiang J.S., Chen H.L., Wang S.P. Fine mapping of rice blast resistance gene Pi2(t) // *ActaAgronicaSinica*. – 2002. – Vol. 28. – P.505-509.

ПИРИКУЛЯРИОЗҒА КҮРІШТІҢ ТӨЗІМДІЛІК КӨЗДЕРІН ЖІКТЕУ

А. С. Рсалиев, Ж. У. Пахратдинова, Н. Т. Амирханова, Г. Ш. Ысқақова

ҚР ҒҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК, Гвардейск, Қазақстан

Тірек сөздер: күріш, пирикуляриоз, изолят, төзімділік гендері, молекулалық маркерлер.

Аннотация. Соңғы уақыттары Қазақстанның күріш өндіретін аймақтарында күріштің ең қауіпті және зиянды пирикуляриоз ауруы анықталып жүр. Фитопатологиялық және молекулалық әдістерді пайдалана отырып күріш сорттары мен линияларының пирикуляриозға төзімділігі бағаланды. Жасанды індет аясында ауруға төзімділік және қабылдағыштық деңгейі бойынша күріштің селекциялық материалдары жіктелінді. Пирикуляриозға көлденең және тік төзімділікті жоғарғы деңгейде қамтамасыз ететін күріштің 30 жуық сорттары мен линиялары анықталды. Молекулалық скрининг жүргізу нәтижесінде күріштің 8 үлгісінен Pi-ta төзімділік гені, 5 үлгісінен Pi-z және 8 үлгісінен Pi-2 гені табылды. Анықталған құрамында Pi-гені бар күріш сорттары тек Қазақстанда ғана емес әлемнің басқа да елдерінде пирикуляриоз коздырғышына төзімділік көздері болып табылады. Ауруға төзімділігі тиімділігі жоғары Pi-гендермен қорғалған күріш сорттарын селекциялық жұмыстарға қолдану пирикуляриоз ауруына төзімді күріштің жаңа сорттарын шығаруға мүмкіндік береді.

Поступила 31.07.2015 г.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 15.09.2015.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
6,5 п.л. Тираж 300. Заказ 4.