

УДК575.162

## **Скрининг гибридных генотипов риса на наличие гена устойчивости к засолению *Saltol***

**DOI: 10.18522/2308-9709-2024-48-5**

Черткова Наталья Григорьевна <sup>1, 2\*</sup>, Усатов Александр Вячеславович <sup>1</sup>,  
Костылев Павел Иванович <sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Южный Федеральный Университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского, 344090 г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, Российская Федерация, e-mail: tucik17082012@gmail.com*

<sup>2</sup>*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Аграрный научный центр «Донской», 347740 г. Зерноград, ул. Научный городок, 3, Ростовская область, Российская Федерация*

### *Аннотация*

Рис – это одна из важных злаковых культур, которая является источником питательных веществ более чем для половины населения земного шара. Под воздействием абиотических факторов, таких как засоление, происходит сокращение пригодных для возделывания с.-х. культур земель. Избыточное засоление не благоприятно влияет на растения риса, приводя к нарушению физико-биохимических процессов, ионного баланса, клеточных компонентов (ДНК, белков, липидов). Солеустойчивость у растений риса контролируется огромным количеством взаимосвязанных процессов и генов. QTL толерантности к солевому стрессу картированы на разных хромосомах. Основной QTL, названный как *Saltol*, картирован на хромосоме 1. Известны также и другие локусы, отвечающие за толерантность к солевому стрессу у растений риса, такие как SKC1 и qST1 (хромосома 1), qST3 (хромосома 3) и

другие. В настоящее время известны солеустойчивые сорта риса, такие как Pokkali, Nova Vokra, Moroberikan, Bhura Ratha, R21, R26, R20, R17, IR74099 и другие. Селекция с помощью маркеров, для идентификации QTL солеустойчивости – это уникальная возможность для повышения продуктивности и устойчивости растений риса к абиотическим стрессам. Цель исследования – провести скрининг и выявить толерантные к солевому стрессу гибридные генотипы риса. В качестве доноров солеустойчивости в скрещивания были внедрены известные азиатские сорта IR74099-3R-3-3, R17, R21, R26 и R20. В качестве реципиентных форм выступали сорта местной селекции Контакт, Новатор, Боярин и Аметист. Отобрали 65 гибридных линий и провели скрининг на наличие QTL солеустойчивости гена *Saltol* (маркер RM 493). Идентифицировано 21 гибридных генотипов с длиной ампликона 211 пн, как у донорного сорта IR74099-3R-3-3. В остальных генотипах амплификация обнаружена не была. Проведенный скрининг выявил генотипы риса с геном *Saltol*, которые рекомендуются для включения в программы селекции.

*Ключевые слова:* рис (*Oryza sativa* L.); ген *Saltol*; скрининг; солеустойчивость; засоление.

### **Screening of hybrid rice genotypes for identification of the salinity resistance gene *Saltol***

**DOI: 10.18522/2308-9709-2024-48-5**

Chertkova Natalya Grigoryevna <sup>1, 2\*</sup>, Usatov Alexander Vyacheslavovich <sup>1</sup>, Kostylev Pavel Ivanovich <sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Academy of Biology and Biotechnology named after D I Ivanovsky, Southern Federal University, 194/1 Stachki Avenue, Rostov on Don 344090, Russian Federation, e-mail: tycik17082012@gmail.com*

*<sup>2</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution "Agrarian Scientific Center "Donskoy", 347740 Zernograd, Scientific City St., 3, Rostov Region, Russian Federation*

*Abstract*

Rice is one of the important cereal crops, which is a source of nutrients for more than half of the world's population. Under the influence of abiotic factors, such as salinization, there is a reduction in land suitable for cultivation of agricultural crops. Excessive salinization adversely affects rice plants, leading to disruption of physical and biochemical processes, ionic balance, cellular components (DNA, proteins, lipids). Salt tolerance in rice plants is controlled by a huge number of interrelated processes and genes. QTL for salt stress tolerance are mapped on different chromosomes. The main QTL, called *Saltol*, is mapped on chromosome 1. Other loci responsible for salt stress tolerance in rice plants are also known, such as SKC1 and qST1 (chromosome 1), qST3 (chromosome 3), and others. Currently, salt-tolerant rice varieties such as Pokkali, Nova Bokra, Moroberikan, Bhura Ratha, R21, R26, R20, R17, IR74099 and others are known. Marker-assisted selection for identification of salt tolerance QTL is a unique opportunity to improve productivity and resistance of rice plants to abiotic stress. The purpose of the study is to screen and identify salt stress-tolerant hybrid rice genotypes. Well-known Asian varieties IR74099-3R-3-3, R17, R21, R26 and R20 were introduced into the crossing as salt tolerance donors. Locally bred varieties Contact, Novator, Boyarin and Ametist served as recipient forms. 65 hybrid lines were selected and screened for the presence of salt tolerance QTL of the *Saltol* gene (marker RM 493). 21 hybrid genotypes with an amplicon length of 211 bp, as in the donor variety IR74099-3R-3-3, were identified. No amplification was detected in the remaining genotypes. The screening revealed rice genotypes with the *Saltol* gene that are recommended for inclusion in breeding programs.

*Keywords:* rice (*Oryza sativa* L.); *Saltol* gene; screening; salt tolerance; salinity.

Рис (*Oryza sativa* L.) – это важная зерновая культура, которая наряду с пшеницей является основным источником питательных веществ употребляемых в пищу. Зоны возделывания риса охватывают разнообразные агроклиматические экосистемы, занимая одну пятую всей площади пахотных земель под выращиванием зерновых культур (Chakravarthi, Naravaneni, 2006). С каждым годом происходит сокращение пригодных для возделывания сельскохозяйственных культур земель из-за накопления в почве солей, тяжелых металлов и других веществ, оказывающих негативное влияние на рост и развитие растений, в частности риса (Ju et al., 2022). Потери урожайности, под воздействием этих стресс-факторов, могут составлять до 80 %, приводя к огромным экономическим потерям (Kumari et al., 2016). Засоленность почвы является основным абиотическим стрессом, который оказывает отрицательное действие на растения риса. Избыточное содержание ионов солей в почве влияет на важнейшие физиологические и биохимические процессы растений, приводя к нарушению ионного баланса, недостатку минералов и в конечном итоге влияет на клеточные компоненты, такие как ДНК, белки, липиды (Zhu, 2002; Костылев, Кудашкина, 2019). Из-за высокого содержания солей в почве происходит торможение ростовых процессов у растения риса, задерживается рост метелки, появляются стерильные колоски и в конечном итоге снижается урожайность (Waziri et al., 2016). Растения риса показывают разную реакцию на засоление в фазы развития, так например, рис очень чувствителен на ранних вегетативных (1-3 неделя всходов) и поздних репродуктивных стадиях развития, но частично толерантен в фазу полного кущения, налива зерна и созревания (Thomson et al., 2010; Singh et al., 2021; Nutan et al., 2019). Поскольку рис является растением-гидрофитом, его иногда

рекомендуют в качестве исходной культуры для выщелачивания солей и опреснения засоленных почв (Thomson et al., 2010).

Kawasaki, Ozturk и другие ученые, в своих молекулярно-генетических исследованиях выяснили, что солеустойчивость у растений риса контролируется огромным количеством взаимосвязанных процессов и генов (Kawasaki et al., 2001; Ozturk et al., 2002). QTL толерантности к солевому стрессу картированы на разных хромосомах (Prasad et al., 2000; Koyama et al., 2001; Gregorio et al., 2002; Ren et al., 2005; Lee et al., 2007). Bonilla, Gregorio и другие проводившие исследования, с применением микросателлитных маркеров, выяснили, что основной QTL, названный как *Saltol*, картирован на хромосоме 1 (Bonilla et al., 2002; Gregorio et al., 2002; Chattopadhyay et al., 2014). Толерантные аллели гена *Saltol* объясняют низкое соотношение  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  при возникновении солевого стресса. Картированы также и другие локусы, отвечающие за толерантность к солевому стрессу у растений риса, такие как SKC1 и qST1 (хромосома 1), qST3 (хромосома 3) и другие (Kumari et al., 2016). Благодаря генотипированию и картированию QTL, известны сорта риса, обладающие устойчивостью к солевому стрессу, такие как Pokkali, Nova Vokra, Moroberikan, Bhura Ratha, R21, R26, R20, R17, IR74099 и другие (Singh et al., 2021). Генотипы, обладающие генами толерантности к солевому стрессу, необходимо внедрять в селекционный процесс.

Внедрение MAS технологий в стандартные методы создания сортов, дает преимущество в быстром выделении нужных для селекционеров генотипов, обладающих необходимыми признаками и свойствами с более высоким потенциалом устойчивости к абиотическим и биотическим факторам (Черткова, 2022). Селекция с помощью маркеров, для идентификации QTL солеустойчивости – это уникальная возможность для повышения

продуктивности и устойчивости растений риса (Ganie1 et al., 2019; Bundó et al., 2022).

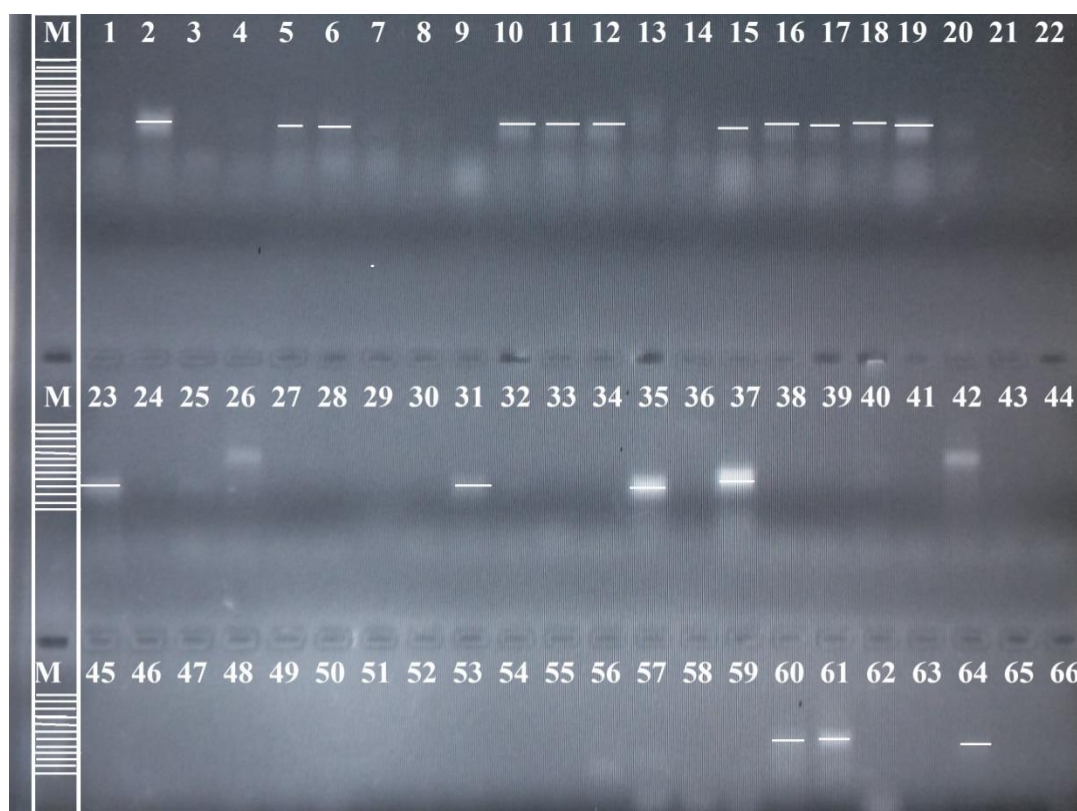
Цель исследования - провести скрининг и выявить толерантные к солевому стрессу гибридные генотипы риса.

### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследования служили гибриды линии риса, полученные в лаборатории селекции и семеноводства риса ОП «Пролетарское» ФГБНУ «АНЦ «Донской» в г. Пролетарске (Ростовская область). В качестве доноров солеустойчивости в скрещивания были включены известные азиатские сорта IR74099-3R-3-3, Pokkali, R17(IR86385-87-1-1-B), R21(IR86385-117-3-1-B), R26(IR86385-248-2-1-B) и R20(IR86385-111-1-1-B). Скрещивание проводили с высокоурожайными сорта местной селекции Контакт, Новатор, Боярин и Аметист. Из гибридного потомства были отобраны лучшие по селекционно ценным признакам образцы в количестве 65 штук. Первый этап исследования заключался в получении растительного материала (молодые высечки), для экстрагирования ДНК. Для этого гибридные зерна в количестве 5 шт. проращивали в чашках Петри согласно Межгосударственному стандарту ГОСТ 12038-84. Проращивание осуществляли в течение 10 дней в условиях термостата при температуре 20-30°C. Второй этап исследования заключался в экстрагировании ДНК из молодых высечек. Осаждение ДНК проводили СТАВ методом. На третьем этапе проводили амплификацию в термоциклере Rotorgene 6000 (Corbett Research, Австралия). Продукты амплификации и длину ампликона определяли в 2% агарозном геле с использованием бромистого этидия (1 мкг/мл) и трис-боратного буфера. Фотодокументирование проводили спектрофотометрически (GelDoc 2000, BioRad, США).

Молекулярно-генетический анализ проходил при использовании одной пары SSR-маркера Rm493 с размером ампликона 211 пн, со следующими нуклеотидными последовательностями: F 5'–TAGCTCCAACAG GATCGACC–3' и R 5'–GTACGTAAACGCGGAAGGTG–3'. Последовательности маркеров отобраны в базе данных [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov). Праймеры синтезированы компанией «Евроген» (Россия).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Молекулярные технологии являются важными инструментами для идентификации генетического состава, выявления толерантных к различным стресс-факторам генотипов, а так же способствуют сокращению сроков выведения сорта (Oladosu et al., 2020; Naque et al., 2022). В исследовании провели скрининг 65 гибридных генотипов риса на наличие гена устойчивости к солевому стрессу *Saltol*. Пример электрофореграммы продуктов амплификации геномной ДНК представлен на рисунке 1.



**Рис. 1 Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных форм риса с маркером RM 493 гена солеустойчивости *Saltol***

М – маркер молекулярного веса 50+ bp (размеры полос снизу вверх – 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 пн); 66–донор R20; 65–донор R26; 64–донор IR-74; 63–Боярин (российский сорт без гена *Saltol*); 62–Контакт (российский сорт без гена *Saltol*); 1–61–гибридные линии.

На электрофореграмме отчетливо видно наличие QTL солеустойчивости гена *Saltol* в гибридных генотипах и донорном сорте IR74099-3R-3-3. Из 65 гибридных растений риса ампликон длиной 211 пн идентифицировали в 21 образце (№2, 5, 60, 61 (IR74099-3R-3-3 x Новатор); №37 (IR52713-2B-8-2B x Новатор x K2495); №35 (R17(IR86385-87-1-1-B x Боярин); №31(R26(IR86385-248-2-1-B x Контакт); №23 ((Pokkali x Новатор) x Аметист); №19 (IR-45427 x Новатор); №17,18 (IR-52713-2B-8-2B x Новатор); №6, 10, 11, 12, 15, 16 (IR52713-2B-8-2B-1-2 x Новатор и другие). В двух гибридных образцах (№ 26 (Pokkali x Новатор) x Аметист) и №42 (IR52713-2B-8-2B x Новатор x Контакт) выявлен неспецифический продукт примерным размером порядка 450 пн. Изучение причин появления этого продукта планируется в дальнейшем исследовании. В остальных генотипах амплификация обнаружена не была.

**Выводы.** Проведенный скрининг на наличие QTL солеустойчивости гена *Saltol* выявил желаемые генотипы риса, которые будут рекомендованы для внедрения в селекционный процесс. Интродукция таких генотипов в селекционные программы позволит выращивать растения риса на засоленных почвах без огромных потерь урожая и позволит использовать рис как исходную культуру для выщелачивания пахотных земель.



Работа выполнена в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0008 Мониторинг, моделирование и управление экосистемными функциями и сервисами почв и растений в целях устойчивого развития природных, агро- и урболандшафтов юга России.

### **Литература / References**

Костылев П. И., Кудашкина Е. Б. Изучение солеустойчивости риса на генеративной стадии развития. Таврический вестник аграрной науки, 2019 № 2(18). <https://doi.org/10.33952/2542-0720-2019-2-18-70-77>.

Черткова Н. Г., Костылев П. И., Калинина Н. В., Донцова В. Ю., Шумская О. В. Получение регенерантных линий риса методом культуры пыльников. Зерновое хозяйство России, 2022. Т. 14, № 4. С. 22–27. <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2022-82-4-22-27>.

Bonilla, P.S., Dvorak, J., Mackill, D., Deal, K., Gregorio, G. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza saliva* L.) using recombinant inbred lines. Philippine Agricultural Scientist, 2002; 85: 64-76.

Bundó, M., Martín-Cardoso, H., Pesenti, M., Gómez-Ariza, J., Castillo, L., Frouin, J., Serrat, X., Nogués, S., Courtois, B., Grenier, C., Sacchi, G. A., Segundo, B. S. Integrative Approach for Precise Genotyping and Transcriptomics of Salt Tolerant Introgression Rice Lines. Front Plant Sci., 2022; 12:797141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.797141>.

Chakravarthi, B. K., Naravaneni, R. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa*. L). African J Biotechnol, 2006; 5(9):684-688.

Chattopadhyay, K., Nath, D., Mohanta, R. L., Bhattacharyya, S., Marndi, B. C., Nayak, A. K., Singh, D. P., Sarkar, R. K., Singh O. N. Diversity and validation

of microsatellite markers in Saltol-QTL region in contrasting rice genotypes for salt tolerance at the early vegetative stage. *Australian Journal of Crop Science*, 2014; 8(3):356-362.

Ganie<sup>1</sup>, S.A. Molla, K.A. Henry, R.J. Bhat, K. V., Mondal, T. K. Advances in understanding salt tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03301-8>.

Gregorio, G.B., Senadhira, D., Mendoza, R.D., Manigbas, N.L, Roxas, J.P. and Guerta, Q.C. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. *Field Crops Research*, 2002; 76:91-101.

Haque, A., Rafii, Y., Yusoff, M., Ali, N., Yusuff, O., Arolu, F., Anisuzzaman, M. Flooding tolerance in Rice: adaptive mechanism and marker-assisted selection breeding approaches. *Nature*, 2022. <https://doi.org/10.1007 / s11033-022-07853-9>.

Ju, C., Ma, X., Han, B., Zhang, W., Zhao, Z., Geng, L., Cui, D., Han, L. Candidate gene discovery for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at the germination stage based on genome-wide association study. *Frontiers in Plant Science*, 2022; 13:1010654. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1010654>.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 2001; 13:889-906. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.889>.

Koyama, M.L., Levesley, A., Koebner, R.M.D., Flowers, T.J., Yeo, A.R. Quantitative trait loci for component physiological trait determining salt tolerance in rice. *Plant Physiology*, 2001; 125:406-422.

Kumari, R., Kumar, P., Sharma, V. K., Kumar, H. Molecular characterization for salinity tolerance in rice using microsatellite markers. *International Journal of*

Agriculture, Environment and Biotechnology, 2016; 9(2): 163-174.  
<https://doi.org/10.5958/2230-732X.2016.00023.1>.

Lee, S.Y., Ahn, J.H., Cha, Y.S., Yun, D.W. and Lee, M.C. Mapping QTLs related to salinity tolerance of rice at the young seedling stage. *Plant Breed*, 2007; 126: 43-46. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0523.2007.01265.X>.

Nutan, K. K., Singla-Pareek, S. L., Pareek, A. The Saltol QTL-localized transcription factor OsGATA8 plays an important role in stress tolerance and seed development in *Arabidopsis* and rice. *Journal of Experimental Botany*, 2019; 7;71(2):684-698. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz368>.

Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Arolu, F., Chukwu, S. C., Muhammad, I., Kareem, I., Salisu, M. A., Arolu, I. W. Submergence tolerance in rice: Review of mechanism, breeding and, future prospects. *Sustainability*, 2020; 12:1632. <https://doi.org/10.3390/su12041632>.

Ozturk, Z.N., Talame, V., Deyhols, M., Michalowski, C.B. and Galbraith, D.W. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*, 2002; 48:551-573. <https://doi.org/10.1023/a:1014875215580>.

Prasad, S. R., Balaji, P. G., Hittalmani, S., Shasidhar, H. E. Molecular mapping of quantitative trait loci associated with seedling tolerance to salt stress in rice. *Current Science*, 2000; 78:162-164.

Ren, Z.H., Gao, J.P., Lim L.G., Cai, X.L. and Huang, W. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genet*, 2005; 37:1141-1146. <https://doi.org/10.1038/ng1643>.

Singh, R. K., Kota, S., Flowers, T.J. Salt tolerance in rice: seedling and reproductive stage QTL mapping come of age. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021; 134:3495–3533. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03890-3>.

Thomson, M. J., Ocampo, M., Egdane, J., Rahman, M. A., Sajise, A. G., Adorada, D. L., Singh, R. K., Gregorio, G. B., Ismail, A. M. Characterizing the Saltol Quantitative Trait Locus for Salinity Tolerance in Rice. *Springer Science + Business Media*, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9053-8>.

Waziri, A., Kumar, P., Purty, R. S. Saltol QTL and Their Role in Salinity Tolerance in Rice. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2016; 3(3): 1067

Zhu, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plant. *Annual Review of Plant Biology*, 2002; 53:247-273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>.

Статья поступила в редакцию 17 июня 2024 г.

Поступила после доработки 25 июня 2024 г.

Принята к печати 30 июля 2024 г.

Received 17, June, 2024

Revised 25, June, 2024

Accepted 30, July, 2024