

Біоінформатичний аналіз генів рису посівного (*Oryza sativa* L.), асоційованих зі стійкістю проти пірикуляріозу

К. В. Бондаренко¹, Г. І. Сліщук², Н. Е. Волкова^{2*}

¹Інститут рису НААН України, с. Антонівка, Скадовський р-н, Херсонська обл., 75705, Україна

²Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, вул. Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна, *e-mail: natavolki@ukr.net

Мета. Дослідити поліморфізм генів стійкості рису посівного проти пірикуляріозу біоінформатичними методами. **Методи.** Глобальне та локальне вирівнювання нуклеотидних послідовностей, філогенетичний аналіз, тест НуРну. **Результати.** Для гена *Pib* встановлено численні однонуклеотидні заміни та делеції 1–3 п. н. Досліджено філогенію цього гена; знайдено гомологи як у різних видів рису, так і в інших злакових, що свідчить про можливість кодування ними протеїнів, які «розпізнають» ефектори фітопатогенів, тобто ці гомологи можуть бути залучені в забезпечення стійкості проти фітопатогенів. Для гена *Pi4* характерними є однонуклеотидні заміни, інсерції та делеції; кількість несинонімічних замін перевищує кількість синонімічних. Варіабельність гена *Pi54* є значно нижчою, ніж генів *Pi4* та *Pib*. Переважними видами поліморфізму є однонуклеотидні заміни та інделі невеликого розміру. Встановлено, що несинонімічні заміни в генах *Pi54*, *Pi4* та *Pib* мали схильність розміщуватися близько одна до одної, іноді утворюючи кластери, тоді як деякі кодуєчі ділянки або були надконсервативними, або містили переважно синонімічні заміни. На філодендрограмах зразки рису посівного кластеризуються зі зразками предкових дикорослих видів. **Висновки.** Для еволюції генів стійкості рису проти пірикуляріозу *Pi4*, *Pib* та *Pi54* є характерним диверсифікуючий добір. Враховуючи те, що для рослини та паразита властивою є напружена коєволюція, значна швидкість адаптації та утворення нових рас патогена, ці гени зазнають інтенсивного добору, спрямованого на підвищення різноманіття з метою набуття стійкості проти нових рас патогена.

Ключові слова: Гени *Pib*, *Pi54*, *Pi4*, вирівнювання послідовностей, філогенетичний аналіз, еволюція, однонуклеотидний поліморфізм, інделі.

Вступ

Серед хвороб рису посівного (*Oryza sativa* L.) найшкодочиннішим є пірикуляріоз, спричинений грибом *Magnaporthe grisea* Barr Yaegashi&Udagawa (анаморф *Pyricularia grisea*). Пірикуляріоз за відсутності в рослинного організму стійкості швидко призводить до повного ураження всіх частин рослини і її загибелі, зрідження посівів, зменшення кількості та якості зерна в колоску. З цієї причини недобір врожаю становить 20–50%, у роки епіфітотій – до 100% [1].

Katerina Bondarenko

<http://orcid.org/0000-0003-1468-1233>

Heorhii Slishchuk

<http://orcid.org/0000-0003-4245-8557>

Nataliia Volkova

<http://orcid.org/0000-0002-9333-4872>

Найперспективнішим рішенням у боротьбі з цим захворюванням є створення стійких сортів та їх впровадження у виробництво. Культивування таких сортів дасть змогу скоротити до мінімуму використання фунгіцидів на рисових полях та забезпечить харчову безпеку продукції рисової галузі. Але забезпечення стійкості є складним напрямом селекції, оскільки шкідники та збудники хвороб мають великий потенціал мінливості, що разом зі швидкістю розмноження забезпечує патогену значні пристосувальні можливості. Об'єднання кількох ефективних генів стійкості на генетичній основі елітних сортів є ефективною стратегією селекції на стійкість проти високоваріабельних грибних патогенів, у т. ч. збудника пірикуляріозу [2].

Гени стійкості рису проти пірикуляріозу належать до класу тих, що кодуєть протеї-

ни з нуклеотид-сполучним сайтом і доменом зі збагаченими лейцином повторами (nucleotide-binding site – leucine-rich repeat, NBS-LRR) – такими, що реагують на мікробіальні ефектори [3]. За даними інтегрованої наукової бази рису *OryzaBase* [4], генами стійкості рису проти пірикуляріозу є PI1-PI3, PI5-PI44, PI46-PI-51, PI55, PI56, PI62, PI65, PI67 та багато інших (номенклатура генів згідно з CGSNL – Committee on Gene Symbolization, Nomenclature and Linkage, Rice Genetics Cooperative). Цікавою особливістю продуктів цих генів є те, що вони є специфічними до протеїнів-ефекторів фітопатогена: AvrPita, AvrPiz-t, AvrPik/km/kr, AvrPia [5].

Враховуючи важливість створення стійких проти пірикуляріозу сортів рису, зокрема шляхом пірамідування ефективних генів стійкості в елітні сорти, доцільним є дослідження поліморфізму генів стійкості для розроблення функціональних маркерів, що можуть бути використані в маркер-супутньому доборі [6, 7].

Мета досліджень – дослідити поліморфізм генів стійкості рису посівного проти пірикуляріозу біоінформатичними методами.

Матеріали та методика досліджень

Матеріалом дослідження були нуклеотидні послідовності генів стійкості проти пірикуляріозу рису та їхні гомологи (повні та часткові послідовності): 86 послідовностей гомологів гена P1B (синонім *Pib*), 96 послідовностей P1KH (синонім *Pi54*), 96 послідовностей P1TA (синонім *Pi4*), представлених у базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information, NCBI) [8].

Локальне вирівнювання нуклеотидних послідовностей провадили за алгоритмом Сміта–Уотермана [9]. Для пошуку гомологів генів, асоційованих зі стійкістю до пірикуляріозу рису, використовували програму BLAST. Глобальне вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали за алгоритмами Нідльмана–Вунша [10] та MUSCLE [11]. Філогенетичні взаємовідносини досліджено за методом UPGMA [12].

Характер еволюції досліджено за тестом HyPhy (Hypothesis testing using Phylogenies) [13] методом максимальної вірогідності за моделями Muse–Gaut [14] та Felsenstein [15].

Оцінено співвідношення синонімічних та несинонімічних заміन [16].

Результати досліджень

Біоінформатичний аналіз гена *Pib*. За результатами вирівнювання 86 нуклеотидних послідовностей гена *Pib* рису та його гомологів злакових встановлено численні однонуклеотидні заміни та делеції 1–3 п. н.

Для гена *Pib* рису визначено диверсифікуючий добір. Так, співвідношення несинонімічних замін до синонімічних у більшості випадків є позитивними, їхні нормалізовані значення становлять від 0,94 до 7,61. Це свідчить про спрямованість добору на підвищення різноманіття цього гена та спрямованість еволюції патогена на збільшення варіабельності ефектора *Pib*.

Досліджено філогенію гена *Pib* та знайдено гомологи як у різних видів рису, так і в інших злакових. Ці послідовності можуть кодувати протеїни, що «розпізнають» ефектори фітопатогенів, а також можуть бути асоційовані зі стійкістю проти фітопатогенів.

За результатами кластерного аналізу нуклеотидні послідовності гена *Pib* рису посівного *Oryza sativa* увійшли в один субкластер, в якому також є представники дикорослих видів рису червонобородного *O. rufipogon* (Griff.) та рису предкового *O. nivara* (Sharma et Shastry) (рис. 1). Ці види з опадаючим насінням вважають предками культурного рису.

Біоінформатичний аналіз гена *Pi4*. Аналіз даних вирівнювання 96 нуклеотидних послідовностей гена *Pi4* рису та його гомологів встановив, що для цього гена характерними є однонуклеотидні заміни, інсерції та делеції. Розмір найбільшої інделі становить 232 п. н., також є інсерції меншого розміру – 16, 12, 8, 6 та 3 п. н. Вони переважно локалізовані в регіоні промотору та екзонах. Для інтронів характерними є лише однонуклеотидні заміни та невеликі інделі розміром 1–2 п. н.

Щодо характеру еволюції гена *Pi4*, встановлено диверсифікуючий добір; кількість несинонімічних замін перевищує кількість синонімічних, нормалізовані значення співвідношень становлять від 6,70 до 40,18.

Диверсифікуючий добір та високий рівень поліморфізму екзонів взагалі є характерним для генів, асоційованих зі стійкістю проти хвороб, та свідчить про інтенсивний процес коеволуції патогена та рослини. Враховуючи те, що несинонімічні заміни частіше перебувають у групах, що перемижуються довгими регіонами з переважною кількістю синонімічних або висококонсервативних за-

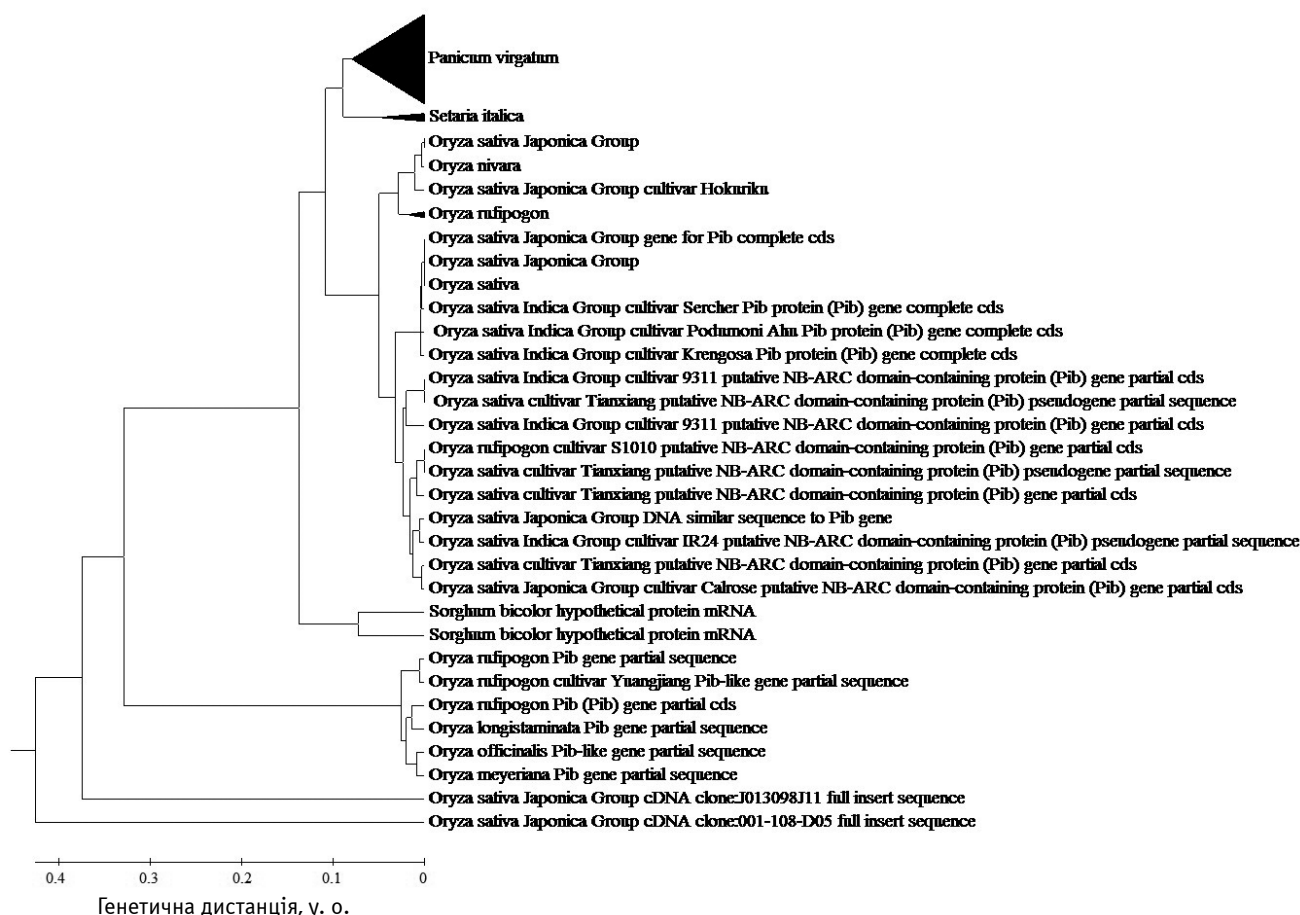


Рис. 1. Філодендрограма за результатами вирівнювання гомологів гена *Pib* рису

(Деякі кластери закриті для коректного відображення дендрограми. Назви біля гілок є назвами зразків відповідно до NCBI)

мін, саме ці регіони (дистальна частина першого екзону) зазнають найбільшого пресингу диверсифікуючого добору, та саме цей регіон транскрипту протеїну ймовірно відповідає за «розпізнавання» патогена. Цим можна пояснити характер патерну нуклеотидних замін у цьому регіоні.

На дендрограмі за результатами кластеризації зразки рису посівного не утворили окремого кластера, вони «розкидані» по дендрограмі та кластеризуються з різними видами роду *Oryza* (рис. 2). Це може бути зумовлено тим, що дикорослі види рису, з одного боку, є предковими формами культурного рису, з іншого – цінними джерелами (і донорами) генів стійкості в разі використання загальноприйнятого в селекції підходу віддаленої гібридизації.

Біоінформатичний аналіз гена *Pi54*. За результатами дослідження 96 нуклеотидних послідовностей гена *Pi54* рису та його гомологів з'ясовано, що варіабельність цього гена є значно нижчою, ніж генів *Pi4* та *Pib*. Переважним видом поліморфізму є ононуклеотидні заміни та інделі невеликого розміру.

Однак, незважаючи на нижчий рівень поліморфізму, еволюція цього гена також носила характер диверсифікації, оскільки несинонімічних замін більше, ніж синонімічних, що свідчить про спрямованість еволюції цього гена на підвищення різноманіття.

Нижчий поліморфізм можна пояснити слабшим внеском гена в загальний рівень стійкості проти патогена, тому й еволюція цього гена носила менш інтенсивний характер (менший тиск добору). Як і в разі з генами *Pi4* та *Pib*, несинонімічні заміни групуються в невеличкі кластери, що переважно консервативних регіонів або регіонів з переважно синонімічними замінами.

З 96 нуклеотидних послідовностей гомологів гена *Pi54* лише п'ять були повними та містили промоторну ділянку, екзони та інтрони, тому саме вони обрані для філогенетичного аналізу.

Зразки рису посівного кластеризуються зі зразками предкового виду *O. rufipogon* (рис. 3).



Рис. 2. Філодендрограма за результатами вирівнювання гомологів гена *Pi4* рису (Назви біля гілок є назвами зразків відповідно до NCBI)

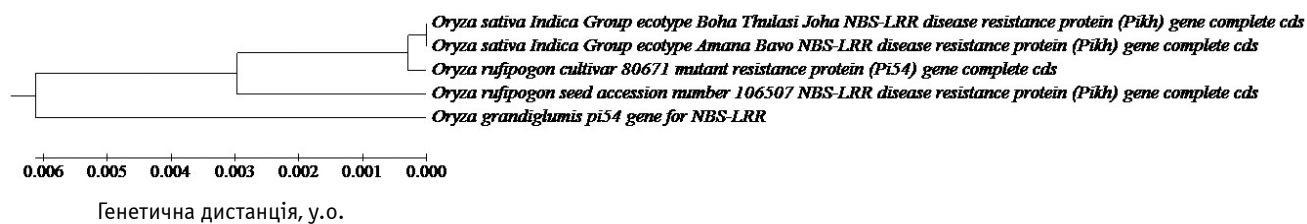


Рис. 3. Філодендрограма за результатами вирівнювання гомологів гена *Pi54* рису (Назви біля гілок є назвами зразків відповідно до NCBI)

Висновки

Для еволюції генів стійкості рису проти пірикуляріозу *Pi4*, *Pib* та *Pi54* характерним є диверсифікуючий добір, оскільки встановлено, що кількість несинонімічних замін у кодуючих послідовностях перевищує кількість синонімічних. Враховуючи те, що для рослини та паразита характерною є напружена ко-еволюція, а також значну швидкість адаптації та утворення нових рас патогена, цілком природно, що ці гени зазнають інтенсивного добору, спрямованого на диверсифікацію, тобто підвищення різноманіття з метою набуття стійкості проти нових рас патогена. Несинонімічні заміни мали схильність розміщуватися близько одна до одної, іноді утворюючи щось подібне до кластерів, тоді як деякі кодуючі ділянки або були надконсервативними, або містили переважно синонімічні заміни. Цей факт можна пояснити тим, що, як відомо з літературних джерел, продукти експресії цих генів мають здатність «розпізнавати» специфічні мікробіальні ефектори та мають специфічні ділянки, які саме й залучені в цьому процесі. Можливо, саме ці ділянки генів і детермінують ті амінокислотні послідовності, які визначають специфічність розпізнавання мікробіальних ефекторів і тому зазнають найінтенсивнішого добору.

Використана література

- Ashkani S., Rafii M., Shabanimofrad M. et al. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Front. Plant Sci.* 2015. Vol. 6. P. 1–14. doi: 10.3389/fpls.2015.00886
- Дудченко В. В. Державне законодавче регулювання рисового виробництва та його наукове забезпечення в Україні. Херсон: Айлант, 2015. 60 с.
- Marone D., Russo M., Laidt G. et al. Plant nucleotide binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, Iss. 4. P. 7302–7326. doi: 10.3390/ijms14047302.
- Integrated Rice Science Database Oryzabase. URL: <https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>
- Chen X., Ronald P. Innate immunity in rice. *Trends Plant Sci.* 2011. Vol. 16, Iss. 8. P. 451–459. doi: 10.1016/j.tplants.2011.04.003
- Divya B., Biswas A., Robin S. et al. Gene interactions and genetics of blast resistance and yield attributes in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Genet.* 2014. Vol. 93, Iss. 2. P. 415–424. doi:10.1007/s12041-014-0395-7
- Галаєв О. В., Галаєва М. В., Шпак Д. В. Виявлення расоспецифічних генів стійкості до пірикуляріозу *Pi-ta* та *Pi-b* у сортів рису (*Oryza sativa* L.). *Збірник наук. праць СГІ–НЦІС.* 2015. Вип. 25. С. 120–128.
- National Center for Biotechnology Information Database. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Smith S., Waterman M. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 147, Iss. 1. P. 195–197.
- Needleman S., Wunsch C. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 1970. Vol. 48, Iss. 3. P. 443–453.
- Edgar R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, Iss. 5. P. 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Neath P., Sokal R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman & Co, 1973. 573 p.
- Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. W., Muse S. V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics.* 2005. Vol. 21, Iss. 5. P. 676–679. doi: 10.1093/bioinformatics/bti079
- Muse S. V., Gaut B. S. A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol. Biol. Evol.* 1994. Vol. 11, Iss. 5. P. 715–724.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 1981. Vol. 17, Iss. 6. P. 368–376.
- Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 2005. Vol. 22, Iss. 5. P. 1208–1222. doi: 10.1093/molbev/msi105

References

- Ashkani, S., Rafii, M., Shabanimofrad, M., Miah, G., Sahebi, M., Azizi, P., ... Nasehi, A. (2015). Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Front. Plant Sci.*, 6, 1–14. doi:10.3389/fpls.2015.00886
- Dudchenko, V. V. (2015). *Derzhavne zakonodavche rehulivannia rysovoho vyrobnytstva ta yoho naukove zabezpechennia v Ukraini* [State legislative regulation of rice production and its scientific support in Ukraine]. Kherson: Ailant. [in Ukrainian]
- Marone, D., Russo, M., Laidt, G., De Leonardis, A., & Mastrangelo, A. (2013). Plant nucleotide binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(4), 7302–7326. doi: 10.3390/ijms14047302.
- Integrated Rice Science Database Oryzabase. Retrieved from <https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>
- Chen, X., & Ronald, P. (2011). Innate immunity in rice. *Trends Plant Sci.*, 16(8), 451–459. doi: 10.1016/j.tplants.2011.04.003
- Divya, B., Biswas, A., Robin, S., Rabindran, R., & Joel, A. (2014). Gene interactions and genetics of blast resistance and yield attributes in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Genet.*, 93(2), 415–424. doi: 10.1007/s12041-014-0395-7
- Halaiev, O., Halaieva, M., & Shpak, D. (2015). Detection of race-specific genes of resistance to pyriculariosis *Pi-ta* and *Pi-b* in rice varieties (*Oryza sativa* L.). *Zbirnyk naukovykh prats SHI–NTsNS* [Collected scientific articles of PBGI–NCSCI], 25, 120–128. [in Ukrainian]

8. National Center for Biotechnology Information Database. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
9. Smith, S., & Waterman, M. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.*, 147(1), 195–197.
10. Needleman, S., & Wunsch, C. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 48(3), 443–453.
11. Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32(5), 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
12. Sneath, P., & Sokal, R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman & Co.
13. Kosakovsky Pond, S. L., Frost, S. D. W., & Muse, S. V. (2005). HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, 21(5), 676–679. doi: 10.1093/bioinformatics/bti079
14. Muse, S. V., & Gaut, B. S. (1994). A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol. Biol. Evol.*, 11(5), 715–724.
15. Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17(6), 368–376.
16. Kosakovsky Pond, S. L., & Frost, S. D. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.*, 22(5), 1208–1222. doi: 10.1093/molbev/msi105

УДК 633.15.631.527

Бондаренко Е. В.¹, Слищук Г. И.², Волкова Н. Э.^{2*} Биоинформатический анализ генов риса посевного (*Oryza sativa* L.), ассоциированных с устойчивостью к пирикулярриозу // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017. Т. 13, № 3. С. 263–268. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110708>

¹Институт риса НААН Украины, с. Антоновка, Скадовский р-н, Херсонская обл., 75705, Украина

²Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения, ул. Овидиопольская дорога, 3, г. Одесса, 65036, Украина, *e-mail: natavolki@ukr.net

Цель. Исследовать полиморфизм генов устойчивости риса посевного к пирикулярриозу биоинформатическими методами. **Методы.** Глобальное и локальное выравнивание нуклеотидных последовательностей, филогенетический анализ, тест HyPhy. **Результаты.** Для гена *Pib* установлены многочисленные однонуклеотидные замены и делеции 1–3 п. н. Исследована филогения данного гена; найдены гомологи как у разных видов риса, так и у других злаковых, что свидетельствует о возможности кодирования ими белков, «распознающих» эффекторы фитопатогенов, т. е. данные гомологи могут быть вовлечены в обеспечение устойчивости к фитопатогенам. Для гена *Pi4* характерны однонуклеотидные замены, инсерции и делеции; количество несинонимичных замен превышает количество синонимических. Вариабельность гена *Pi54* значительно ниже, чем генов *Pi4* и *Pib*. Преобладающими видами полиморфизма являются однонуклеотидные замены и индели небольшого размера. Установлено,

что несинонимичные замены в генах *Pi54*, *Pi4* и *Pib* имели склонность располагаться близко друг к другу, иногда образуя кластеры, в то время как некоторые кодирующие участки или были сверхконсервативными, или содержали преимущественно синонимичные замены. На филогенетических образцах риса посевного кластеризуются с образцами предковых дикорастущих видов. **Выводы.** Для эволюции генов устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi4*, *Pib* и *Pi54* характерен диверсифицирующий отбор. Учитывая, что для растения и паразита свойственна напряженная коэволюция, значительная скорость адаптации и создания новых рас патогена, эти гены подвергаются интенсивному отбору, направленному на повышение разнообразия с целью приобретения устойчивости к новым расам патогена.

Ключевые слова: гены *Pib*, *Pi54*, *Pi4*, выравнивание последовательностей, филогенетический анализ, эволюция, однонуклеотидный полиморфизм, индели.

UDC 633.15.631.527

Bondarenko, K. V.¹, Slisichuk, H. I.², & Volkova, N. E.^{2*} (2017). Rice (*Oryza sativa* L.) blast resistance genes bioinformatic analysis. *Plant Varieties Studying and Protection*, 13(3), 263–268. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110708>

¹Institute of rice of NAAS of Ukraine, Antonivka, Skadovsk district, Kherson region, 75705, Ukraine

²Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, 3 Ovidiopska doroga Str., Odesa, 65036, Ukraine, *e-mail: natavolki@ukr.net

Purpose. To investigate rice blast resistance genes polymorphism by using bioinformatic methods. **Methods.** Global and local nucleotide alignment, phylogenetic analysis, HyPhy test. **Results.** For *Pib* gene, numerous single nucleotide substitutions and deletions of 1–3 bp were established. The phylogeny of this gene has been studied and homologues have been found both in various rice species and in other cereals. These sequences can encode proteins that «recognize» the phytopathogens effectors, and can also be associated with resistance to phytopathogens. The *Pi4* gene is characterized by single nucleotide substitutions, insertions and deletions; the number of non-synonymous substitutions exceeds the number of synonymous ones. The *Pi54* gene variability is significantly lower than that of the *Pi4* and *Pib* genes. The predominant types of polymorphism were single nucleotide substitutions and small-sized indels. It was found that non-synonymous substitutions in *Pi54*, *Pi4* and *Pib* genes

were in close proximity, sometimes forming clusters, while some coding regions were either superconservative or contained predominantly synonymous substitutions. On phylodendrograms, cultivated rice samples were clustered with samples of ancestral wild-growing species. **Conclusions.** Evolution of the rice blast resistance genes *Pi4*, *Pib* and *Pi54* is characterized by diversification selection. Considering that tense coevolution and significant rate of adaptation and creation of new pathogen races are typical for a plant and a parasite, these genes are subjected to intensive selection aimed at increasing diversity for obtaining the resistance to new races of the pathogen.

Keywords: Genes *Pib*, *Pi54*, *Pi4*, sequence alignment, phylogenetic analysis, evolution, single nucleotide polymorphism, indels.

Надійшла / Received 12.05.2017
Погоджено до друку / Accepted 11.07.2017