УДК 633.18:575.11:631.523.11

© С. В. Токмаков[1],
Ж. М. Мухина[2], Д. И. Богомаз[3],
Т. В. Матвеева[3]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт риса
[2] ФГОУ «Краснодарский региональный институт агробизнеса»
[3] Санкт-Петербургский государственный университет

СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВНУТРИВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ПО ГЕНУ *RC*, ОБУСЛОВЛИВАЮЩЕМУ КРАСНУЮ ОКРАСКУ ПЕРИКАРПА РИСА *ORYZA SATIVA L.*

❀ **Во всех зонах рисосеяния краснозерные формы риса являются злейшими засорителями полей. Ранняя диагностика краснозерных форм в системе первичного семеноводства риса — задача первостепенной важности, решение которой напрямую влияет на качество производимых семян культуры риса. Красная и красно-коричневая окраска перикарпа зерновки определяется, по крайней мере, двумя локусами: *Rc* и *Rd*, если последний экспрессируется совместно с геном *Rc*. В работе был создан и апробирован на сортах риса, контрастных по изучаемому признаку, внутригенный кодоминантный молекулярный маркер гена *Rc*. Была показана его эффективность при скрининге 1142 семей риса по 120 растений в каждой.**

❀ **Ключевые слова**: краснозерный рис; ген Rc; молекулярный маркер; ПЦР; электрофорез.

Поступила в редакцию 03.02.2011.
Принята к публикации 27.05.2011.

ВВЕДЕНИЕ

Рис является одной из трех важнейших продовольственных культур. По данным Департамента сельского хозяйства США (World Agricultural Supply and Demand Estimates, September 10, 2010), за 2009/10 год валовой сбор риса в мире составил 441,15 миллионов тон.

Получение чистосортных семян — залог качественного семеноводства. Для их получения разработана специальная система семеноводства, позволяющая эффективно бороться с сортовыми примесями.

Согласно ограничительным нормам для заготавливаемого риса по ГОСТ 6293-90, примесь красных зерен должна составлять не более 2,0 % для зерна высшего класса, 5,0 % — первого класса, 10 % — второго класса и 15 % — третьего (п. 2.2).

В последнее время, высокую актуальность приобрела проблема краснозерных форм, особенно так называемых фенокопий районированных сортов риса в производственных и семеноводческих посевах, которые не обнаруживаются при сортовых прополках. Данные, полученные отделом семеноводства и семеноведения ВНИИ риса, показывают, что каждый процент краснозерной примеси снижает урожай партии семян на 1,5–2,3 % (Апрод А. И. и др., 1986).

Обычно краснозерный рис характеризуется повышенной осыпаемостью и наличием периода покоя. Несмотря на то, что рис — самоопыляемая культура, краснозерный рис легко скрещивается с районированными белозерными сортами, что делает применение устойчивых к гербицидам трансгенных белозерных сортов непрактичным.

Таким образом, ранняя диагностика краснозерных форм (до стадии выметывания метелки) в системе первичного семеноводства риса — задача первостепенной важности, решение которой напрямую влияет на качество производимых семян риса. Необходимую для решения проблемы краснозерности информацию можно получить, используя методы молекулярного маркирования.

Общепринята точка зрения, что красная и красно-коричневая окраска зерновки определяется по крайней мере двумя парами локусов, местоположение которых, как и группы сцепления, установлены (Nagao and Takahashi, 1962). Было показано, что ген *Rc* обеспечивает красновато-коричневую окраску всей поверхности зерновки, а ген *Rd* кодирует красновато-коричневую пятнистость на красно-буром фоне, если он экспрессируется совместно с геном *Rc*. Ген *Rd* не способен вызывать окраску самостоятельно. Комбинации разных аллелей этих локусов экспрессируются по-разному:

Rc+ *Rd*− — красновато-коричневая окраска всей зерновки;
Rc+ *Rd*+ — красновато-коричневые пятна на красно-буром фоне;
Rc− *Rd*+ — неокрашенный перикарп.

Таблица 1

Различия между кодирующими последовательностями аллелей гена *Rc**

	коричневый	белый	красный	красный	розовый	фенотип
	japonica	*indica*	*indica*	*O. rufipogon*	*indica*	подвид/вид
Позиция нуклеотида на мРНК	H75	Wells	Red Wells	*O. rufipogon*	Sujamkuhi	название
	Rc	*rc*	*Rc-g*	*Rc*	*Rc-s*	аллель
21	T	T	T	A	A	
96	G	G	G	T	G	
324	T	T	T	G	G	
660	A	A	A	A	G	
897	A	A	A	G	G	
1191	G	G	G	A	A	
1353	C	C	C	C	A	
1388	G	G	делеция	G	G	
1408–1421	ACGC-GAAAAGTCGG	делеция	делеция	ACGC-GAAAAGTCGG	ACGC-GAAAAGTCGG	
1833–1844	делеция	делеция	делеция	(cgg)x4	(cgg)x2	
1923	T	T	T	C	C	
1962	T	T	T	C	C	
1982–1987	AAATGC	AAATGC	AAATGC	делеция	делеция	

* Функциональный полиморфизм выделен серым цветом.

Гены *Rc* и *Rd* относят к структурным генам, влияющим на окраску зерна риса. Также, к структурным генам относят гены *C* (хромоген) и A (активатор). C-локус отвечает за синтез антоцианидина и состоит из аллельной серии C^B, C^{Br}, C_+ (нуль аллель), а A-локус активирует C-ген, необходимый для синтеза проантоцианидина и, в свою очередь, состоит из аллельной серии *AS, AE, A,* A^+ (нуль аллель).

Как было опубликовано Kondo (1961) и Takahashi (1972), Rc-локус, возможно, состоит из мультиаллельной серии. Takahashi M., Mori T., Kinoshita и другие (1972) распределили эти аллели по интенсивности проявления окраски:

Rc > Rcs > Rc+.

Установлено, что Rc аллели белозерного риса отличны от Rc аллели риса с коричневым, красным и розовым фенотипами делецией в 14-й паре нуклеотидов ACGCGAAAAGTCGG, что на мРНК соответствует позиции 1408–1421 пар оснований. Данная делеция приводит к сдвигу рамки считывания (Sweeney et al., 2006).

В 2007 году Brooks с соавторами идентифицировал еще одну аллель гена Rc — Rc-g. Данная аллель появилась в результате природной точковой мутации в аллели rc (приводящей к белой окраске перикарпа) у сорта Wells. Мутация приводит к восстановлению рамки считывания гена, в результате чего становится возможным синтез нормального фермента, контролирующего образование проантоцианидина, что в конечном итоге выражается в красной окраске семян, как у дикого типа растений. Посредством секвенирования Rc локуса краснозерного мутанта сорта Wells и анализа групп сцепления в сегрегирующей популяции, было показано, что новая мутантная аллель Rc-g доминантна и отличается от rc аллели сорта Wells делецией одного нуклеотида «G» в позиции 1388 на мРНК.

Полиморфизм кодирующих последовательностей различных аллелей гена *Rc* показан в таблице 1. Таблица составлена по объединенным данным M. T. Sweeney et al. и S. A. Brooks et al.

Аллели Rc и Rcs по-разному взаимодействуют с геном *Rd*, несмотря на то, что они расположены в одном локусе. Подобные случаи известны и у других видов растений. Например, различие взаимодействий аллелей гена *dt* с геном Al определяют типы окраски алейронового слоя у кукурузы (Kato, Ishikawa, 1921).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ввиду высокой актуальности проблемы засоренности производственных посевов риса краснозерными формами для ее решения необходим комплексный научно-производственный подход, который предполагает глубокое знание генетических причин возникновения краснозерности. Особое значение здесь приобретает технология молекулярного маркирования.

Разработка методики идентификации гена окраски перикарпа *Rc*, позволит проводить массовый скри-

нинг генетической плазмы на любом этапе селекционно-семеноводческой программы, от планирования комбинаций скрещивания до первичных звеньев семеноводства.

В нашем исследовании были поставлены следующие *задачи:*

- создать молекулярный маркер к гену окраски перикарпа риса *Rc,* который позволит выявлять наличие гена *Rc* у растений на самых ранних стадиях онтогенеза, до непосредственного фенотипического проявления признака, и, тем самым, элиминировать нежелательные генотипы из дальнейшего размножения;
- определить порог чувствительности созданных аллельспецифичных праймеров к гену *Rc* при различном соотношении образцов ДНК красно- и белозерного риса в одной пробирке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Апробация созданного молекулярного маркера к гену *Rc* красной окраски перикарпа риса проводилась на контрастных по изучаемому признаку сортах риса: краснозерных *(RcRc)* — Рубин, Карат, белозерных *(rcrc)* — Хазар, Талисман, Снежинка из коллекции ВНИИ риса; а также на белозерных сортах и их так называемых краснозерных «фенокопиях» — Павловский, Спринт, Виктория, Соната, Привольный, Кубань-3. Все образцы являются материалом рабочей коллекции и предоставлены лабораторией исходного материала ВНИИ риса.

Для выделения ДНК использовали бесхлорофилльные семидневные проростки, получаемые путем инкубации на увлажненной фильтровальной бумаге в темноте, при температуре 25–27 °С.

Полевой эксперимент

Проводился на материале, взятом из питомника испытания потомств первого года лаборатории семеноводства и семеноведения ВНИИ риса: 390 семей сорта Атлант, 98 семей сорта Ренар и 654 семей сорта Флагман, итого — 1142 семей по 120 растений в каждой, т. е. всего 137 040 растений.

Метод посева в делянке — однорядковый, с шириной междурядья 30 см. Длина делянки 333 см, норма высева — 120 всхожих семян на метр квадратный, что соответствует одному ряду растений. Под «семьей» понимается потомство одного растения; каждая семья состоит из 120 растений, выросших из семян, собранных с одной метелки. Каждая семья соответствует одному ряду в делянке.

Для выделения ДНК при полевом эксперименте в одну пробирку отбирали по кусочку листа одинакового размера (0,5 см длиной) со всех растений в пределах семьи (рядка). Таким образом, выделение ДНК и последующие этапы ПЦР проводились в группах по 120 растений (семья в ПИП1).

Выделение ДНК

Экстракцию ДНК проводили, используя CTAB-метод (Murray M. G., Thompson W. F., 1980) по следующей схеме.

Образцы вносили в микропробирки и растирали с прогретым до 60 °С 2 × CTAB буфером, содержащим 2 % CTAB (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4М хлористого натрия, 0,1М трис-гидрохлорид, 20мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). При этом соблюдали соотношение 500 мкл буфера на 0,1 г ткани. Образцы инкубировали 4 часа при 60 °С, после чего вносили равный объем хлороформа и инкубировали при перемешивании в течение 20 минут. На следующем этапе образцы центрифугировали 10 минут при 5 тыс. об/мин, отбирали супернатант и добавляли к нему 0,2 V 5 × CTAB буфера, содержащего 5 % CTAB и 350мМ ЭДТА, и инкубировали 10 минут при 60 °С. После инкубации в пробирки с образцами вносили равный объем хлороформа и инкубировали при перемешивании 20 минут, центрифугировали 10 минут при 5 тыс. об/мин, отбирали верхнюю фазу, в чистую пробирку, добавляли равный объем буфера для преципитации (1 % CTAB, 50мМ Трис-HCl, 10мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. После преципитации ДНК осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1М NaCl, 10мМ Трис-HCl, 1мМ ЭДТА), добавляли 1 мл этилового спирта (96 %) и инкубировали при комнатной температуре 2–3 часа. По истечении этого времени, центрифугировали образцы 10 минут при 13 тыс. об/мин после чего осадок промывали 70 % этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 50мкл стерильной дистиллированной воды.

Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-2550PC производства Shimadzu (Япония) по стандартной методике (Маниатис и др., 1984), а также методом разведений полученных препаратов с последующим их электрофорезом в 2 % агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия и визуализацией в ультрафиолете. При этом исходили из того, что порог чувствительности бромистого этидия в агарозных гелях составляет 10 нг ДНК (Остерман Л. А., 1981).

Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводилась наборами для проведения ПЦР (компания Сибэнзим, г. Москва, Россия) в реакционном объеме 25 мкл. Параметры ПЦР смеси: в 25 мкл смеси содержится 0,8 мкг геномной ДНК, IX ПЦР буфер (20мМ Трис-HCl, pH 8,4; 50мМ KCl), 0,1мМ каждого dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфат) и 1 ед. Taq-полимеразы (1,5 ед. Taq-полимеразы в опыте с разведениями ДНК). ПЦР проводилась при следующих условиях: 4 минуты при 94 °С, далее 30 циклов (35 циклов в опыте с разведениями ДНК) (30 сек — 94 °С, 30 сек — Т °С, 30 сек — 72 °С), далее 8 мин — 72 °С. Где Т=62 °С при использовании обеих праймерных пар и 58 °С при исполь-

Таблица 1

Различия между кодирующими последовательностями аллелей гена *Rc**

Номер в базе данных NCBI	Длина последовательности, п. о.	Вид/Подвид	Название сортообразца	Фенотип	Аллель
DQ204735	6442	*Oryza sativa japonica*	H75	коричневый	Rc
DQ204736	6429	*Oryza sativa japonica*	Jefferson	белый	rc
DQ204737	6406	*Oryza rufipogon*	IRGC105491	красный	Rc
DQ204738	6401	*Oryza sativa indica*	Surjamkuhi	розовый	Rc-s

зовании одной праймерной пары в опыте с разведениями ДНК.

Амплификация была проведена в амплификаторе Терцик производства НПО ДНК-технологии, Россия.

Нуклеотидные последовательности

В таблице 2 приведены нуклеотидные последовательности, использованные для разработки и дизайна праймеров при создании внутригенного ДНК-маркера к гену *Rc* окраски перикарпа краснозерного риса, взятые из базы данных www.ncbi.nih.gov.

Затем было проведено сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма «multiple alignment» в программе CLUSTALW (Hall, 1999).

На наличие димеров и петель праймеры анализировались с использованием программы Vector NTI 10.3.0 (Invitrogen, 2006) для операционной системы Windows.

Чтобы исключить возможность амплификации неспецифичных зон ДНК, разрабатываемые нами праймерные пары были предварительно проверены в системе поиска BLAST базы данных www.gramene.org.

Электрофорез

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР использовали 2 % агарозный гель на основе 0,5 × Трис-боратного буфера (0,045 М Трис, 0,045 М Борной кислоты, 1 мМ ЭДТА, pH=8,2). Электрофорез проходил при напряжении 120V в течение 30 минут в камерах для горизонтального электрофореза Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100 фирмы Pharmacia.

Для электрофореза использовали 12,5 мкл реакционной смеси, которую смешивали с 1 мкл неденатурирующего буфера нанесения (40 % сахароза, 0,025 % бромфеноловый синий, 0,025 % ксилен цианол) и наносили в лунки геля под слой электродного буфера. В качестве электродного буфера использовали также 0,5 × Трис-боратный буфер.

После проведения электрофореза гелевые пластины помещали на 20 минут в раствор бромистого этидия (5 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолете.

Схема полевого эксперимента

На рисунке 1 изображена схема полевого эксперимента. Данный опыт предполагает выделение ДНК из всех растений каждой семьи интересующих нас сортов, находящихся в питомнике испытаний потомств первого года (ПИП1). Растения сгруппированы по 120, что соответствует количеству растений в одной семье/рядке. Выделение ДНК, как и последующая ПЦР, происходит в группах из всех 120 растений в одной пробирке. Таким образом, ДНК всех растений одной семьи/рядка объединена в одной пробирке. Соответственно, наличие/отсутствие «бэнда» на электрофореграмме будет указывать не на аллельное состояние целевого гена у конкретного растения семьи, а на наличие/отсутствие краснозерного растения в семье.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После выравнивания нуклеотидных последовательностей аллелей Rc (красный и коричневый перикарп), Rc-s (розовый перикарп) и rc (неокрашенный пери-

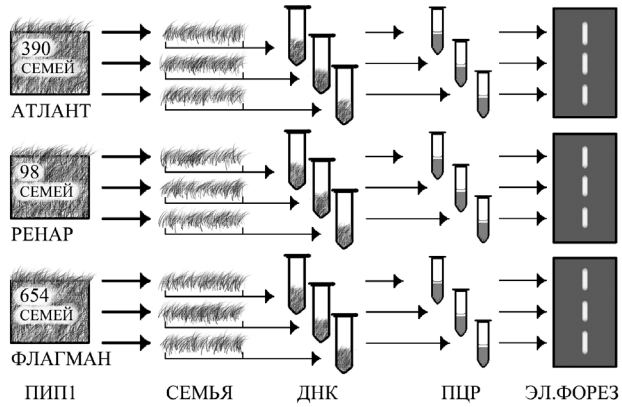

Рис. 1. Схема отбора материала для ДНК-анализа из ПИП1
На рисунке обозначены: ПИП1 — питомник испытаний потомств первого года; семья — один рядок из 120 растений; ДНК — выделение ДНК из всех растений семьи в одной пробирке; ПЦР — полимеразная цепная реакция с ДНК всех растений семьи в одной пробирке; эл. форез — электрофоретическое разделение и визуализация продуктов реакции.

Таблица 3

Характеристики праймерных пар*

Название	F1	R1	F2	R2
Направление синтеза	прямой	обратный	прямой	обратный
Последовательность	GCAAGTGGAACGC-GAAAAGT	TTCCAATGT-TCGTTAGAGGC	ACAACACT-GACACTGAAAGG	GAAATCACCTTG-GATGGCATCC
Длина, п. о.	20	20	20	22
Специфичность к аллели	*Rc/Rcs/Rc+*	*Rc/Rcs/Rc+/rc*	*Rc/Rcs/Rc+/rc*	*rc*
G/C, %	50	45	45	50
Молекулярный вес	6225	6124	6129	6720
Теоретическая температура отжига, °C **	52	50	50	55
Теоретическая температура отжига, учитывая стекинг-взаимодействие, °C ***	57	53	53	56
ΔH ккал/моль	−160	−154	−154	−150
ΔS кал/градус моль × K	−453	−440	−439	−484

* — все расчеты, представленные в таблице, были выполнены на сайте http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html

** — рассчитана по формуле C. W. Dieffenbach et al. (1995): T = 4Co×(G + C) + 2Co×(A + T)−3, где G, C, A, T — количество гуанидиновых, цитозиновых, адениновых и тиминовых оснований соответственно

*** — рассчитана по учитывающей термодинамические свойства формуле SantaLucia J Jr. (1998): $T_m = \frac{\Delta H \frac{ккал}{^oC * Моль}}{\Delta S + R\ln([праймер]/2)} - 273{,}15^oC$, где ΔH — энтальпия стэкинг-взаимодействия оснований с учетом факторов инициации спирали, ΔS — энтропия стэкинг-взаимодействия оснований с учетом факторов инициации спирали и влияния солей на энтропию системы, R — универсальная газовая постоянная (1,987 кал/(моль • K))

```
корич TAC…N(4334)…TCAGGTTCAGACACTAACAACACTGACACTGAAAGGAATTCAGGC 4382
белый TAC…N(4335)…TCAGGTTCAGACACTAACAACACTGACACTGAAAGGAATTCAGGC 4383
красн TAC…N(4290)…TCAGGTTCAGACACTAACAACACTGACACTGAAAGGAATTCAGGC 4338
розов TAC…N(4291)…TCAGGTTCAGACACTAACAACACTGACACTGAAAGGAATTCAGGC 4339
      ***          ****************************************

корич CAG…N(727)  …CGCAAGTGGAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAGGTGATTTCAG 5157
белый CAG…N(727)  …CGCAAGTGGA--------------TGCCATCCAAGGTGATTTCAG 5144
красн CAG…N(727)  …CGCAAGTGGAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAGGTGATTTCAG 5113
розов CAG…N(727)  …CGCAAGTGGAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAGGTGATTTCAG 5114
      ***          **********              *********************

корич ATA…N(350)  …CTTAAGCCTCTAACGAACATTGGAAGAT…N(835)…CAGAATTAA 6382
белый ATA…N(350)  …CTTAAGCCTCTAACGAACATTGGAAGAT…N(835)…CAGAATTAA 6369
красн ATA…N(351)  …CTTAAGCCTCTAACGAACATTGGAAGAT…N(848)…TAA------ 6346
розов ATA…N(351)  …CTTAAGCCTCTAACGAACATTGGAAGAT…N(842)…TAA------ 6341
      ***          ***************************          *
```

Рис. 2. Сайты отжига аллель специфичных праймеров
На рисунке серым цветом выделены места отжига праймеров — F2, F1, R2, R1 соответственно. Стрелками показано направление синтеза

карп), была локализована функциональная делеция из 14 пар оснований (п.о.) аллели rc белозерного риса — ACGCGAAAAGTCGG:

```
коричневый TAC…N(5104)…AAAGGCGCAAGTGGAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAG…N(1211)…TAA
красный    TAC…N(5060)…AAAGGCGCAAGTGGAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAG…N(1221)…TAA
розовый    TAC…N(5061)…AAAGGCGCAAGTGGAACGCGAAAAGTCGGTGCCATCCAAG…N(1215)…TAA
белый      TAC…N(5105)…AAAGGCGCAAGTGGA--------------TGCCATCCAAG…N(1213)…TAA
            ***        **************   14 п.о.   ***********        ***
```

Так как полиморфизм аллелей гена *Rc* заключается не только в обозначенной делеции (см. табл. 1), праймеры должны подбираться таким образом, чтобы их область отжига находилась вне зон мутаций, если только они не были взяты в качестве критерия специфичности при выборе праймеров. В противном случае следует ожидать ложный результат. Разрабатываемый маркер должен обладать высокой спецификой.

При конструировании праймеров уделялось внимание тому, чтобы размер ПЦР-продуктов был приемлем для визуализации их в агарозных гелях, т. к. использование агарозного геля является более удобным и безопасным по сравнению с акриламидным гелем, который токсичен сам по себе и предполагает применение токсичных катализаторов полимеризации.

Учитывая все перечисленные условия, были подобраны подходящие участки ДНК, на которые можно производить отжиг праймеров. Они изображены на рисунке 2.

Таблица 4

Варианты прохождения ПЦР при различных комбинациях праймерных пар и ДНК образцов

	ДНК краснозерных форм риса (гомозиготы по локусу Rc, Rcs или Rc+)	ДНК белозерных форм риса (гомозиготы по локусу rc)	ДНК краснозерного гетерозиготного растения (Rcrc) либо смесь ДНК красно- и белозерных образцов
F1 R1 + F2 R2	Амплифицируется участок доминантной аллели гена *Rc* длиной 422 п. о.; праймер R2 участвовать в реакции не будет, т. к. отсутствует его сайт отжига, соответственно, количество копий участка F2–F1 (см. рисунок 3) будет мизерным	Амплифицируется участок рецессивной аллели гена *rc* длиной 790 п. о.; праймер F1 участвовать в реакции не будет, т. к. отсутствует его сайт отжига, соответственно, количество копий участка R1–R2 (см. рисунок 3) будет мизерным	Амплифицируются участки и доминантной аллели гена *Rc* (длина продукта 422 п. о.) и рецессивной (длина продукта 790 п. о.)
F1 R1	Амплифицируется участок доминантной аллели гена *Rc* длиной 422 п. о.	Амплификации не произойдет, т. к. отсутствует сайт отжига праймера F1	Амплифицирован будет только участок доминантной аллели гена *Rc* длиной 422 п. о.
F2 R2	Амплификации не произойдет, т. к. отсутствует сайт отжига праймера R2	Амплифицируется участок рецессивной аллели гена *rc* длиной 790 п. о.	Амплифицируется участок рецессивной аллели гена *rc* длиной 790 п. о.

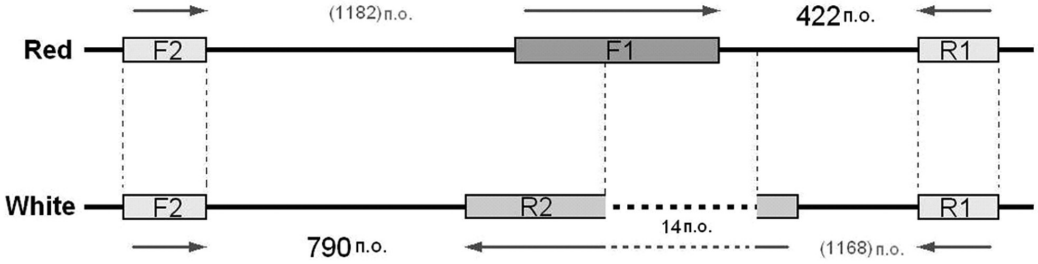

Рис. 3. Принцип работы аллельспецифичных кодоминантных праймеров к гену *Rc*
На рисунке аллели *Rc/Rcs/Rc+* изображены как одна и обозначены *Red,* а под обозначением *White* принята аллель *rc*. Цифры, изображённые чёрным, показывают длину искомого фрагмента — пар оснований (п. о.), а цифры серым — расстояние от F2 до R2 на обеих аллелях. Жирным пунктиром показана делеция в 14 п. о., тонким пунктиром — участки, идентичные между аллелями. Стрелками — направление синтеза

Из рисунка видно, что участки отжига праймеров F2 и R1 не полиморфны, в то время как участок отжига праймера R2 затрагивает делецию аллели rc белозерного риса, а F1 — не полиморфен лишь среди окрашенных фенотипов.

Затем были сконструированы две праймерные пары:
1) F1 — GCAAGTGGAACGCGAAAAGT;
2) R1 — TTCCAATGTTCGTTAGAGGC;
3) F2 — ACAACACTGACACTGAAAGG;
4) R2 — GAAATCACCTTGGATGGCATCC.

Полученные праймеры были проверены на отсутствие комплементарности между 3'-концами, чтобы исключить образование праймер-димеров, и отсутствие внутренних вторичных структур (шпилек). Из таблицы 3 видно, что полученные праймеры имеют в своем составе от 45 % до 50 % гуанидина/цитозина и близкие температуры отжига. Созданные праймеры удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к праймерным парам, необходимым для их эффективной работы.

На рисунке 3 показан принцип работы маркера к гену *Rc*. Два праймера являются аллельспецифичными, а два других — нет.

Из рисунка видно, что в первой паре праймеров — прямом (Forward) и обратном (Reverse), F1 и R1 соответственно, праймер F1 — специфичен аллелям Rc/Rcs/Rc+ коричневого/красного/розового риса, так как в данной точке посадки праймера эти три аллели не проявляют полиморфизма между собой. Но F1 не может отжигаться на аллели rc белозерного риса, так как большая часть F1, а именно 11 пар оснований из 20 — ACGCGAAAAGT, попадает на зону делеции в 14 пар оснований. В тоже время, R1 может отжигаться как на ДНК краснозерного, так и белозерного риса, то есть праймер отжигается на участке, где полиморфизма между всеми четырьмя аллелями гена Rc не выявлено.

Во второй паре, F2 и R2, — F2 не является аллельспецифичным и может отжигаться на всех четырех аллелях гена Rc — белозерных и краснозерных формах риса. R2 является специфичным аллели rc белозерного риса в полиморфном участке (делеция 14 пар оснований у rc аллели) между rc и Rc/Rcs/Rc+ аллелями, то есть R2 не отожжется на аллелях Rc/Rcs/Rc+.

Варианты прохождения ПЦР и ожидаемые длины продуктов реакции описаны в таблице 4.

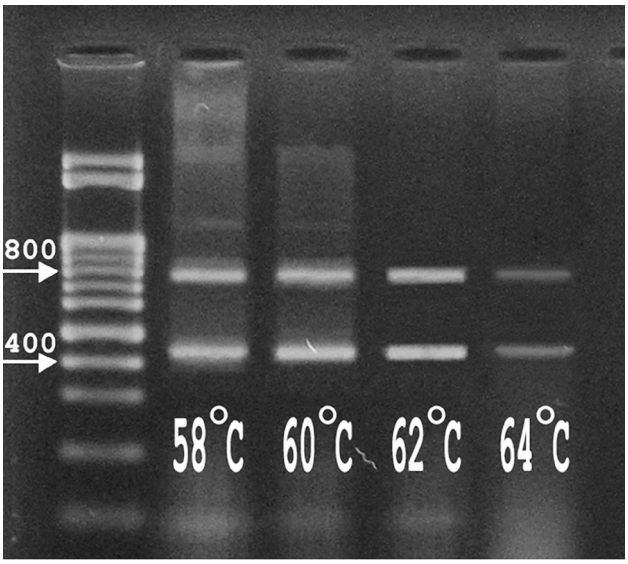

Рис. 4. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации праймерами F1 R1 и F2 R2, полученных с использованием различных температур отжига
На рисунке цифрами 400 и 800 обозначены фрагменты маркера молекулярного веса, соответствующие 400 и 800 парам оснований; в качестве матрицы использовалась смесь ДНК сортов Карат и Хазар в равной пропорции

Из таблицы видно, что в случае постановки ПЦР с обеими праймерными парами (F1 R1 и F2 R2) и с ДНК краснозерного гетерозиготного растения (Rcrc) либо смесь ДНК красно- и белозерных образцов (что возможно при полевом опыте) образуется два продукта реакции разной длины, которые будут визуализироваться в виде двух «бэндов» на агарозном геле. Таким образом, созданный маркер носит кодоминантный характер наследования. Во всех остальных случаях образуется один продукт реакции и один «бэнд» на электрофореграмме.

Температура отжига каждого праймера была рассчитана по стандартным формулам. В реакционной смеси мы использовали смесь праймеров, поэтому окончательная температура отжига праймеров была подобрана нами эмпирически.

Реакционная смесь включала в себя обе праймерные пары F1R1 F2R2 и ДНК сортов Карат (краснозерный) и Хазар (белозерный), смешанные в равной пропорции. Таким образом, мы смоделировали ситуацию, в которой в качестве образца берется ДНК гетерозиготного по гену *Rc* растения (Rcrc). Первоначально при постановке ПЦР были проверены три различные температуры отжига праймеров: 55°C, 60°C и 65°C. При температуре 55°C наблюдалось присутствие большого количества неспецифически амплифицированных фрагментов; при 65°C — практически нет неспецифики, но «бэнды» недостаточно четки. Наиболее эффективно амплификация проходила при температуре 60°C, хотя и наблюдалось некоторое наличие неспецифики.

С целью максимально уменьшить амплификацию неспецифических фрагментов, дополнительно были апробированы следующие температуры отжига — 58°C, 60°C, 62°C и 64°C. Оптимальная температура отжига, обеспечивающая высокий выход амплифицированного продукта наряду с минимальным количеством неспецифики, составила 62°C, что показано на рисунке 4. Эта же температура оказалась оптимальной и для реакционных смесей, содержащих ДНК только белозерных и только краснозерных сортов наряду с праймерными парами F1 R1 и F2 R2.

Была проведена проверка эффективности созданного молекулярного маркера на отечественных сортообразцах риса, контрастных по изучаемому признаку. Результаты представлены на рисунке 5.

Из рисунка видно, что созданный маркер позволяет четко различать аллельные состояния гена *Rc* — доминантное (краснозерность) и рецессивное (белозерность).

Таким образом, эффективность маркера была проверена на 9 образцах белозерного риса и 8 краснозерного. Результаты представлены в таблице 5.

Из таблицы видно, что все изученные сортообразцы, входящие в коллекцию ВНИИ риса, являются гомозиготами по гену окраски перикарпа *Rc*.

После того, как мы подобрали оптимальные условия для амплификации с помощью полученных праймеров доминантной и рецессивной аллелей гена *Rc* было решено определить порог чувствительности разрабатываемой методики для выявления минимальной примеси доминантной аллели в пробе. Для этого было решено поставить ПЦР с различным соотношением ДНК-образцов красно- и белозерного риса и с различными комбинациями праймерных пар в реакционной смеси.

Для экстракции ДНК брали по 0,15 г биомассы бесхлорофилльных семидневных проростков белозерного сорта Павловский и краснозерного Карат. Концентрация выделенной ДНК составила 800 мкг/мл в обеих пробах. После этого ДНК сорта Карат разводили деионизированной водой в 50, 100, 200, 500 и 1000 раз. Затем неразбавленная ДНК сорта Павловский и разбавленная ДНК сорта Карат смешивались 1 : 1, в результате чего получалось соотношение ДНК краснозерного риса к белозерному 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 500, 1 : 1000.

Размер ядерного гаплоидного генома риса, на примере *O. sativa ssp. japonica cv. Nipponbare,* составляет 388,82 миллиона пар нуклеотидов (International Rice Genome Sequencing Project, 2005), соответственно, относительная молекулярная масса генома риса составляет примерно $4{,}19027*10^{-4}$ нг, т. е. 1 нг весят примерно 2386 молекул ДНК.

Таким образом, в матрице, которая бралась для постановки ПЦР в количестве 1 мкл, содержалось:

- в первом варианте — 400 нг ДНК белозерного риса и 8 нг ДНК краснозерного риса (примерно 1 млн. копий генома к 20 тыс. копий генома);

Таблица 5

Проверка эффективности внутригенного маркера гена *Rc* на сортообразцах ВНИИ риса

Образец	Фенотип	Аллель	
		Rc/Rcs/Rc+	*rc*
Виктория	белый	–	+
Виктория-Red	красный	+	–
Карат	красный	+	–
Кубань-3	белый	–	+
Кубань-3-Red	красный	+	–
Павловский	белый	–	+
Павловский-Red	красный	+	–
Привольный	белый	–	+
Привольный-Red	красный	+	–
Рубин	красный	+	–
Снежинка	белый	–	+
Соната	белый	–	+
Соната-Red	красный	+	–
Спринт	белый	–	+
Спринт-Red	красный	+	–
Талисман	белый	–	+
Хазар	белый	–	+

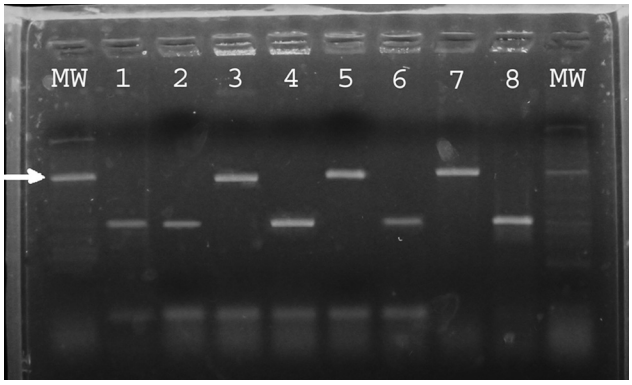

Рис. 5. Аллельные различия гена Rc у краснозерных и белозерных сортообразцов риса
На рисунке цифрами обозначены: 1 — Карат, 2 — Рубин, 4 — Павловский-Red, 6 — Спринт-Red, 8 — Привольный-Red (краснозерные); 3 — Хазар, 5 — Павловский, 7 — Спринт (белозёрные). Латинскими буквами «MW» обозначен маркер молекулярного веса. Фрагмент, на который указывает стрелка, соответствует 800 п. о.

- во втором — 400 нг ДНК белозерного риса + 4 нг ДНК краснозерного риса (примерно 1 млн. копий генома к 10 тыс. копий генома);
- в третьем — 400 нг ДНК белозерного риса + 2 нг ДНК краснозерного риса (примерно 1 млн. копий генома к 5 тыс. копий генома);
- в четвертом — 400 нг ДНК белозерного риса + 0,8 нг ДНК краснозерного риса (примерно 1 млн. копий генома к 2 тыс. копий генома);
- в пятом — 400 нг ДНК белозерного риса + 0,4 нг ДНК краснозерного риса (примерно 1 млн. копий генома к 1 тыс. копий генома).

При постановке ПЦР с разведениями ДНК в присутствии обеих пар праймеров F1 R1 и F2 R2 — к доминантной и рецессивной аллели гена — и температуре отжига, подобранной ранее (62 °C), участок доминантной аллели гена *Rc* четко визуализировался лишь на дорожке геля, в которой находился контроль (в реакционной смеси неразбавленная ДНК краснозерного сорта Карат). Как изображено на рисунке 6, также присутствовал едва заметный «бэнд», соответствующий участку доминантной аллели в разведении Карат/Павловский 1:50. Во всех остальных случаях доминантная аллель не идентифицировалась. Рецессивная аллель четче всего визуализировалась на дорожке с контролем (неразбавленная ДНК сорта Павловский), в разведениях присутствовал достаточно яркий целевой «бэнд», но наблюдалось некоторое количество неспецифически амплифицированных фрагментов, несколько тяжелее целевого «бэнда».

Данный эксперимент был повторен при температурах 60 °C и 64 °C. В первом случае увеличивалось количество неспецифики, во втором — доминантная аллель визуализировалась исключительно на дорожке контроля.

С целью поиска оптимальных условий для идентификации доминантной аллели гена *Rc* при различных разведениях, было решено поставить ПЦР, используя при этом одну пару праймеров F1 R1, идентифицирующих доминантную аллель гена *Rc,* при температуре 62 °C.

В этом случае наиболее четко визуализировался «бэнд» на дорожке положительного контроля, но также были различимы «бэнды» доминантной аллели в разбавлениях в 50 и 100 раз. Яркость последнего была не достаточна.

В связи с тем, что с уменьшением температуры отжига праймеров специфичность реакции уменьшается,

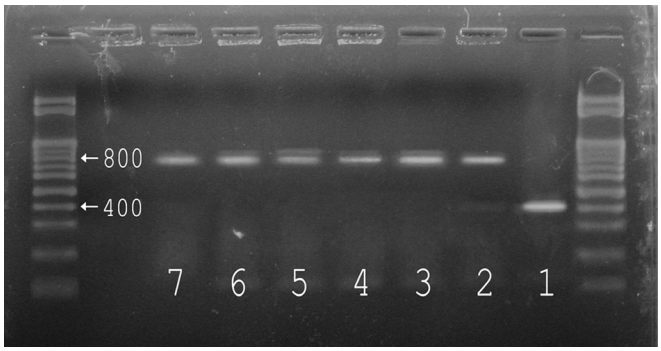

Рис. 6. Определение чувствительность праймеров F1 R1 и F2 R2 при идентификации доминантной аллели гена *Rc* в смеси ДНК контрастных по изучаемому признаку сортов риса.
На рисунке цифрами обозначены: 1 — контроль — красный сорт Карат; 2 — Карат/Павловский (белый) 1:50; 3 — Карат/Павловский 1:100; 4 — Карат/Павловский 1:200; 5 — Карат/Павловский 1:500; 6 — Карат/Павловский 1:1000; 7 — контроль — Павловский. Фрагменты маркера молекулярного веса размером 400 и 800 п. о. обозначены соответствующими цифрами

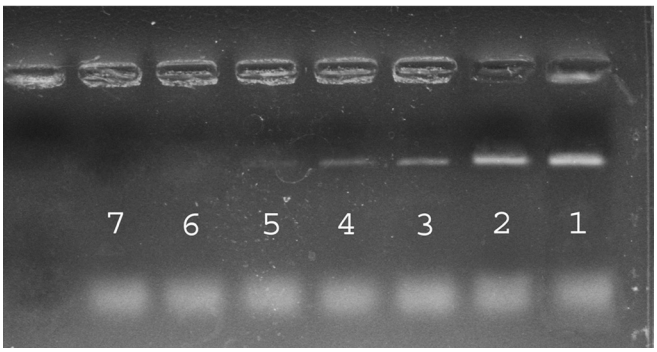

Рис. 7. Определение чувствительности праймеров F1 R1 при температуре отжига 58 °С для идентификации доминантной аллели гена *Rc* в смеси ДНК контрастных по изучаемому признаку сортов риса
На рисунке цифрами обозначены: 1 — контроль — красный сорт Карат; 2 — Карат/Павловский (белый) 1:50; 3 — Карат/Павловский 1:100; 4 — Карат/Павловский 1:200; 5 — Карат/Павловский 1:500; 6 — Карат/Павловский 1:1000; 7 — контроль — Павловский

но праймерам легче «найти» комплиментарное место отжига, было решено произвести поиск минимальной температуры, при которой будет сохраняться специфичность реакции при максимальной разрешающей способности метода. Эксперимент повторили при следующих температурах отжига праймеров — 60 °С, 58 °С и 56 °С, увеличив при этом и количество циклов реакции с 30 до 35.

При температуре отжига 60 °С наряду с контролем четко визуализировались «бэнды» доминантной аллели в разбавлениях в 50 и 100 раз. Появился «бэнд» аллели в разбавлении в 200 раз, но он визуализировался очень плохо. Его четкость стала приемлемой при понижении температуры до 58 °С. При температуре отжига 56 °С появлялось значительное количество неспецифически амплифицированных фрагментов на всех дорожках.

Таким образом, оптимальная температура отжига праймеров F1 R1 при выявлении доминантных аллелей гена Rc в разбавлениях вплоть до 200 раз при 35 циклах ПЦР составила 58 °С, что показано на рисунке 7.

Из рисунка видно, что при соотношении ДНК краснозерного риса к ДНК белозерного вплоть до 1 : 200 ПЦР-продукт четко визуализировался в виде различимого «бэнда» на агарозном геле. При разведении 1 : 500 с уверенностью о наличии «бэнда» сказать уже сложно, а при разведении 1 : 1000 — он явно отсутствует.

Таким образом, разработанный маркер способен точно выявить одно краснозерное растение в группе из 200 образцов.

В результате полевого опыта, проведенного в питомнике испытания потомств первого года (ПИП1) сортов Атлант, Ренар и Флагман, ни в одной из изученных семей не было обнаружено доминантной аллели гена Rc. Результаты проверки восемнадцати семей сорта Ренар представлены на рисунке 8.

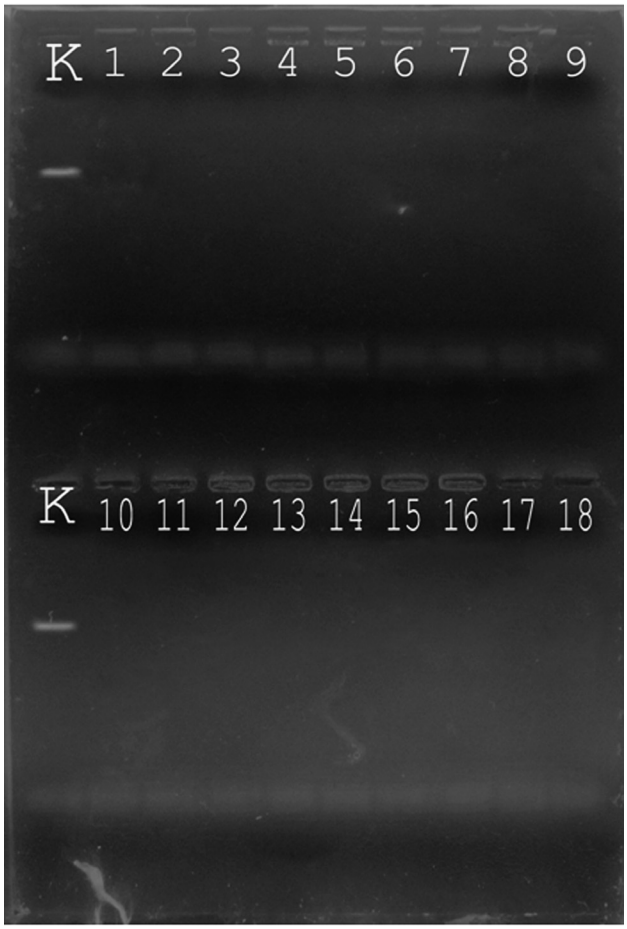

Рис. 8. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации праймеров F1 R1 при ДНК анализе растений сорта Ренар из ПИП1.
Буквой «К» обозначен положительный контроль — сорт Карат, цифрами от 1 до 18 — семьи сорта Ренар

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами разработан кодоминантный маркер, позволяющий, начиная с ранних стадий развития растения, выявлять его генотип в отношении аллелей гена *Rc*.

Созданная в данной работе маркерная система может работать при использовании как обеих пар праймеров, так и при использовании каждой пары в отдельности. Критерием выбора праймеров являются задачи анализа.

Если необходимо провести анализ каких-то определенных растений, например, при планировании комбинаций скрещивания или отборе гомозиготных растений по признаку краснозерности, целесообразно использовать обе пары праймеров. Это позволит, в случае обнаружения гена окраски перикарпа, определить и его аллельное состояние.

Если необходимо провести скрининг большого количества растений с целью выявить в группе краснозерное, например, в питомниках первичных звеньев семеноводства, где информация об аллельном состоянии изучаемого гена не будет важна, целесообразней использовать только праймерную пару F1 R1. В этом случае, при постановке ПЦР с ДНК группы растений, в которой белозерные растения будут количественно в десятки раз доминировать над краснозерными, можно предположить, что визуализация продуктов реакции не будет затруднена вследствие численного превосходства ампликонов праймеров F2 R2, которое возникает при использовании обеих праймерных пар. К тому же, использование только пары праймеров F1 R1 упростит интерпретацию результатов, т. к. критичным будет являться наличие/отсутствие «бэнда» на электрофореграмме, а не его локализация.

В соответствии с ГОСТ Р 52325-2005, в посевах оригинальных и элитных семян риса не допускаются краснозерные формы. В репродукционных и репродукционных товарных семенах примесь таких форм риса не должна превышать соответственно 0,5 % и 1,0 % (п. 4.2.5).

В условиях производственных посевов риса массовый ПЦР-анализ не представляется возможным и целесообразным. С другой стороны, произвести отбор образцов с каждого растения в пределах отдельной делянки, если дело касается, например, питомника испытания потомств, вполне возможно. Соответственно, предлагаемая нами методика предполагает выделение ДНК из общей биомассы отобранных листьев (в онтогенезе растения — стадия второго-третьего настоящего листа) всей семьи с последующей постановкой ПЦР и электрофореза.

В случае обнаружения гена краснозерности в исследуемой группе (семье) растений эта группа полностью элиминируется из питомника испытания потомств первого года (ПИП1). Если же необходимо точно идентифицировать краснозерное растение, проводится ПЦР-анализ каждого растения делянки.

Опыты со смешиванием ДНК краснозерных и белозерных форм риса в различных пропорциях показали, что разработанная методика выявления краснозерных форм в посевах риса до выметывания метелок способна обнаружить одно краснозерное растение, несущее доминантную аллель гена краснозерности Rc, из двухсот белозерных, что соответствует краснозерной примеси равной 0,5 %. Данный процент примеси, согласно ГОСТ Р 52325-2005, является максимально допустимым в репродукционных семенах.

Проведенное исследование способствует повышению эффективности процесса первичного семеноводства риса, так как созданный молекулярный маркер поможет упростить и ускорить скрининг генетической плазмы на наличие гена краснозерности риса *Rc* на любом этапе селекционно-семеноводческой работы и, тем самым элиминировать нежелательные генотипы из дальнейшего размножения. Так же, использование созданного маркера может быть полезным при планировании комбинаций скрещивания или отборе гомозиготных растений по признаку краснозерности.

Литература

1. ГОСТ 6293-90, 2008. Рис. Требования при заготовках и поставках. Дата введения 01.07.91 г. Официальное издание. Москва, Стандартинформ.
2. ГОСТ Р 52325-2005. Семена сельскохозяйственных растений. Сортовые и посевные качества. Общие технические условия. Дата введения — 2006-01-01. Официальное издание. Москва, Стандартинформ, 2005.
3. *Апрод А. И., Гненная В. В., Зинник А. Н.,* 1986. Комплексная система эффективных мер борьбы с краснозёрными формами риса. Рекомендации. — Краснодар: Агропромышленный комитет Краснодарского края, ВАСХНИЛ, ВНИИ риса, 19 с.
4. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.,* 1984. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480с.
5. *Остерман Л. А.* 1981 Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981. 288 с.
6. *Brooks S. A., Yan W., Jackson A. K., Deren C. W.,* 2008. A natural mutation in rc reverts white-rice-pericarp to red and results in a new, dominant, wild-type allele: Rc-g // Theor. Appl. Genet Vol. 117. P. 575–580.
7. *Dieffenbach C. W., Lowe T. M., Deksler G. S.,* 1995. General Concepts for PCR Primer Design // Nucleic Acids Res. Vol. 18. P. 999–1005.
8. *Hall T. A.,* 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acid Symposium. Ser. 41. P. 95-98.
9. International Rice Genome Sequencing Project, 2005. The map-based sequence of the rice genome // Nature. Vol. 436. P. 793–800.

10. *Murray M. G., Thompson W. F.,* 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research. Vol. 10. P. 4321–4325.
11. *Nagao S., Takahashi M. E.* 1962. Genetical studies on rice plants/XXVI. Mode of inheritance and casual genes for one type of anthocyanin color character in foreign rice varieties / J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. Vol. 52. P. 20–50.
12. *Kato S., Ishikawa, J.,* 1921. On The Inheritance of the Pigment of Red Rice. Japan: Japan Genetic, 1. Vol. 1. P. 1–7.
13. *Kondo A.,* 1961. Fundamental studies on rice breeding through hybridization between Japanese and foreign varieties // V. Genetical studies on seed-coat color, etc. // Jap. Jour. Genet. Vol. 36. P. 276-284.
14. *SantaLucia J. Jr.,* 1998. A Unified View of Polymer, Dumbbell, and Oligonucleotide DNA Nearest-Neighbor Thermodynamics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, P. 1460-1465.
15. *Sasaki R.,* 1922. Inheritance of rice blast resistance // J. Genet. Vol. 1. P. 81–85.
16. *Sweeney M. T., Thompson M. J., Pfeil B. E., McCouch S.,* 2006. Caught Red-Handed: Rc Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Protein Conditioning Red Pericarp in Rice // The Plant Cell. Vol. 18. P. 283–294.
17. *Takahashi M., Mori T., Kinoshita T., Mori K.,* 1972. Genetic constitution on red coloration in rice grains of an Indian variety, Surjamkhi // Genetical studies on rice plant, L. Res. Bull. Univ. Farm. Hokkaido Univ. Vol. 18. P. 47–53.
18. World Agricultural Supply and Demand Estimates WASDE-486//United States Department of Agriculture, World Agricultural Outlook Board, September 10, 2010, p. 24.

DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKER FOR ASSESSMENT OF INTRASPECIFIC POLYMORPHISM OF *RC* GENE CONDITIONING RED PERICARP IN RICE *ORYZA SATIVA L.*

Tokmakov S. V., Mukhina Zh. M., Bogomaz D. I., Matveeva T. V.

❀ **SUMMARY: Red rice is the worst field weed in all rice-cultivation areas. Early diagnosis of red rice in primary seed breeding program is an overriding task, which solution directly influences the quality of the rice seeds. Red and red-brown colors of pericarp are determined by two loci at least: *Rc* and *Rd*, expressing in conjunction with the *Rc* gene. In this study we have developed an intragenic codominant molecular marker for the *Rc* gene and tested it with contrasting as to the seed colour rice varieties examined feature. The efficacy of the marker has been shown for 1142 families of rice, each sample containing 120 plants.**

❀ **KEY WORDS:** red rice; *Rc* gene; molecular marker; PCR; electrophoresis.

❀ Информация об авторах

Токмаков Сергей Вячеславович — аспирант. Всероссийский научно-исследовательский институт риса. 350920 г. Краснодар, п. Белозерный. E-mail: ad-a-m@mail.ru.

Мухина Жанна Михайловна — к. б. н. ФГОУ «Краснодарский региональный институт агробизнеса». 350061, Россия, г. Краснодар, ул. им. Мачуги В. Н. E-mail: agroplazma@gmail.com.

Богомаз Денис Иванович — начальник отдела, к. б. н. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9. E-mail: bogomazden@mail.ru.

Матвеева Татьяна Валерьевна — к. б. н., доцент. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9. E-mail: radishlet@yahoo.com.

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich — PG student. All Russian Rice Research Institute. 350920, Belozerny, Krasnodar. E-mail: ad-a-m@mail.ru.

Mukhina Zanna Mikhailovna — c. b. s. Krasnodar, Russia, FSEI "Krasnodar's regional institute of agrobusiness", 350061, 78 Machugi V. N. st., Krasnodar. E-mail: agroplazma@gmail.com.

Богомаз Денис Иванович — head of dep., c. b. s. St. Petersburg State University. 199034, 7/9 Yniversitetskaya Naberezhnaya st., Saint Petersburg, Russia. E-mail: bogomazden@mail.ru.

Матвеева Татьяна Валерьевна — c. b. s., associate professor. St. Petersburg State University. 199034, 7/9 Yniversitetskaya Naberezhnaya st., Saint Petersburg, Russia. E-mail: radishlet@yahoo.com.