

# Молекулярное маркирование признаков, определяющих качество зерна у российских сортов риса

Ю.К. Гончарова , Е.М. Харитонов, Е.А. Малюченко, Н.Ю. Бушман

Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, Россия

В России ранее выращивали только низкоамилозные короткозерные сорта риса, но в последнее время в связи с ростом культуры потребления этого злака назрела необходимость создания отечественных сортов с различными характеристиками качества зерна. Несмотря на значительное число зарубежных работ по локализации генов, определяющих качество зерна риса, до сих пор нет аналогичных российских работ, что сдерживает темпы селекции данного направления. Целью нашего исследования стало выявление участков хромосом, несущих гены, определяющие признаки качества у отечественных сортов риса, и оценка пригодности использования маркерных локусов, идентифицированных в исследованиях зарубежных образцов, при работе с отечественным генофондом. В работе участвовали как нейтральные, так и связанные с признаками качества маркеры. С использованием 57 SSR-маркеров изучен полиморфизм отечественных сортов риса, контрастных по признакам «масса 1000 зерен», «стекловидность», «пленчатость» и «содержание целого ядра в крупе». Показано, что 12 изученных маркеров достоверно разделяли группы с различной формой зерновки, три маркера – с различным выходом целого ядра, и по одному маркеру – группы с различной стекловидностью и пленчатостью. Маркеры, достоверно разделяющие группы сортов с различной массой 1000 зерен, выходом крупы, содержанием белка, амилозы, не выявлены. Для семи хромосомных регионов, на которых расположены маркеры RM3276, RM5707, RM5508, RM7110, RM509, RM600, RM136, ассоциация с какими-либо признаками качества выявлена впервые. Возможно, в них расположены гены, определяющие качество зерна риса, которые специфичны для отечественных сортов.

Ключевые слова: рис; качество зерна; молекулярное маркирование; амилоза; содержание белка; форма зерновки; выход целого ядра; стекловидность.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Малюченко Е.А., Бушман Н.Ю. Молекулярное маркирование признаков, определяющих качество зерна у российских сортов риса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):79-87. DOI 10.18699/VJ18.334

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Goncharova J.K., Haritonov E.M., Maljuchenko E.A., Bushman N.J. Genetics of the traits defining the quality of Russian rice varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018; 22(1):79-87. DOI 10.18699/VJ18.334 (in Russian)

## Genetics of the traits defining the quality of Russian rice varieties

J.K. Goncharova , E.M. Haritonov, E.A. Maljuchenko, N.J. Bushman

All-Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Russia

In Russia, only low amylose short grain varieties were previously grown, but recently, because of the growth of consumption of this cereal, domestic varieties with various quality have become necessary. Absence of information on the genetics of this trait constrains selection in the given direction. Despite a considerable number of foreign works on localisation of genes defining quality of rice grain, there are no similar Russian works yet. Definition of the possibility of using loci identified from studying foreign samples, for marker assisted selection of domestic germplasm became the purpose of our research and possible localisation before the unknown loci defining the quality of rice grain. We used both neutral markers and those associated with quality. Polymorphism of the allocated groups of varieties with the contrasting quality trait was studied using 57 markers. Polymorphism of domestic varieties of rice with contrasting quality traits such as "weight of 1000 grains", "translucency", "husk content", "the maintenance of the whole kernel in a croup" was studied with use of the SSR markers to reveal chromosomal regions associated with the division of Russian rice varieties into groups based on the traits being studied. It was shown that 12 markers authentically divided groups with the various grain form, 3, with a various exit of the whole kernel, and 1 marker group, with various translucency and husk content. The markers authentically dividing groups of varieties with various weight of 1000 grains, groats exit, the protein and amylose content were not revealed. Data about the association of markers RM3276, RM5707, RM5508, RM7110, RM509, RM600, RM136 with the quality trait in references were not revealed. Probably, the genes defining the quality of rice grain, specific for domestic germplasm, are located around the given markers.

Key words: rice; quality of grain; molecular marking; amylose; protein content, form of grain; exit of whole kernel; translucency.

Развитие международного рынка экспорта риса (*Oryza sativa* L.) диктует необходимость создания сортов с заданными свойствами качества (Улитин и др., 2012; Костылев и др., 2013). В России ранее выращивались только низкоамилозные короткозерные сорта подвита *japonica*. В последнее время, в связи с ростом культуры потребления этого злака, назрела необходимость создания отечественных сортов различного качества, пригодных как для приготовления суши и плова, так и для детского и диетического питания. Сорта первого направления, имеющие высокое содержание амилозы, в основном относятся к подвиду *indica*, но могут принадлежать разным видам (Гончарова, Харитонов, 2012). Глютинозные сорта второго направления тоже могут относиться к различным видам и подвидам риса (Ляховкин, 1992; Костылев и др., 2017). Для диетического питания создают сорта риса с окрашенным перикарпом и высоким содержанием микроэлементов (в 5–8 раз выше, чем у белозерных) и антиоксидантов (более чем в 20 раз выше, чем у сортов с неокрашенным перикарпом); они также принадлежат разным видам и подвидам риса (Zhang et al., 2010; Guo, 2011; Kushwaha, 2016).

У производителя и массового потребителя отношение к ассортименту продукции из риса различно и не всегда совпадает. Для производителя важно получить максимальный объем рисопродукта из сырья, что определяется размерами зерновки, ее формой и технологическими свойствами: трещиноватостью, стекловидностью, пленчатостью, выходом целого ядра (Коротенко и др., 2004; Туманьян и др., 2013, 2014). Потребителю необходим рисопродукт с привлекательным внешним видом (масса 1000 зерен, форма зерновки), высокими пищевыми достоинствами, для определенного вида кулинарных изделий (Туманьян и др., 2015). Только сорта, сочетающие в себе все вышеперечисленные критерии качества, получают широкое распространение в производстве. Поэтому селекционеры особое внимание уделяют поиску источников, позволяющих сократить сроки создания новых сортов с высокими показателями по признакам качества. Выявление молекулярных маркеров, связанных с признаками качества, определяет возможность использования маркерной селекции для ускорения работ (Xing et al., 2002).

Большинство отечественных сортов создано при гибридизации сортов подвидов *indica* (выращиваются на юге Китая, в Индии, Таиланде, Вьетнаме и т. д.) и *japonica* (Япония, Корея, север Китая, Италия). Ценными источниками для улучшения признаков качества подвита *japonica*, выращиваемого в России, могут служить межвидовые и межподвидовые гибриды риса (Ляховкин, 1992; Харитонов, Гончарова, 2013). Так, африканский вид риса *Oryza glaberrima* является ценным донором генов, улучшающих как технологические, так и потребительские свойства новых сортов риса (Blight et al., 1999). Ценные аллели могут быть получены при гибридизации с такими дикими видами риса, как, например, *O. rufipogon* или *O. longistaminata*. Многие современные сорта созданы при интрогрессии генов различных дикорастущих видов риса в высокопродуктивные образцы (Костылев, 2011).

Гены, определяющие признаки качества у различных видов риса, часто расположены в одних и тех же хромо-

сомных регионах. Маркирование популяции, полученной при гибридизации *O. sativa* × *O. glaberrima*, позволило установить 27 локусов количественных признаков (QTL), связанных с девятью признаками качества (Aluko et al., 2004). Особенно ценно, что гены, связанные с содержанием амилозы и белка, были идентифицированы на тех же хромосомах, что и при маркировании внутривидовых и межподвидовых гибридов (Cai et al., 2015). QTL для признаков «выход целого ядра», «выход крупы» были иными (Wan et al., 2006). Пять локусов определяли пленчатость образцов, семь – улучшали такие признаки, как «выход крупы», «содержание белка», «отношение длины к ширине зерновки».

Длина зерновки играет важную роль в проявлении таких признаков качества, как «выход крупы», «выход целого ядра», определяет кулинарные и потребительские свойства. Значение признака контролируется шестью основными локусами и двенадцатью с эпистатическими эффектами (Xing et al., 2002). Наиболее стабильным из них в различных условиях среды был ген *qGL-3a*, локализованный на хромосоме 3 между маркерами RMw357 и RMw353 с расстоянием 87.5 kb. Длинная зерновка определяется рецессивным аллелем этого гена (Xing et al., 2002). Условия среды (температура, минеральное питание, засоление) значительно влияют на признаки качества (содержание амилозы, белка и т. д.), что необходимо учитывать при фенотипировании образцов риса (Гончарова и др., 2003). К сожалению, несмотря на значительное число зарубежных исследований по локализации генов, связанных с формированием качества зерна риса, до сих пор нет аналогичных российских работ. Отсутствие информации о генетике признаков качества сдерживает темпы селекции данного направления.

Целью нашего исследования стало выявление хромосомных регионов, на которых расположены гены, определяющие признаки качества у отечественных сортов риса, и оценка пригодности использования маркерных локусов, идентифицированных в исследованиях зарубежных образцов, при работе с отечественным генофондом.

## Материалы и методы

В лаборатории качества ФГБНУ «ВНИИ риса» при передаче сорта на Госсортоиспытание в течение трех лет по стандартным методикам изучают ряд признаков, характеризующих качество зерна (Сметанин и др., 1972; Казаков, 1987; Туманьян и др., 2013, 2014). Полученные данные заносят в каталоги и базы данных, в которых собирается вся информация о коллекционных образцах (Каталог..., 2016).

Анализ баз данных отечественных образцов позволил нам разделить их на группы по признакам качества: форма зерновки (короткозерные, среднезерные, длиннозерные); пленчатость, выход целого ядра, стекловидность, масса 1000 зерен, содержание амилозы, содержание белка. Оценку признаков качества образцов проводили по общепринятым методам (Аниканова, Тарасова, 1988; Кешаниди, Казаков, 1985). В качестве материала для исследования были использованы районированные и перспективные сорта российской селекции из коллекции ФГБНУ «ВНИИ риса», которые в соответствии с признаками качества

**Table 1.** Grain quality grouping of varieties bred in Russia

Group	Group name	Trait range	Variety
Grain shape (length : width)			
1	Short-grain	1.7–2.1	Liman, Rapan, Khazar, Viola, Sadko, Druzhnyy, Atlant, Garant, Flagman, Boyarin, Zhemchug, Kasun, Yupiter
2	Medium-grain	2.2–2.5	Khankayskiy 429, Novator, Regul, Yantar, Lider, Ametist, Sprint, Fontan, Kurchanka, Anait, Pavlovskiy, Dal'nevostochnyy
3	Long-grain	2.6–4.2	Serpantin, Snezhinka, Sharm, Izumrud, Nartsiss, Fabel
Grain vitreousness, %			
1	Low	0–62.9	Viola, Sprint
2	Medium	63.0–92.9	Atlant, Boyarin, Liman, Ametist, Druzhnyy, Pavlovskiy, Nartsiss, Yupiter, Fabel, Sadko, Rapan, Lider
3	High	93.0 – 100.0	Khankayskiy 429, Garant, Novator, Serpantin, Regul, Yantar', Khazar, Snezhinka, Sharm, Flagman, Izumrud, Zhemchug, Kasun, Fontan, Dal'nevostochnyy, Kurchanka
Dry weight of 1000 grains, g			
1	Small grain	22.0–26.9	Khazar, Druzhnyy, Snezhinka, Izumrud, Sharm, Zhemchug
2	Medium grain	27.0–29.9	Flagman, Khankayskiy 429, Liman, Garant, Novator, Serpantin, Regul, Yantar', Rapan, Lider, Ametist, Viola, Fontan, Kurchanka, Boyarin, Nartsiss, Sprint, Sadko, Kasun, Yupiter, Dal'nevostochnyy, Atlantnka, Боярин, Нарцисс, Спринт, Садко, Касун, Юпитер, Дальневосточный, Атлант
3	Large grain	30.0–44.0	Fabel, Pavlovskiy, Anait
Whole grain content in milled rice, %			
1	Low	45.0–76.9	Serpantin, Druzhnyy, Anait, Izumrud, Zhemchug, Viola, Atlant
2	Medium	77.0–90.9	Khankayskiy 429, Liman, Novator, Yantar', Fontan, Regul, Khazar, Druzhnyy, Snezhinka, Atlant, Sharm, Sadko, Rapan, Pavlovskiy, Boyarin, Nartsiss, Kasun, Yupiter, Fabel, Dal'nevostochnyy
3	High	91.0–97.0	Flagman, Ametist, Kurchanka, Garant, Sprint, Lider
Hull percentage			
1	Low	15.9–16.9	Khankayskiy 429, Yantar', Druzhnyy, Pavlovskiy, Viola, Yupiterp
2	Medium	17.0–18.5	Garant, Serpantin, Boyarin, Regul, Lider, Sprint, Fontan, Atlant, Novator, Kurchanka, Snezhinka, Izumrud, Flagman, Kasun, Fabel, Dal'nevostochnyy, Sharm, Ametist
3	High	18.6–19.0	Rapan, Novator, Khazar, Anait, Zhemchug, Nartsiss

были разделены на три группы: с максимальным, минимальным и промежуточным значением признака (табл. 1).

Был изучен полиморфизм выделенных групп сортов, контрастных по признакам качества, с использованием 57 SSR-маркеров, распределенных по 12 хромосомам риса. В работе использовали как нейтральные, так и связанные с признаками качества маркеры (Akagi et al., 1996). Для анализа выбирали маркеры со значительной разницей в размерах продуктов амплификации у контрастных по признаку образцов. Информация о маркерах, использованных в работе, получена на сайте [www.gramene.org](http://www.gramene.org), где имеются данные об ориентировочном размере ПЦР-продуктов, рекомендуемой температуре плавления, ассоциации маркеров с признаками. Количество маркеров на хромосому варьировало от двух (на 3-й, 10-й, 11-й и 12-й хромосомах) до девяти (на 4-й и 5-й). На 1-й, 7-й и 9-й хромосомах расположено по четыре маркера; на 6-й и 8-й – по шесть (табл. 2).

При молекулярном маркировании использовали 32 российских сорта: Ханкайский, Садко, Приморский, Лиман, Гарант, Павловский, Рапан, Новатор, Серпантин, Боярин,

Регул, Янтарь, Жемчуг, Лидер, Хазар, Амелист, Нарцисс, Дружный, Спринт, Виола, Дальневосточный, Фонтан, Касун, Юпитер, Атлант, Курчанка, Факел, Снежинка, Шарм, Анаит, Флагман, Изумруд.

ДНК риса выделяли из этиолированных проростков и листьев с помощью СТАВ-метода в различных модификациях. Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) и визуализацию продуктов амплификации проводили по методике Международного института риса (Murray, Thompson, 1980). Параметры ПЦР, использованные в данном эксперименте: 5 мин при 94 °С – начальная денатурация; следующие 35 циклов: 1 мин – денатурация при 94 °С, 1 мин – отжиг праймеров при 55 °С, 2 мин – синтез при 72 °С; последний его цикл – 7 мин при 72 °С. ПЦР-смесь включала: 40 нг ДНК (2 мкл), 1 мкл (1 мМ) дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 3.7 мкл H<sub>2</sub>O, 1 мкл буферного раствора, по 0.5 мкл (5 мкМ) каждого праймера, 1 мкл (1.5 ед.) Taq-полимеразы, в общем объеме 10 мкл. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 8 % полиакриламидном геле при напряжении 100 В. Для однофакторного дисперсионного анализа

**Table 2.** Distribution of markers employed in the study over rice chromosomes

Chromosome	Number of markers	Markers
1	4	RM104, RM259, RM600, RM5638
2	7	RM53, RM154, RM240, RM318, RM322, RM2770, RM5707
3	2	RM227, RM347
4	9	RM24, RM127, RM140, RM255, RM261, RM335, RM3276, RM6314, RM7187
5	9	RM13, RM30, RM289, RM405, RM440, RM509, RM574, RM5361, RM6024
6	6	RM141, RM162, RM276, RM588, RM5371, RM6811
7	4	RM82, RM542, RM5508, RM7110
8	6	RM25, RM126, RM256, RM284, RM3155, RM8243
9	4	RM242, RM245, RM444, RM7048
10	2	RM258, RM590
11	2	RM286, RM3428
12	2	RM463, RM6410

использовали относительный размер продукта амплификации при работе с соответствующим маркером. За единицу принимали размер продукта амплификации у образца с минимальным его значением, остальные аллели обозначали в соответствии с увеличением размера продукта амплификации. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0.

## Результаты

При изучении российских сортов по 57 SSR-маркерам, распределенным по геному риса, выявлен полиморфизм по многим из них. Дисперсионный анализ по достоверности разделения групп, контрастных по признакам качества, с использованием SSR-маркеров показал, что 12 из изученных маркеров достоверно разделяли группы сортов с различной формой зерновки, три маркера – группы с различным выходом целого ядра, и по одному маркеру достоверно разделяли группы с различной стекловидностью и пленчатостью (табл. 3).

Маркеры, позволяющие достоверно разделить группы сортов с различной массой 1000 зерен, разным выходом крупы, содержанием белка, амилозы, не выявлены. Выделены маркеры, с использованием которых изучаемые группы сортов достоверно разделяли по признаку «форма зерновки»: RM574, RM347, RM53, RM162, RM240, RM509, RM25, RM3276, RM5707, RM5508. По признаку «выход целого ядра» позволяли достоверно разделить группы сортов маркеры RM162, RM286 и RM600. По признакам «стекловидность эндосперма» и «пленчатость» зерновки риса для разделения групп можно использовать только маркеры RM289 и RM7110 соответственно.

Нами проведено сравнение локализации выявленных маркеров, с использованием которых изучаемые группы российских сортов достоверно разделялись по признакам, с локализацией ранее описанных генов и QTL (табл. 4). Установлено, что в районах локализации большинства выделенных нами маркеров ранее уже были выявлены локусы, контролирующие признаки качества риса (Bao et al., 2002a, b; Aluko et al., 2004; Wan et al., 2006). Несмотря на продемонстрированную с помощью дисперсионного

анализа связь маркеров с признаками качества, эффективность их применения для разделения групп различна, так как большинство выделенных маркеров разделяет не все изучаемые группы сортов.

По форме зерновки (среднезерные, длиннозерные, короткозерные) группы отечественных сортов достоверно можно разделять с помощью 12 маркеров, однако только некоторые из них позволяли достоверно различать все выделенные по форме зерновки группы сортов. Связь маркера RM574 с таким признаком качества, как вязкость геля, была отмечена и ранее (Bao et al., 2002a). Вязкость геля зависит от содержания амилозы в образце, высокоамилозные образцы для приготовления плова – это, как правило, длиннозерные сорта подвида *indica*. Маркер расположен на хромосоме 5, и его использование позволяет достоверно разделить все три группы сортов: группа среднезерных сортов по размеру продуктов амплификации занимает промежуточное положение между короткозерной и длиннозерной группами (рис. 1).

Маркер RM347, расположенный на хромосоме 3 и связанный с признаком «растворение в щелочи» (Cai et al., 2015), не позволяет достоверно разделить среднезерные и длиннозерные сорта риса. Маркер RM25, локализованный на хромосоме 8, позволяет достоверно разделить коротко- и среднезерные образцы. Он сцеплен с генами, отвечающими за признаки «масса 1000 зерен», «выход целого ядра», «объем корня», «количество выполненных зерен» (Cui et al., 2002a). Маркер RM53, связанный с признаками «растворение в щелочи», «масса 1000 зерен», «продолжительность приготовления крупы» (Bao et al., 2002b), расположен на хромосоме 2 и достоверно разделяет коротко- и среднезерные группы отечественных сортов, длиннозерная группа сортов достоверно по размеру продуктов амплификации от них не отличается.

Маркер RM162 локализован на хромосоме 6. Ранее была выявлена его связь с генами, определяющими вязкость геля, выход целого ядра, содержание амилозы, растворение в щелочи, содержание протеина, длину зерновки, отношение длины зерна к ширине (Bao et al., 2002a; Cui et al., 2002a, b). Он позволяет достоверно выделить две груп-



**Table 3.** Analysis of variance proving the correctness of the grouping of varieties with SSR markers according to quality traits

Marker	SS1	df1	MS1	SS2	df2	MS2	F	p
Grain shape								
RM574	2.61	6.00	0.43	2.17	15.00	0.14	3.01	0.04
RM347	0.98	6.00	0.16	0.83	15.00	0.06	2.95	0.04
RM240	15.15	6.00	2.53	8.67	15.00	0.58	4.37	0.01
RM136	3.75	6.00	0.62	1.71	15.00	0.11	5.48	0.00
RM162	61.22	6.00	10.20	35.38	15.00	2.36	4.33	0.01
RM140	1.73	6.00	0.29	1.54	15.00	0.10	2.81	0.05
RM53	5.49	6.00	0.91	4.88	15.00	0.33	2.81	0.05
RM25	1.32	6.00	0.22	0.50	15.00	0.03	6.59	0.00
RM509	1.92	6.00	0.32	0.67	15.00	0.04	7.22	0.00
RM3276	4.95	6.00	0.83	4.00	15.00	0.27	3.10	0.04
RM5508	61.73	6.00	10.29	35.54	15.00	2.37	4.34	0.01
RM5707	20.95	6.00	3.49	14.00	15.00	0.93	3.74	0.02
Grain vitreousness								
RM289	1.52	2.00	0.76	2.77	18.00	0.15	4.93	0.02
Whole grain content in milled rice								
RM162	30.49	2.00	15.25	66.10	19.00	3.48	4.38	0.03
RM286	17.58	2.00	8.79	25.01	19.00	1.32	6.68	0.01
RM600	24.39	2.00	12.20	23.61	9.00	2.62	4.65	0.04
Hull percentage								
RM7110	10.19	2.00	5.09	24.58	19.00	1.29	3.94	0.04

Designations: SS1, intergroup square sum; df, number of degrees of freedom; MS1, intergroup variance; SS2, intragroup square sum; MS2, intragroup variance; F, Fisher's criterion; p, statistical significance.

пы российских сортов по форме зерновки и выходу целого ядра (рис. 2).

RM509 и RM240, расположенные на хромосомах 5 и 2, не позволяют достоверно разделить среднезерные и короткозерные группы сортов. Возможно, влияние локусов, ассоциированных с этими маркерами, маскируется другими локусами.

С использованием маркеров RM3276 и RM5707, расположенных на хромосомах 4 и 7 соответственно, недостоверно разделяются короткозерные и длиннозерные в случае первого маркера и среднезерные и короткозерные группы сортов – в случае второго. Эти маркеры позволяют достоверно идентифицировать только одну группу сортов с наиболее интенсивным проявлением признака. Маркер RM5508, локализованный на хромосоме 7, позволяет достоверно разделить все выделенные группы сортов по изучаемому признаку. Данных об ассоциации трех вышеперечисленных маркеров с какими-либо признаками качества нет ни на сайте [www.gramene.org](http://www.gramene.org), ни в других источниках. Возможно, в районе этих маркеров расположены гены, определяющие размеры зерновки, специфические для отечественного генофонда.

Достоверно разделить группы сортов по признаку «стекловидность эндосперма» зерновки риса (средняя,

низкая и высокая) позволял только маркер RM289, расположенный на хромосоме 5. Ранее в районе этого маркера были локализованы гены, определяющие массу 1 000 зерен, консистенцию геля, ширину зерновки, форму зерновки, соотношение длины зерновки к ширине, процентное содержание белого бруска зерновки, белых ядер зерновки, выход крупы, цвет муки (Temnykh et al., 2001; Jiang et al., 2004).

Три группы сортов российской селекции по признаку «выход (содержание) целого ядра» (средний, низкий и высокий выход) можно было достоверно разделить с помощью трех маркеров: RM162, RM286, RM600. Описание маркера RM162 приведено ранее, при изучении маркеров, связанных с локусами, определяющими форму зерновки.

Маркер RM286 расположен на хромосоме 11 и связан с признаками «доля окрашенных зерен», «масса 1 000 зерен». Он позволяет выявить российские образцы с высоким выходом целого ядра. С использованием маркера RM600 (хромосома 1) достоверно разделяли все изучаемые группы сортов по выходу целого ядра. Ранее в этом регионе не было выявлено локусов, определяющих качество зерна.

По признаку «пленчатость зерна» (средняя, низкая и высокая) группы российских сортов достоверно разделяли

**Table 4.** Properties of markers reliably distinguishing groups of rice varieties according to quality traits

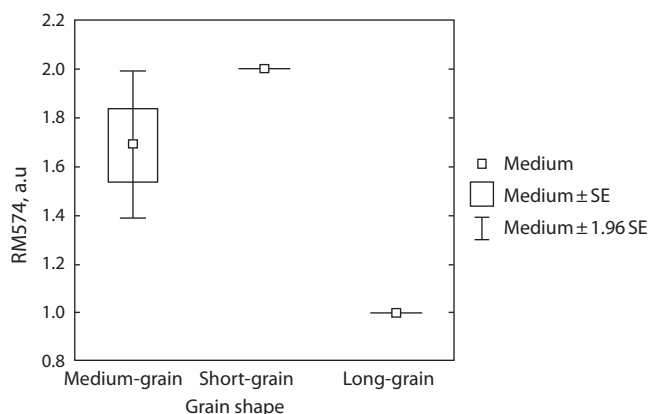
Marker	Melting temperature, °C	Amplicon length, bp	Repetitive motif	Chromosome (number of allels)	Associated traits
Different grain shapes					
RM5508	50	177	(TC) <sub>29</sub>	7 (8)	–
RM5707	50	139	(AAT) <sub>21</sub>	2 (5)	–
RM509	55	141	(TC) <sub>11</sub>	5 (3)	–
RM136	55	101	(AGG) <sub>7</sub>	6 (2)	Number of grains, root length, grain weight per panicle, leaf senescence (Temnykh et al., 2001)
RM140	55	261	(CT) <sub>12</sub>	6 (2)	Whole grain yield, grain length : width (Aluko et al., 2004)
RM25	55	146	(GA) <sub>18</sub>	8 (2)	1000 grain weight, whole grain yield (Cui et al., 2002a)
RM53	55	182	(GA) <sub>14</sub>	2 (3)	Whole grain yield, grain shape, alkali digestion time (Bao et al., 2002a, b; Aluko et al., 2004)
RM240	55	132	(CT) <sub>21</sub>	2 (5)	1000 grain weight, whole grain yield, number of cracked grains (Xing et al., 2002; Jiang et al., 2004)
RM347	55	207	(GG) <sub>5</sub> (AT) <sub>7</sub>	3 (2)	Alkali digestion time (Cui et al., 2002b; Bao et al., 2002b; Cai et al., 2015)
RM162	61	229	(AC) <sub>20</sub>	6(8)	Whole grain yield, grain length, grain length : width (Bao et al., 2002a; Cui et al., 2002a, b; Wan et al., 2006)
RM3276	50	163	(CT) <sub>13</sub>	4 (4)	–
RM574	55	155	(GA) <sub>11</sub>	5 (3)	Gel viscosity (Blight et al., 1999; Bao et al., 2002a; Wan et al., 2006)
Different levels of vitreousness					
RM289	108	55	G <sub>11</sub> (GA) <sub>16</sub>	5 (2)	1000 grain weight, grain width, grain shape, grain length : width, yield of milled rice (Temnykh et al., 2001; Jiang et al., 2004)
Different whole grain yields					
RM162	*See above				
RM286	55	110	(GA) <sub>16</sub>	11 (6)	1000 grain weight, grain color (Temnykh et al., 2001; Xing et al., 2002; Jiang et al., 2004)
RM600	55	220	(TTA) <sub>19</sub>	1 (7)	Number of roots, root weight : shoot weight (Temnykh et al., 2001)
Different hull percentages					
RM7110	55	176	(AGAT) <sub>9</sub>	7 (6)	–

только с использованием SSR-маркера RM7110. Данный маркер расположен на хромосоме 7 и связан с признаками «количество корней», «соотношение массы корней и побегов». Информации о связи маркера с локусами, определяющими качество, в литературных источниках не выявлено.

### Обсуждение

Изученный полиморфизм групп сортов, контрастных по признакам качества зерновки, позволил выявить хромосомные регионы, связанные с их формированием у оте-

чественных сортов риса. До сих пор такого рода исследований для отечественных образцов риса не проводилось. Не было данных о локализации генов, определяющих признаки качества, не выявлены даже группы сцепления. В зарубежной литературе подобные исследования проводились на различном материале, в результате чего для большинства хромосом риса выявлены районы, определяющие признаки качества. Однако нет данных, какие районы возможно использовать для разделения на контрастные по признакам качества группы сортов российской селекции. Кроме того, важно было выявить локусы, специфич-

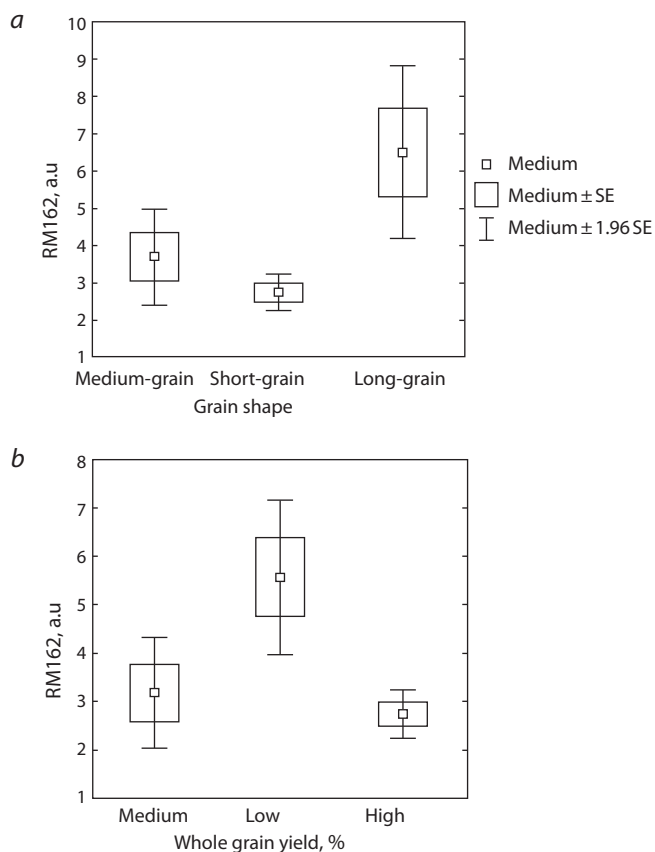


**Fig. 1.** Grouping of Russian varieties with different grain shapes according to the amplification product length with SSR marker RM574.

ные для отечественного генофонда, с целью дальнейшего точного картирования этих хромосомных регионов.

Маркеры, достоверно разделяющие группы сортов с различной массой 1000 зерен, выходом крупы, содержанием белка, амилозы, в данном исследовании не выявлены. Это можно считать закономерным результатом, так как на вышеперечисленные признаки оказывают влияние десятки генов, расположенных на всех хромосомах. Формирование одних признаков зависит от небольшого числа локусов с относительно значительными эффектами, их мы в работе выявить можем. Другие признаки формируются под влиянием значительного числа локусов с очень слабыми эффектами, которые не доступны для выявления используемыми в работе методами. Большинство сортов несет несколько генов, проявление влияния которых на признаки качества растений перекрывается (за счет разнонаправленности эффектов), что маскирует их действие. В нашем исследовании, в связи с небольшим размером выборки и количеством маркеров, могут быть установлены только локусы с максимальным фенотипическим эффектом. Сведения о локализации генов риса, собранные на сайте [www.gramene.org](http://www.gramene.org), позволяют не только использовать в работе известные маркеры, но и дополнительно подтвердить полученные данные. Связь выявленных хромосомных регионов с изучаемыми признаками, ранее установленная другими учеными, косвенно подтверждает полученные нами результаты.

Ценность настоящей работы состоит не только в том, что впервые для российского генофонда выявлены хромосомные регионы, определяющие признаки качества. Нами показана возможность сокращения материальных затрат и трудоемкости методик выявления хромосомных регионов, определяющих вариабельность признаков при изучении неизвестных образцов. Как правило, при локализации генов используют популяции:  $F_2$ , рекомбинантные инбредные линии (RIL) или рекомбинантные дигиплоидные линии (DH), причем число изучаемых растений в них обычно больше 100. Для анализа полиморфизма в них используется не менее 100 равномерно распределенных по геному маркеров, расстояние между которыми не превышает 20 сМ. При точной локализации (с целью выявления



**Fig. 2.** Grouping of Russian varieties with (a) different grain shapes and (b) different whole grain yields according to the amplification product length with SSR marker RM162.

генов-кандидатов) дополнительно привлекают несколько сотен маркеров из того хромосомного района, для которого связь с признаком установлена (Aluko et al., 2004; Collard et al., 2005; Xu, Crouch, 2008). На данном этапе, когда уже локализованы тысячи генов, определяющих формирование признаков риса, для выявления маркеров с максимальным фенотипическим эффектом можно использовать групповую селекцию (bulk breeding) (Collard, Mackill, 2008; Xu, 2010; Ye, Smith, 2010). Этот подход позволяет экономить время и средства, избегая создания и анализа больших популяций. Полученные данные можно сопоставить с накопленными сведениями о ранее маркированных локусах, которые суммированы в ресурсе [www.gramene.org](http://www.gramene.org), и выделить маркеры, пригодные для анализа изучаемого генофонда, в том числе для маркер-контролируемого отбора селекционного материала. Такая предварительная проверка известных диагностических маркеров на собственном генофонде необходима, поскольку не всегда гены, дифференцирующие сорта по признаку в одном районе мира, эффективны для другого региона, где признак может определяться совершенно другими локусами.

В нашем исследовании установлено, что двенадцать из изученных маркеров позволяют достоверно разделить группы с разной формой зерновки, три – с различным выходом целого ядра, и по одному маркеру – группы с раз-

личной стекловидностью и пленчатостью. Максимальная эффективность при разделении групп сортов с разной формой зерновки характерна для маркеров RM574, RM162, RM5508, расположенных на хромосомах 5, 6 и 7 соответственно, – их использование позволяет достоверно выделить образцы на коротко-, средне- и длиннозерные. Маркеры RM240, RM5707 позволяют достоверно выделять только длиннозерные сорта, не разделяя группы средне- и короткозерных образцов. Так, длиннозерные сорта отечественной селекции (Серпантин, Снежинка, Шарм, Изумруд, Нарцисс, Факел) по размеру продукта амплификации при использовании маркера RM240 достоверно отличаются от средне- и короткозерной групп (см. табл. 1). В случае маркера RM574 у всех трех групп сортов продукты амплификации имеют разный размер.

Маркеры, связанные с признаками «стекловидность зерновки» (RM289) и «пленчатость» (RM7110), позволяют достоверно разделить все группы и расположены на хромосомах 5 и 7 соответственно. С признаком «содержание целого ядра» связаны маркеры RM162 (хромосома 6), RM286 (хромосома 11) и RM600 (хромосома 1). Большая часть маркеров, для которых установлена связь с формированием признаков качества отечественных образцов, локализована в регионах, где уже выявлено наличие генов, определяющих качество, но на образцах иностранного происхождения. Наличие связи хромосомного региона расположения маркера RM162 с формированием двух изучаемых признаков вполне объяснимо, так как признаки «форма зерновки» и «выход целого ядра» взаимосвязаны. Как правило, короткозерные образцы имеют более высокий выход целого ядра. Однако эта связь может и не проявиться в случае, если короткозерный образец обладает низкой стекловидностью, трещиноватостью или высоким содержанием белка.

Данных об ассоциации маркеров RM3276, RM5707, RM5508, RM136, RM509, расположенных на хромосомах 2, 4, 5, 6, 7 и связанных, согласно нашему исследованию, с разделением отечественных сортов по группам с различной формой зерновки, с какими-либо признаками качества в литературных источниках не обнаружено. Возможно, в районе этих маркеров расположены гены, которые определяют размеры зерновки, специфичные для отечественного генофонда. Это же относится к маркерам RM7110 и RM600, по нашим сведениям, солокализованным с генами, определяющими пленчатость зерновки и выход целого ядра.

В качестве диагностических по признакам качества для сортов отечественной селекции мы рекомендуем использовать следующие маркеры: при разделении групп сортов с различной формой зерновки – RM574, RM162, RM5508; по признаку «стекловидность зерновки» – RM289, «пленчатость» – RM7110, «содержание целого ядра» – RM162, RM600.

## Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-44-230207, and the Krasnodar Krai administration.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93:1071-1077. DOI 10.1007/BF00230127.
- Aluko G., Martinez C., Tohme J. QTL mapping of grain quality traits from the interspecific cross *Oryza sativa* × *O. glaberrima*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:630-639.
- Anikanova Z.F., Tarasova L.E. Ris: sort, urozhay, kachestvo [Rice: Variety, Yield, Quality]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988. (in Russian)
- Bao J.S., Corke H., Sun M. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2002a;105:898-905.
- Bao J.S., Wu Y.R., Hu B. QTL for rice grain quality based on a DH population derived from parents with similar apparent amylose content. *Euphytica.* 2002b;128:317-324.
- Blight H.F., Blackhall N.W., Edwards K.J., Me Clung A.M. Using amplified fragment length polymorphisms and simple sequence length polymorphisms to identify cultivars of brown and white milled rice. *Crop Sci.* 1999;39:1715-1721.
- Cai H., Xu D., Zhou L., Cheng J., Zhang Z., Wu J., You A. Development of PCR-based SNP marker of rice Waxy gene with confronting two-pair primers. *Acta Genetica Sinica.* 2015;51(7):787-791.
- Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica.* 2005;142(1-2):169-196. DOI 10.1007/s10681-005-1681-5.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc.* 2008;363:557-572. DOI 10.1007/s10681-005-1681-5.
- Cui K., Peng S.B., Xing Y.Z., Yu S.B., Xu C.G. Molecular dissection of relationship between seedling characteristics and seed size in rice. *Acta Botanica Sinica.* 2002a;44(6):702-707.
- Cui K.H., Peng S.B., Xing Y.Z., Yu S.B., Xu C.G. Genetic analysis of the panicle traits related to yield sink size of rice. *Acta Genetica Sinica.* 2002b;29(2):144-152.
- Goncharova Yu.K., Kharitonov E.M. Performance improvement in intersubspecific hybrids of rice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2012;16(4):926-935. (in Russian)
- Goncharova Yu.K., Kharitonov E.M., Bushman N.Yu., Vereshchagina S.A. The influence of stress factors on the amylose content in Russia-bred rice varieties. *Vestnik RASKhN = Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* 2003;5:45-48. (in Russian)
- Guo Y.M. Evaluation and correlation analysis on mineral concentrations and pigment content in pericarp of color rice. *Biochem. Pharmacol.* 2011;75:1393-1401.
- Jiang G.H., Xu C.G., Li X.H., He Y.Q. Characterization of the genetic basis for yield and its component traits of rice revealed by doubled haploid population. *Acta Genetica Sinica.* 2004;31(1):63-72.
- Katalog sortov risa i ovoshchebakhevykh kul'tur kubanskoj selekcii [Catalog of varieties of rice, vegetables, and melon crops bred in the Kuban region]. Krasnodar: EDVI Publ., 2016. (in Russian)
- Kazakov E.D. Metodika otsenki kachestva zerna [The Technique of an Estimation of Quality of Grain]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1987. (in Russian)
- Keshanidi Kh.L., Kazakov E.D. Tekhnologicheskaya otsenka risa – zerna [Technological Evaluation of Rice]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)
- Kharitonov E.M., Goncharova Yu.K. Sterility of intersubspecific hybridization of rice *Oryza sativa* L. in the context of search for genes for broad compatibility and assignment of specimens to subspecies



- indica* or *japonica*. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2013;5:61-68. (in Russian)
- Korotenko T.L., Gospadinova V.I., Zelenskiy G.L. Comparative evaluation of grain quality and performance of rice genotypes differing in grain size and shape. Risovodstvo = Rice Growing. 2004;5:48-53. (in Russian)
- Kostylev P.I. Dikie vidy risa [Wild Species of Rice]. Moscow: Sputnik Publ., 2011. (in Russian)
- Kostylev P.I., Franceva N.V., Kostyleva L.M. Analysis of qualities of grain and head rice in pedigree rice accessions. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2013;5:31-37. (in Russian)
- Kostylev P.I., Krasnova E.F., Kostyleva L.M. Study of rice hybrids from crossing of Turkish and Russian varieties in Rostov region. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2017;4:35-40. (in Russian)
- Kushwaha U.K.S. Black Rice: Research, History and Development. Springer Int. Publ. Switzerland, 2016. DOI 10.1007/978-3-319-30153-2.
- Lyahovkin A.G. Mirovye proizvodstvo i genofond risa [Global Production and the Gene Pool of Rice]. St. Petersburg: Profi-inform Publ., 1992. (in Russian)
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980;8:4321-4325.
- Smetanin A.P., Dzyuba V.A., Aprod A.I. Metodiki opytnykh rabot po selektsii, semenovodstvu, semenovedeniyu i kontrolyu za kachestvom semyan risa [Methods of Experimental Work on Breeding, Seed Production, Seed and Monitoring Seed Quality of Rice]. Krasnodar, 1972. (in Russian)
- Temnykh S., Clerck D.G., Lukashova A. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res. 2001;11:1441-1452.
- Tumanyan N.G., Kumejko T.B., Olhovaya K.K., Kharitonov E.M. Qualitative characteristics of rice grains and amylose content in Russian (ARRRI) and Italian (SA.PI.SE Breeding Station, Vercelli) rice varieties. Risovodstvo = Rice Growing. 2014;1:33-40. (in Russian)
- Tumanyan N.G., Kumejko T.B., Ostapenko N.V., Olhovaya K.K., Kharitonov E.M. New rice varieties bred in ARRRI. Traits of grain quality. Risovodstvo = Rice Growing. 2015;1-2:16-23. (in Russian)
- Tumanyan N.G., Zelenskij G.L., Olhovaya K.K., Ostapenko N.V. Grain quality parameters in accessions of rice subspecies *indica* and *japonica* bred in Russia and abroad. Nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU. 2013;94(10). (in Russian)
- Ulitin V.O., Kharitonov E.M., Goncharova Yu.K. On quality traits and their genetic control in rice *Oryza* L. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2012;3:12-18. (in Russian)
- Wan X.Y., Wan J.M., Jiang L. QTL analysis for rice grain length and fine mapping of an identified QTL with stable and major effects. Theor. Appl. Genet. 2006;112(7):1258-1270.
- Xing Z., Tan F., Hua G. Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice. Theor. Appl. Genet. 2002;105:248-257.
- Xu Y. Molecular Plant Breeding. CAB International, 2010.
- Xu Y., Crouch J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. Crop Sci. 2008;48:391-407.
- Ye G., Smith K.F. Marker-assisted gene pyramiding for cultivar development. Plant Breed. Rev. 2010;33:234.
- Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X., Liu R.H. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7580-7587.
- Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X., Liu R.H. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7580-7587.