

DOI: 10.31862/2500-2961-2023-13-4-366-383

УДК 575.167

**Н.Г. Черткова<sup>1, 2</sup>, А.В. Усатов<sup>1</sup>,  
П.И. Костылев<sup>2</sup>, Н.Г. Дуплий<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Южный федеральный университет,  
344090 г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>2</sup> Аграрный научный центр «Донской»,  
347740 г. Зерноград, Ростовская область, Российская Федерация

## Идентификация генов устойчивости к длительному затоплению в гибридных образцах риса

Рис – важная зерновая культура, известная способностью расти на затопленной почве. Растения риса конкурируют с сорняками, а использование гербицидов зачастую малоэффективно и нерентабельно. В решении данной проблемы могут помочь сорта, которые имеют гены, придающие устойчивость к глубокому затоплению, поэтому изучение ДНК-маркеров является важной задачей. В локусах толерантности к затоплению имеются ген *Sub1*, который активируется в анаэробных условиях. В локусе находятся три сходных гена: *Sub1A*, *Sub1B*, *Sub1C*, но только ген *Sub1A* повышает выживаемость в условиях длительного затопления. Целью исследования является поиск наиболее эффективного маркера *Sub1A* для идентификации в отечественных гибридных образцах риса генов толерантности к длительному затоплению как природному методу борьбы с сорными растениями. В качестве доноров использовали зарубежные сорта (Inbara-3, BR-11, TDK-1, IR-64, CR-1009, Swarna), а в качестве реципиентных форм – российские сорта (Новатор, Магнат, Степняк, Бахус, Командор, Кубань-3, Боярин, Контакт). Из популяций  $F_5$ – $F_9$  поколений отобрали 96 скороспелых гибридов. Для идентификации гена у гибридных растений использовали три набора самых широко используемых, по литературным данным, локус-специфических праймеров: *Sub1A(1F1R)*, *Sub1A(2F2R)* и *Sub1A(3F3R)*. Из 96 исследованных гибридных растений ампликон участка *Sub1A(1F1R)* обнаружен

© Черткова Н.Г., Усатов А.В., Костылев П.И., Дуплий Н.Г., 2023

Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License  
The content is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



в 17 образцах, ампликон участка *Sub1A(2F2R)* – в 17 образцах, а праймер *Sub1A(3F3R)* инициировал неспецифическую амплификацию и не позволил идентифицировать генотипы. Для дальнейшей проверки фенотипического выражения интродуцируемых локусов провели анализ морфо-физиологического ответа всех гибридных линий риса в условиях затопления. В условиях затопления количество проросших семян риса у родительских линий (Новатор, Боярин и Степняк) снижалось, как и у гибридов, не унаследовавших локус по данным молекулярно-генетического анализа. Таким образом, рекомендуется проводить анализ по двум маркерам для повышения эффективности.

**Ключевые слова:** рис (*Oryza sativa* L.), гены *Sub1*, ДНК-маркеры генов толерантности к длительному затоплению у риса, гибридные линии риса, устойчивость к затоплению у риса

Для ЦИТИРОВАНИЯ: Идентификация генов устойчивости к длительному затоплению в гибридных образцах риса / Черткова Н.Г., Усатов А.В., Костылев П.И., Дуплий Н.Г. // Социально-экологические технологии. 2023. Т. 13. № 4. С. 366–383. DOI: 10.31862/2500-2961-2023-13-4-366-383

Original research

DOI: 10.31862/2500-2961-2023-13-4-366-383

**N.G. Chertkova<sup>1,2</sup>, A.V. Usatov<sup>1</sup>,  
P.I. Kostylev<sup>2</sup>, N.G. Dupliy<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Southern Federal University,  
Rostov-on-Don, 344090, Russian Federation

<sup>2</sup> Agricultural Research Center “Donskoy”,  
Zernograd, Rostov region, 347740, Russian Federation

## Identification of long-term flood-resistant genes in rice hybrid samples

Rice is an important grain crop known for its ability to grow in flooded soil. Sometimes rice plants resist weeds and herbicides' application ineffectively and unprofitably. The varieties that have flood-resistant genes can help solve

this problem, so the study of DNA markers is of great importance. Flood-resistant loci contain the *Sub1* gene, which is activated under anaerobic conditions. The locus contains three similar genes *Sub1A*, *Sub1B*, *Sub1C*, but only the gene *Sub1A* improves resistance to such conditions. The purpose of the study is to find the most effective *Sub1A* marker for identifying genes for tolerance to prolonged flooding in domestic hybrid rice samples as a natural method of weed control. As donors there have been used foreign varieties (Inbara-3, BR-11, TDK-1, IR-64, CR-1009, Swarna), and Russian varieties (Novator, Magnat, Stepnyak, Bakhus, Komandor, Kuban-3, Boyarin, Kontakt) as recipient forms. From the populations of  $F_5$ - $F_9$  generations, there have been selected 96 early maturing hybrids. To identify the gene in hybrid plants, three sets of locus-specific primers, the most widely used according to the literature, were used: *Sub1A*(1F1R), *Sub1A*(2F2R), and *Sub1A*(3F3R). The region amplicon *Sub1A*(1F1R) was found in 17 samples among 96 studied hybrids, the region amplicon *Sub1A*(2F2R) was found in 17 samples, and the *Sub1A*(3F3R) primer has initiated nonspecific amplification and did not allow the identification of genotypes. To further verify the phenotypic expression of the introduced locus, the morpho-physiological response of all hybrid rice lines under flooding conditions was analyzed. Under flooding conditions, the number of germinated rice seeds in the parental lines (Novator, Boyarin and Stepnyak) decreased, as well as in hybrids that did not inherit the locus according to molecular genetic analysis. As a result, it is recommended to carry out analysis using two markers to improve efficiency.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.), *Sub1* genes, DNA markers of genes for tolerance to long-term flooding in rice, rice hybrid lines, flood-resistance in rice

FOR CITATION. Chertkova N.G., Usatov A.V., Kostylev P.I., Dupliy N.G. Identification of long-term flood-resistant genes in rice hybrid samples. *Environment and Human: Ecological Studies*. 2023. Vol. 13. No. 4. Pp. 366–383. DOI: 10.31862/2500-2961-2023-13-4-366-383

## Введение

Рис (*Oryza sativa* L.) является важным источником пищи для многих людей в мире и, в отличие от других сельскохозяйственных культур, хорошо известен своей способностью расти на затопленной почве. В России посевы риса в основном сосредоточены в Краснодарском крае и Ростовской области. Прямой посев риса становится все более популярным во многих странах мира из-за его более низкой стоимости и простоты

в эксплуатации [Panda, Barik, 2021]. При таком посеве рис конкурирует с сорными растениями за важнейшие факторы питания. В рисовых чеках потери по урожайности из-за таких растений могут варьировать от 20 до 60%. Применение химических препаратов в борьбе с сорняками иногда малоэффективно и нерентабельно [Oladosu et al., 2020]. Кроме того, использование гербицидов приводит к химическому загрязнению воды в оросительных системах, в природных водоемах, а также может ухудшать качество зерна. В настоящее время одним из способов решения этих проблем является затопление поля до определенного уровня после посева семян. Сорные растения не могут находиться долгое время в таких условиях и погибают. Однако большинство современных сортов риса в России также не могут находиться в затоплении более 7 дней из-за высокой чувствительности к анаэробным условиям во время прорастания [Barik et al., 2019]. Азиатскими исследователями на данный момент широко изучены механизмы устойчивости риса к анаэробным условиям, а также выделены сорта (Br-11, CR-1009, Inbara-3, IR-64, TDK-1), обладающие этим признаком [Oe et al., 2021].

Устойчивость к затоплению у риса ранее считалась количественным признаком. Однако использование молекулярных маркеров показало, что в локусах толерантности к затоплению имеется ген *Sub1*, который начинает действовать при повышении уровня воды в рисовых чеках [Xu et al., 2006; Hattori et al., 2009]. Локус *Sub1* на хромосоме 9 позволяет достичь до 70% выживания растений в анаэробных условиях и помогает растениям выдерживать полное погружение до двух недель. В этом локусе находятся три сходных гена: *Sub1A*, *Sub1B*, *Sub1C*, но только ген *Sub1A* повышает устойчивость растений риса к анаэробным условиям [Khasna et al., 2020; Zhao et al., 2021]. Механизм действия локуса *Sub1* заключается в том, что этилен, накапливающийся во время затопления, индуцирует экспрессию *Sub1A*. Индуцированный белок *Sub1A* повышает чувствительность тканей к абсцизовой кислоте, что приводит к снижению действия гиббереллиновой кислоты. У каждого из генов выявлено несколько аллельных вариантов, которые регулируют метаболизм и продлевают период выживания растений [Yang et al., 2019]. Адаптация растения под контролем этих генов проявляется в избегании условий гипоксии и осуществлении нормальной аэрации тканей после сброса воды [Zhao et al., 2021; Yang et al., 2021].

В настоящее время подобран ряд наиболее эффективных молекулярных маркеров для идентификации генетической изменчивости риса [Xu et al., 2006; Niroula et al., 2012]. Отбор генотипов, устойчивых к длительному погружению, с использованием ДНК-маркеров в российской

селекции значительно повысит эффективность и точность улучшения сортов. Высокоурожайные сорта риса в России уже доступны, и необходимо внедрить гены устойчивости к затоплению в эти сорта, чтобы они могли противостоять таким условиям.

Нами апробированы три наиболее широко используемых маркеров на отечественных сортах для выявления наиболее информативных. Данный скрининг позволит создать перспективные, высокоурожайные и устойчивые к абиотическим и биотическим стрессам сорта риса [Dubina et al., 2020]. Использование воды в качестве «природного гербицида» даст возможность получить экологически чистые семена с улучшенными вкусовыми качествами, которые могут применяться в детском питании, а также позволит сократить затраты на их производство.

Целью работы является поиск наиболее эффективного маркера *Sub1A* для идентификации в отечественных гибридных образцах риса генов толерантности к длительному затоплению как природному методу борьбы с сорными растениями.

## Материалы и методы

Отбор гибридных форм осуществляли на полях лаборатории селекции и семеноводства риса Аграрного научного центра «Донской» в г. Пролетарске Ростовской области.

Поскольку рис относится к культурам, которые чувствительны к продолжительности дня, в нашем регионе согласно методическим указаниям и классификатору рода *Oryza sativa* L. (1982) приоритетнее возделывать сорта с вегетационным периодом 110–125 дней. В качестве доноров в скрещивания были включены широко используемые толерантные к затоплению позднеспелые (145–160 дней) сорта (Inbara-3, BR-11, TDK-1, IR-64, CR-1009, Swarna) [Mackill, Khush, 2018; Naque et al., 2022]. Доноры при выращивании в условиях Ростовской области зацветали в сентябре и не успевали созревать. В качестве реципиентных форм выбрали высокопродуктивные, раннеспелые российские сорта (Новатор, Магнат, Степняк, Бахус, Командор, Кубань-3, Боярин, Контакт) с вегетационным периодом 105–120 дней.

После скрещивания из получившихся гибридов отобрали лучшие по селекционно-ценным признакам линии, которые в дальнейшем пересеивали в полевых опытах. Из популяций растений  $F_5$ – $F_9$  поколений, в которых не наблюдалось расщепления по фенотипу, отобрали 96 скороспелых гибридов, из них: Inbara-3 × Новатор – 32 гибридных образца (3121–3125, 3125/1, 3126, 3110, 3130–3131/1, 3223, 3230, 5620, 5620/1, 5621, 5622/1, 5622, 5622/2, 343–354), BR-11 × Новатор – 13 образцов

(3269, 5618–5620, 5442–5445, 5459–5461, 5698–5699), TDK-1 × Новатор – 7 (3143–3144, 5463/1, 5463, 5738–5740), IR-64 × Боярин – 3 образца (5577–5578/1), IR-64 × Магнат – 1 образец (5579), Inbara-3 × Контакт – 4 образца (766, 1191, 707, 1191/1), Inbara-3 × Боярин – 1 образец (1193), Inbara-3 × Степняк – 3 образца (3133, 3135, 3137), IR-64 × Новатор – 2 (3325, 5720), CR-1009 × Новатор – 5 образцов (5462, 5541, 5541/1, 5541/2, 5541/3), BR-11 × Кубань-3 – 4 образца (5575, 5575/1, 5575/2, 5575/3), Inbara-3 × Командор – 4 (5576, 5576/1, 5576/2, 5576/3), Swarna × Магнат – 8 образцов (5588, 5588/1, 5588/2, 5588/3, 5589, 5589/1, 5589/2, 5589/3), Inbara-3 × Бахус – 9 (5591, 5591/1, 5591/2, 5591/3, 5592, 5592/1, 5592/2, 5592/3, 5618). Гибриды имели высокие показатели селекционно-ценных признаков (масса 1000 зерен, количество зерен в метелке и масса зерен с 1 метелки).

Геномную ДНК из высечек листьев риса выделяли с помощью детергента СТАВ (ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид), который хорошо растворяет и лизирует клеточную мембрану, а также эффективно разрушает ДНК-белковые комплексы. Процесс выделения ДНК состоял из следующих фаз: лизирование клеток, распад РНК, депротенинизация и экстракция ДНК под действием хлороформа и выпадения нуклеиновых кислот в виде осадка благодаря действию изопропанола. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 5 мкл *Sybr Green* (5×; Евроген, Россия), 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера (общая концентрация праймеров в конечной реакционной смеси 0,4 мкМ), 15 мкл бидистиллированной воды и 3 мкл ДНК (с концентрацией 100 нг).

По литературным данным и базе данных [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) нами были подобраны локус-специфические праймеры *Sub1A*(1F1R), *Sub1A*(2F2R) и *Sub1A*(3F3R) для исследования отечественных гибридных линий на наличие аллелей гена *Sub1A* [Xu et al., 2006; Niroula et al., 2012]. Нуклеотидные последовательности представлены в табл. 1.

Аmplификацию проводили в термоциклере Rotorgene 6000 (Corbett Research, Австралия). Этапы реакции были следующими: денатурация (при 96 °С 2 мин), 30 циклов отжига (при 55–60 °С 40 с), элонгация (при 70 °С 1 мин), денатурация (при 94 °С 30 с) и финальная элонгация (2 мин). Амплификационные продукты разделяли электрофоретически с использованием 2-процентного агарозного гель-электрофореза и трисборатного буфера (1×) с добавлением бромистого этидия (1 мкг/мл). Гель фотографировали под ультрафиолетовым светом с помощью видеосистемы (GelDoc 2000, BioRad, США).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ Statistica и Excel пакета Microsoft Office.

Таблица 1

**Нуклеотидные последовательности праймеров для идентификации *Sub1A***  
**[Nucleotide sequences of primers to identify *Sub1A*]**

Ген [Gene]	Праймер [Primer]	Последовательность праймера (5'–3') [Primer sequence (5'–3')]	Размер ампликона, bp [Amplicon size, bp]	Температура отжига праймера, °C [Primer annealing temperature, °C]	Ссылка [Link]
<i>Sub1A</i>	1F	CGGCCTCATCACAATCGGAG	203	59	Xu et al., 2006
	1R	ATGTCCATGTCCATATGTCGTCTG			
<i>Sub1A</i>	2F	ATATTCACCTGCTCACTAGTAAC	1040	59	Niroula et al., 2012
	2R	GTTTGTGGCCTTTGAGTAAG			
<i>Sub1A</i>	3F	GATGTGTGGAGGAGAAGTGA	1015	59	Xu et al., 2006
	3R	GGTAGATGCCGAGAAGTGTA			

Морфологическую и физиологическую оценку изученных генотипов выполняли в условиях теплицы. Высевание набухших зерен в почву осуществляли в аквариум высотой 50 см. Затем проводили затопление водой. Расчет процента выживших растений выполняли через 21 день. Достоверные отличия рассчитывали при помощи критерия Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

В настоящее время создание сортов с использованием молекулярных технологий выходит на первое место среди других методов. Внедрение сортов, обладающих устойчивостью к различным абиотическим и биотическим стрессам, является не только экономическим, но и важным природоохранным фактором [Dubina et al., 2020; Oladosu et al., 2020; Naque et al., 2022].

В процессе исследований было отобрано и оценено 96 гибридов на наличие локуса гена *Sub1A*. Согласно методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур, гибридные образцы, проанализировали по следующим показателям: продолжительность вегетационного периода; высота растений; длина метелки; масса 1000 зерен; количество зерен в метелке и масса зерен с 1 метелки. В табл. 2 представлены средние значения селекционно-ценных признаков у гибридов риса.

Одним из основных признаков риса в России является период вегетации, его продолжительность в родительских линиях варьировала от 105 (Контакт) до 145 (CR-1009) дней периода «всходы–созревание», а у гибридных растений варьировала от 110 (IR-64 × Боярин, IR-64 × Магнат и BR-11 × Кубань-3) до 120 дней (CR-1009 × Новатор и Swarna × Магнат). По признаку «период вегетации» отобранные гибридные растения соответствуют условиям выращивания, поскольку они характеризуются меньшим периодом созревания, чем линии доноров [Dubina et al., 2018]. Донорные линии по признаку «высота растений» превышали в среднем на 27 см отечественные сорта. Высота растений у гибридных линий варьировала от 95,5 (IR-64 × Боярин) до 103,7 см (BR-11 × Новатор).

В нашем исследовании гибриды риса были оценены тремя парами наиболее применяемых, по литературным данным, молекулярных маркеров. В результате только два маркера *Sub1A*(1F1R) и *Sub1A*(2F2R) являются информативными для скрининга отечественных гибридов и дали специфический амплификационный продукт ожидаемого размера. Третий маркер инициировал неспецифическую амплификацию и не позволил идентифицировать генотипы риса. Электрофореграммы фрагментов ДНК представлены на рис. 1 и 2.



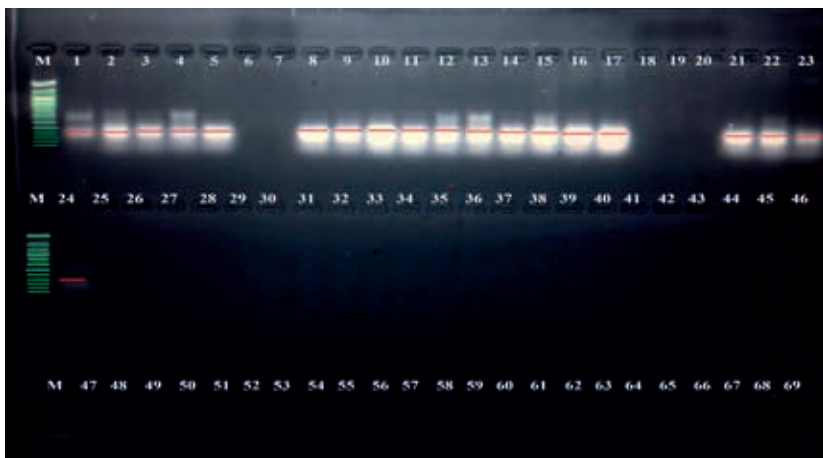
Таблица 2

**Характеристика родительских и гибридных образцов риса по селекционно-ценным признакам**  
**[Characteristics of parental and hybrid rice samples according to breeding and valuable traits]**

Образец [Sample]	Вегетационный период, дней [Vegetation period, days]	Высота растений, см [Plant height, cm]	Длина метелки, см [Panicle length, cm]	Количество зерен в метелке, шт [Number of seeds per panicle, pcs.]	Масса зерен с 1 метелки, г [Seed weight per a panicle, g]	Масса 1000 зерен, г [1000-seed weight, g]
♀ Inbara-3 ( <i>Sub1A</i> )	140	148,0	25,2	94,7	2,5	25,5
♀ CR-1009 ( <i>Sub1A</i> )	145	132,5	22,8	68,3	2,1	29,4
♀ TDK-1 ( <i>Sub1A</i> )	144	136,5	23,7	66,8	2,2	29,8
♀ IR-64 ( <i>Sub1A</i> )	140	110,5	25,7	98,4	3,5	32,3
♀ BR-11 ( <i>Sub1A</i> )	140	130,1	20,9	73,5	2,4	27,4
♀ Swarna ( <i>Sub1A</i> )	135	126,4	22,4	85,2	2,8	28,6
♂ Контакт [♂ Kontakt]	105	97,5	12,3	97,3	2,7	29,5
♂ Новатор [♂ Novator]	111	98,5	17,3	115,5	3,1	30,7
♂ Боярин [♂ Boyarin]	117	108,2	14,5	138,5	3,8	30,9
♂ Магнат [♂ Magnat]	112	110,3	15,1	119,2	3,1	29,2
♂ Степняк [♂ Stepnyak]	113	105,1	14,7	117,4	3,2	28,8

♂ Бахус [♂ Bakhus]	115	96,6	15,9	109,5	3,2	28,6
♂ Командор [♂ Komandor]	115	105,4	15,1	124,6	3,5	29,1
♂ Кубань-3 [♂ Kuban-3]	112	102,3	17,6	107,7	2,9	25,7
ТДК-1 × Новатор [ТДК-1 × Novator]	116	97,5	14,3	139,7	3,5	26,2
IR-64 × Боярин [IR-64 × Boyarin]	110	95,5	16,3	175,0	4,2	24,2
IR-64 × Магнат [IR-64 × Magnat]	110	97,1	16,0	244,0	4,8	20,3
Inbara-3 × Контакт [Inbara-3 × Kontakt]	111	101,3	12,8	128,5	3,8	27,8
Inbara-3 × Боярин [Inbara-3 × Boyarin]	112	100,5	15,5	177	3,4	26,3
Inbara-3 × Степняк [Inbara-3 × Stepnyak]	112	98,4	16,3	142,0	3,4	25,5
IR-64 × Новатор [IR-64 × Novator]	113	99,3	14,5	190,0	6,3	25,9
CR-1009 × Новатор [CR-1009 × Novator]	120	97,3	15,5	182,0	5,1	30,6
BR-11 × Кубань-3 [BR-11 × Kuban-3]	110	100,5	13,8	145,5	3,1	24,0
Inbara-3 × Командор [Inbara-3 × Komandor]	115	92,5	14,8	169,8	4,9	29,6
Swarna × Магнат [Swarna × Magnat]	120	100,6	14,3	195,4	5,1	26,6
Inbara-3 × Бахус [Inbara-3 × Bakhus]	117	99,4	16,6	183,9	5,4	29,9
BR-11 × Новатор [BR-11 × Novator]	116	103,7	17,5	109,2	3,1	29,2
Inbara-3 × Новатор [Inbara-3 × Novator]	111	95,7	20,2	99,6	2,6	28,6
LSD <sub>0,05</sub>	5,35	4,25	2,36	11,74	0,72	2,75

На электрофореграмме отчетливо видно наличие аллеля *Sub1A* (1F1R) в проанализированных гибридных образцах (см. рис. 1). Так, из 96 гибридных растений ампликон длиной 203 пн присутствовал в 17 образцах (№ 2–5, 8–17, 21–23). Также был выявлен неспецифический продукт примерным размером 350 пн, не только в донорном сорте (№ 2, 24), но и в гибридных образцах (№ 2, 4, 12, 13). Изучение причин появления этого продукта планируется в дальнейшем исследовании.



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК на наличие локуса гена устойчивости к затоплению *Sub1A*(1F1R)

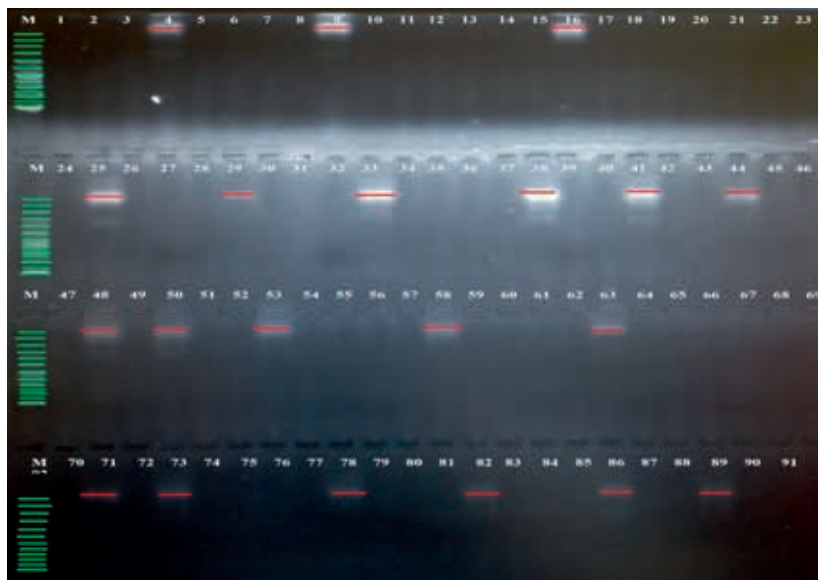
М – маркер молекулярного веса 50+ bp  
(размеры полос снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 пн)

1, 24 – Inbara-3 (донор); 2 – № 3121; 3 – № 3126; 4 – № 3122;  
5 – № 3123; 8 – № 3130; 9 – № 3131; 10 – № 5461; 11 – № 5463;  
12 – № 5577; 13 – № 5578; 14 – № 5579; 15 – № 5618; 16 – № 5619;  
17 – № 5620; 21 – № 3223; 22 – № 3125/1; 23 – №3230

**Fig. 1.** Electropherogram of genomic DNA amplification products for the presence of the flood-resistant locus gene *Sub1A*(1F1R)

М – molecular weight marker 50+ bp  
(band sizes from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pn)

1, 24 – Inbara-3 (donor); 2 – No. 3121; 3 – No. 3126; 4 – No. 3122;  
5 – No. 3123; 8 – No. 3130; 9 – No. 3131; 10 – No. 5461;  
11 – No. 5463; 12 – No. 5577; 13 – No. 5578; 14 – No. 5579;  
15 – No. 5618; 16 – No. 5619; 17 – No. 5620; 21 – No. 3223;  
22 – No. 3125/1; 23 – No. 3230



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК на наличие локуса гена устойчивости к затоплению *Sub1A(2F2R)*

M – маркер молекулярного веса 50+ бп (размеры полос снизу вверх – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 пн)

25, 48, 71 – Inbara-3 (донор); 4 – № 3123; 9 – № 3130; 16 – № 5619; 29 – № 3131/1; 33 – № 5443; 38 – №5463/1; 41 – № 5541/3; 44 – № 5575/1; 50 – №5575/2; 53 – № 5575/3; 58 – № 5576; 63 – № 5588/1; 73 – № 5589/1; 78 – № 5589/3; 82 – № 5591; 86 – № 5620/1; 89 – № 5699

**Fig. 2.** Electropherogram of genomic DNA amplification products for the presence of the *Sub1A(2F2R)* flood resistance gene locus

M – molecular weight marker 50+ bp (band sizes from bottom to top – 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pn)

25, 48, 71 – No. 3123; 9 – No. 3130; 16 – No. 5619; 29 – No. 3131/1; 33 – No. 5443; 38 – No. 5463/1; 41 – No. 5541/3; 44 – No. 5575/1; 50 – No. 5575/2; 53 – No. 5575/3; 58 – No. 5576; 63 – No. 5588/1; 73 – No. 5589/1; 78 – No. 5589/3; 82 – No. 5591; 86 – No. 5620/1; 89 – No. 5699

На электрофореграмме видно наличие аллеля *Sub1A(2F2R)* длиной 1040 пн в 17 гибридных образцах (см. рис. 2). Подобная работа по идентификации генотипов риса с локусами генов устойчивости к затоплению проводится в Федеральном научном центре риса [Dubina et al., 2020, 2022]. Результаты генотипирования гибридов риса по функциональным аллелям гена устойчивости представлены в табл. 3.

**Оценка наличия гена *Sub1A* у гибридных растений риса**  
**[Estimation of the gene *Sub1A* presence in rice hybrids]**

Гибриды [Hybrids]	Аллель <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R) [Allele <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R)]	Гибриды [Hybrids]	Аллель <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R) [Allele <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R)]	Гибриды [Hybrids]	Аллель <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R) [Allele <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R)]
3121	+/-	5443	-/+	5591/3	-/-
3126	+/-	5444	-/-	5592	-/-
3122	+/-	5445	-/-	5592/1	-/-
3123	+/+	5459	-/-	5592/2	-/-
3124	-/-	5460	-/-	5592/3	-/-
3125	-/-	5462	-/-	5618	-/-
3130	+/+	5463/1	-/+	5620/2	-/-
3131	+/-	5541	-/-	5620/1	-/+
5461	+/-	5541/1	-/-	5621	-/-
5463	+/-	5541/2	-/-	5621/1	-/-
5577	+/-	5541/3	-/+	5622/1	-/-
5578	+/-	5575	-/-	5622	-/-
5579	+/-	5575/1	-/+	5698	-/-
5618	+/-	5575/2	-/+	5699	-/+
5619	+/+	5575/3	-/+	5720	-/-
5620	+/-	5576	-/+	5738	-/-
766	-/-	5576/1	-/-	5739	-/-
1191	-/-	5576/2	-/-	5740	-/-
1193	-/-	5576/3	-/-	343	-/-
3223	+/-	5578/1	-/-	344	-/-
3125/1	+/-	5622/2	-/-	345	-/-
3230	+/-	5588	-/-	346	-/-
3131/1	-/+	5588/1	-/+	347	-/-

Гибриды [Hybrids]	Аллель <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R) [Allele <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R)]	Гибриды [Hybrids]	Аллель <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R) [Allele <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R)]	Гибриды [Hybrids]	Аллель <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R) [Allele <i>Sub1A</i> (1F1R)/(2F2R)]
3110	-/-	5588/2	-/-	348	-/-
3133	-/-	5588/3	-/-	349	-/-
3135	-/-	5589	-/-	350	-/-
3137	-/-	5589/1	-/+	351	-/-
3143	-/-	5589/2	-/-	352	-/-
3144	-/-	5589/3	-/+	353	-/-
3269	-/-	5591	-/+	354	-/-
3325	-/-	5591/1	-/-	767	-/-
5442	-/-	5591/2	-/-	1191/1	-/-

По данным электрофореза у образцов № 3123 (Inbara-3 × Новатор), № 3130 (Inbara-3 × Новатор) и № 5619 (BR-11 × Новатор) было выявлено два аллельных варианта гена *Sub1A*.

Для дальнейшей проверки фенотипического выражения интродуцируемых локусов провели анализ морфо-физиологического ответа всех гибридных линий риса в условиях затопления. Для опыта использовали набухшие зерна (выдержанные в воде 12 ч). Затопление выполняли после посева семян. Контрольные растения выращивали в физиологически нормальных условиях. Через 7 и 21 день были измерены показатели длины проростка, рассчитана выживаемость в процентах. Часть полученных результатов представлена в табл. 4.

В условиях затопления количество проросших семян риса у родительских линий (Новатор, Боярин и Степняк), а также у гибридов, не унаследовавших аллель гена *Sub1A* по данным молекулярно-генетического анализа (№ 3269, 3124, 5462, 5588), снижалось. У гибридов, унаследовавших два аллеля признака (№ 5619, № 3123 и № 3130), выживаемость была выше на 3–5% в сравнении с гибридами, имеющих один аллель гена *Sub1A* (№ 5618, 3121, 5541/3, 5588/1). Таким образом, эксперимент по глубоководному затоплению наглядно показал стратегию выживания растений риса в анаэробных условиях.

Таблица 4

**Показатели выживаемости (%) образцов риса  
через 21 день прорастания в условиях затопления**  
**[Survival rates (%) of rice samples after 21 days of germination  
when flooding]**

№ образца [Sample No.]	Образцы [Samples]	Выживаемость, % [Survival rate, (%)]	
		Контроль [Control]	Опыт [Trial]
1	Новатор [Novator]	97 ± 1,5	51 ± 3,5*
2	Боярин [Boyarin]	98 ± 2,0	61 ± 2,0*
3	Степняк [Stepnyak]	99 ± 1,0	62 ± 2,0*
4	Inbara-3	92 ± 2,0	88 ± 2,4
5	BR-11	95 ± 2,5	86 ± 2,0
5618	BR-11 × Новатор [BR-11 × Novator]	93 ± 1,5	84 ± 2,3
<b>5619</b>	<b>BR-11 × Новатор [BR-11 × Novator]</b>	<b>94 ± 1,3</b>	<b>89 ± 2,5</b>
3269	BR-11 × Новатор [BR-11 × Novator]	93 ± 1,7	69 ± 1,5*
3121	Inbara-3 × Новатор [Inbara-3 × Novator]	92 ± 2,0	85 ± 2,0
<b>3123</b>	<b>Inbara-3 × Новатор [Inbara-3 × Novator]</b>	<b>94 ± 1,5</b>	<b>88 ± 2,5</b>
<b>3130</b>	<b>Inbara-3 × Новатор [Inbara-3 × Novator]</b>	<b>93 ± 1,7</b>	<b>90 ± 3,0</b>
3124	Inbara-3 × Новатор [Inbara-3 × Novator]	93 ± 1,9	68 ± 1,7*
5541/3	CR-1009 × Новатор [CR-1009 × Novator]	90 ± 1,5	88 ± 2,5
5462	CR-1009 × Новатор [CR-1009 × Novator]	92±2,0	69 ± 2,2*
5588/1	Swarna × Магнат [Swarna × Magnat]	91 ± 2,0	79 ± 2,6
5588	Swarna × Магнат [Swarna × Magnat]	93 ± 1,7	65 ± 1,8*

Пр и м е ч а н и е: \* достоверные отличия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

[Note: \* significant differences compared to the control when  $p < 0.05$ .]

### Выводы

Таким образом, гибриды риса были оценены тремя парами ДНК-маркеров. В результате только два маркера *Sub1A(1F1R)* и *Sub1A(2F2R)* являются информативными для скрининга и дали специфический амплификационный продукт ожидаемого размера. Третий маркер инициировал неспецифическую амплификацию и не позволил идентифицировать генотипы риса.

В результате проведенных исследований было изучено 96 генотипов риса. Функциональные аллели гена *Sub1A* идентифицировали в 31 гибридных линиях (аллель *Sub1A*(1F1R) – 14 гибридах, аллель *Sub1A*(1F1R) – 14 гибридах и два аллеля в гибридах № 3123 (Inbara-3 × Новатор), № 3130 (Inbara-3 × Новатор) и № 5619 (BR-11 × Новатор). По признаку «период вегетации» гибридные растения характеризовались меньшим периодом созревания от 110 (IR-64 × Боярин, IR-64 × Магнат и BR-11 × Кубань-3) до 120 дней (CR-1009 × Новатор и Swarna × Магнат), в сравнении с донорами устойчивости к затоплению. В условиях затопления количество проросших семян риса у родительских линий (Новатор, Боярин и Степняк), а также у гибридов, не унаследовавших аллель гена *Sub1A*, снижалось. Выживаемость гибридов, унаследовавших два аллеля, была выше на 3–5%, чем имеющих одну аллель гена *Sub1A*.

Анализ генотипов риса на наличие устойчивости к гипоксии позволил идентифицировать линии риса, которые будут использованы в дальнейших исследованиях и полевых опытах. Внедрение таких линий в селекционные посева позволит получить экологически чистые семена риса с улучшенными вкусовыми качествами, снизит применение гербицидов и химическое загрязнение природных водоемов.

## Библиографический список / References

Barik S.R., Pandit E., Pradhan S.K. et al. Genetic mapping of morpho-physiological traits involved during reproductive stage drought tolerance in rice. *PLoS One*. 2019. No. 14 (12). Article number e0214979. DOI: 10.1371/journal.pone.0214979

Dubina E.V., Alabushev A.V., Kostylev P.I. et al. Introduction of the *Sub1* gene into the Russian rice varieties using the polymerase chain reaction (PCR) methods. *Full Length Research Paper*. 2018. DOI: 10.5897/AJAR2018.13563

Dubina E., Kostylev P., Ruban M. et al. Rice breeding in Russia using genetic markers. *Plants (Basel)*. 2020. Vol. 15. No. 9 (11). P. 1580. DOI: 10.3390/plants9111580

Haque A., Rafii Y., Yusoff M. et al. Flooding tolerance in Rice: Adaptive mechanism and marker-assisted selection breeding approaches. *Nature*. 2022. DOI: 10.1007/s11033-022-07853-9

Hattori Y., Nagai K., Furukawa S. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*. 2009. Vol. 460. Pp. 1026–1030.

Mackill D., Khush G. IR64: A high-quality and high-yielding mega variety. *Plant Science*. 2018. DOI: 10.1186/s12284-018-0208-3

Niroula R., Pucciariello C., Ho V. et al. SUB1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species. *The Plant Journal*. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05078.x.

Oladosu Y., Rafii M.Y., Arolu F. et al. Submergence tolerance in rice: Review of mechanism, breeding and, future prospects. *Sustainability*. 2020. Vol. 12. P. 1632. DOI: 10.3390/su12041632



Khasna E., Karisma K., Ardana G. et al. Sub1A gene screening for submergence stress in Indonesian local rice varieties. *AIP Conference Proceedings* 2260. DOI: 10.1063/5.0015816

Oe S., Sasayama D., Luo Q. et al. Growth responses of seedlings under complete submergence in rice cultivars carrying both the submergence-tolerance gene Sub1A-1 and the floating genes snorkels. *Plant Production Science*. 2021. No. 25. Pp. 70–77. DOI: 10.1080/1343943x.2021.1943465

Panda D., Barik J. Flooding tolerance in rice: Focus on mechanisms and approaches. *Rice Science*. 2021. Vol. 28. Is. 1. Pp. 43–57. DOI: 10.1016/j.rsci.2020.11.006

Perata P. The rice SUB1A gene: Making adaptation to submergence and post-submergence possible. *Plant, Cell & Environment*. 2018. Vol. 41. No. 4. Pp. 717–720.

Sasaki T., Ashikari M. Rice genomics, genetics and breeding. Springer, 2018. Pp. 116–118.

Xu K., Xu X., Fukao T. et al. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*. 2006. Vol. 442. Pp. 705–708. DOI: 10.1038/nature04920

Yang J., Guo Z., Luo L. et al. Identification of QTL and candidate genes involved in early seedling growth in rice via high-density genetic mapping and RNA-seq. *The Crop Journal*. 2021. Vol. 9. Pp. 360–371.

Yang J., Sun K., Li D. et al. Identification of stable QTLs and candidate genes involved in anaerobic germination tolerance in rice via high-density genetic mapping and RNA-Seq. *BMC Genomics*. 2019. Vol. 20. Pp. 355. DOI: 10.1186/s12864-019-5741-y

Zhao J., He Y., Huang S., Wang Z. Advances in the identification of quantitative trait loci and genes involved in seed vigor in rice. *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 12. Art. 659307. DOI: 10.3389/fpls.2021.659307.

Статья поступила в редакцию 25.04.2023, принята к публикации 22.06.2023

The article was received on 25.04.2023, accepted for publication 22.06.2023

#### Сведения об авторах / About the authors

**Черткова Наталья Григорьевна** – аспирант кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону; младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, Аграрный научный центр «Донской», г. Зерноград, Ростовская обл.

**Natalya G. Chertkova** – post graduate student at the Department of Genetics of the Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don; junior researcher at the Cell Selection Laboratory, Agricultural Research Center “Donskoy”, Zernograd, Rostov region, Russian Federation

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4005-9771>

E-mail: [tycik17082012@gmail.com](mailto:tycik17082012@gmail.com)

**Усатов Александр Вячеславович** – доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией молекулярной генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

**Alexander V. Usatov** – Dr. Biol. Hab.; head at the Laboratory of Molecular Genetics of the Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0600-7927>

E-mail: [usatova@sfedu.ru](mailto:usatova@sfedu.ru)

**Костылев Павел Иванович** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории селекции и семеноводства риса, Аграрный научный центр «Донской», г. Зерноград, Ростовская обл.

**Pavel I. Kostylev** – Dr. Hab. (Agricultural Sciences); Chief Researcher at the Laboratory of Rice Breeding and Seed Production, Agricultural Research Center “Donskoy”, Zernograd, Rostov region, Russian Federation

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4371-6848>

E-mail: [p-kostylev@mail.ru](mailto:p-kostylev@mail.ru)

**Дуплий Надежда Геннадьевна** – лаборант кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

**Nadezhda G. Duplii** – laboratory assistant at the Department of Genetics of the Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5782-9942>

E-mail: [duplii@rambler.ru](mailto:duplii@rambler.ru)

#### Заявленный вклад авторов

**Черткова Н.Г.** – разработка и проведение экспериментов, подготовка основного текста статьи

**Усатов А.В.** – осуществление научного руководства работой, подготовка и написание литературного обзора

**Костылев П.И.** – предоставление семенного и растительного материала

**Дуплий Н.Г.** – помощь в статистической обработке данных и составлении графиков

#### Contribution of the authors

**N.G. Chertkova** – development and carry out of experiments, preparation of the main text of the article

**A.V. Usatov** – scientific supervision of work, preparation of a review

**P.I. Kostylev** – provision of seed and plant material

**N.G. Duplii** – assistance in statistical data processing and drawing up graphs

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи  
All authors have read and approved the final manuscript