

На правах рукописи

ДУБИНА ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

**ДНК-ТЕХНОЛОГИИ
(МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ) В СЕЛЕКЦИИ РИСА И
СЕМЕНОВОДСТВЕ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР**

Специальность: 06.01.05 - Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Краснодар, 2019

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» (ФГБНУ «ВНИИ риса»).

**Научный
консультант:**

Гаркуша Сергей Валентинович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»

**Официальные
оппоненты:**

Чесноков Юрий Валентинович, доктор биологических наук, директор ФГБНУ "Агрофизический научно-исследовательский институт"

Казакова Алия Сабировна, доктор биологических наук, профессор кафедры агрономии и селекции сельскохозяйственных культур Азово-Черноморского инженерного института ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет»

Щеглов Сергей Николаевич, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры генетики, микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Университет»

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко»

Защита диссертации состоится «03» сентября 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.026.01, созданного на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» по адресу: 350921. г. Краснодар, пос. Белозёрный, 3, тел./факс: 8(861) 229-41-49, e-mail: arri_kub@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ВНИИ риса» и на сайте vniirice.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. биол. наук



Чижикова Светлана Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Устойчивое наращивание конкурентоспособной сельскохозяйственной продукции при сокращении и потреблении ресурсов и затрат возможно за счёт ускорения селекционного процесса. В связи с этим актуальное значение приобретают новейшие биотехнологические подходы и молекулярно-генетические методы.

Ввиду того, что пирикулярриоз (возбудитель - *Pyricularia oryzae* Cav.) считается одним из наиболее вредоносных заболеваний риса во всём мире, сорняки конкурируют с культурой за свет, минеральное питание и пространство, а низкие положительные температуры в период прорастания семян и образования всходов оказывают отрицательное действие на потенциальную продуктивность сортов, ускоренное создание устойчивых генотипов к данным стрессорам при использовании молекулярно-генетических маркеров наряду с повышением урожайности является весьма актуальным.

Актуально использование ДНК-технологий и в изучении молекулярно-генетической структуры грибных фитопатогенов для разработки стратегии иммуногенетической защиты от болезней, сочетающей в себе экологичность, ресурсо- и энергосбережение (Дубина и др., 2017 в), а также в семеноводстве «гетерозисных» культур при определении уровня гибридности коммерческих партий семян, который зачастую проводится традиционными методами «грунт-контроля» по морфологическим признакам, зависящим от условий окружающей среды и требующим значительных затрат времени и посевных площадей. Это способствует повышению качества получаемых семян, конкурентоспособности и импортозамещению.

Цель работы - разработать на основе методов молекулярного маркирования комплексную систему идентификации генов устойчивости к био- и абиотическим стрессорам у риса для ускоренной селекции, а также для изучения генетической структуры грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav. и оценки уровня гибридности овощных культур для их эффективного семеноводства.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи:**

1. Провести введение эффективных для юга России генов устойчивости к пирикулярриозу в отечественные высокопродуктивные сорта риса. Получить F₁-поколение, а затем беккросные самоопыленные линии. По результатам ДНК-анализа провести отбор генотипов

гибридных растений, имеющих целевые гены в гомозиготном состоянии, и внедрить их в селекционный процесс.

2. Выполнить объединение генов устойчивости к пирикулярриозу для диверсификации генофонда риса. Получить генотипы с 2-5 генами *Pi* и внедрить их в селекционный процесс. Разработать мультипраймерные системы по идентификации одновременно 2-х генов резистентности в одном генотипе риса.

3. Провести полевую апробацию полученного селекционного материала на устойчивость к пирикулярриозу (фитопатологический тест) и выполнить его оценку по хозяйственно – ценным признакам в питомниках, согласно схемам селекционного процесса. Выделить перспективные формы и лучшие по результатам испытаний передать в ГСИ.

4. Изучить биоразнообразие высоковариабельного грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav. методом молекулярного (микросателлитный анализ) маркирования. Провести генотипирование выделенных на территории юга России штаммов патогена на основе полиморфизма 41 микросателлитного локуса ДНК патогена. По результатам микросателлитного анализа создать базу данных, содержащую микросателлитные профили изученных штаммов патогена, для контролирования изменчивости патотипа фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. на территории юга России.

5. Определить гены (а)вирулентности фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. юга России на основе фитопатологического тестирования с использованием Международного набора сортов-дифференциаторов для повышения эффективности селекционных программ по созданию резистентных к пирикулярриозу сортов риса.

6. Создать селекционный материал риса с геном толерантности к длительному затоплению (*Sub1A*) как фактору борьбы с сорными растениями. Оценить возможность применения SSR-маркеров для идентификации целевого гена в генотипах гибридных растений. Определить их микросателлитный полиморфизм на родительских формах. Отобрать высокополиморфные SSR и установить их сцепление с геном *Sub1A*. Создать селекционный материал риса с совмещенными генами устойчивости к пирикулярриозу (*Pi*) и толерантности к длительному затоплению (*Sub*) на основе методов ПЦР с использованием SSR-маркеров.

7. Усовершенствовать методическую схему создания высокопродуктивных сортов риса, устойчивых к пониженным положительным температурам в фазу прорастания семян на основе методов молекулярного маркирования. Выявить полиморфизм

микросателлитных молекулярных маркеров по данному признаку на родительских формах. Отобрать высокополиморфные SSR. С их использованием провести ДНК-анализ гибридных растений риса и отобрать растения, имеющие в генотипе донорные аллели. Установить сцепление отобранных SSR с признаком устойчивости к пониженным положительным температурам в период прорастания семян.

8. Разработать методическую схему оценки генетической однородности семян гибридов F₁ капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) и перца сладкого (*Capsicum annuum* L.), основанную на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сорта и исходный материал риса с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-40*, *Pi-2*, *Pi-33*; толерантности к длительному затоплению *Sub1A*; устойчивости к низким положительным температурам в период прорастания и всходов семян риса, а также селекционный материал риса с совмещёнными генами устойчивости к пирикулярриозу (*Pi*) и толерантностью к длительному затоплению (*Sub*), созданный на основе совокупности современных биотехнологических подходов (молекулярное маркирование) и классической селекции.

2. Мультипраймерные системы, позволяющие за одну реакцию амплификации в одной пробирке идентифицировать в гибридных растениях с пирамидированными генами резистентности к пирикулярриозу одновременно два (*Pi-1+Pi-2*, *Pi-ta+Pi-b*) гена устойчивости, что значительно сокращает время и затраты на ПЦР-анализ, а также повышает эффективность метода молекулярного маркирования.

3. «ДНК-паспорта» штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav., выделенных на территории юга России, на основе полиморфизма 41 микросателлитного локуса ДНК патогена.

4. База данных, содержащая микросателлитные профили изученных штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., а также их морфолого-культуральные признаки и географическую принадлежность для мониторинга и контроля изменчивости патотипов патогена.

5. Эффективные ДНК-маркеры для идентификации аллельного состояния гена *Sub1A*, сцепленного с признаком толерантности к длительному затоплению как фактору борьбы с сорной растительностью, а также информативные SSR-маркеры для идентификации донорных аллелей толерантности к низким положительным температурам в период прорастания и всходов семян риса.

6. Методические схемы оценки генетической однородности семян гибридов F₁ капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) и перца сладкого (*Capsicum annuum* L.), основанные на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров.

Научная новизна исследований. Впервые в селекционной практике риса в России методом маркерной селекции, на основе отечественной генплазмы созданы сорта риса Альянс, Ленарис, Капитан с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*, сорт риса Пируэт с тремя генами устойчивости к пирикулярриозу (*Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*), Пентаген с пятью генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, линии риса КП-575, КП-153 и КП-154 с геном *Pi-2*, которые готовятся для передачи на Государственное сортоиспытание. Кроме того, создано более 1500 селекционных форм риса с генами резистентности к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-40*, которые при фитопатологическом тестировании оценены как устойчивые к краснодарской популяции патогена *P. oryzae*.

Впервые разработаны мультипраймерные системы для идентификации двух генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*, *Pi-ta+Pi-33*, *Pi-ta+Pi-b*, позволяющие в течение одной ПЦР определять в гибридных растениях с пирамидированными генами резистентности к пирикулярриозу одновременно два гена устойчивости к патогену. Это сокращает время и затраты на ПЦР-анализ, а также повышает эффективность используемого метода.

Определены эффективные гены резистентности к пирикулярриозу для юга России, которые рекомендованы практической селекции для программ по созданию устойчивых генресурсов риса.

Проведена генетическая паспортизация штаммов патогена *P. oryzae*, выделенных из гербарного материала с признаками поражения болезнью, собранного в рисовых агрофитоценозах на территории юга России. Создана база данных, которая содержит информацию об аллельном разнообразии ДНК-локусов изученных штаммов «Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России» (Свидетельство № 2019620149 от 24.01.2019 г.).

Впервые в селекционной практике риса в России на основе метода молекулярного маркирования создан селекционный материал риса, совмещающий в себе гены устойчивости к пирикулярриозу и гены толерантности к длительному затоплению как фактору борьбы с сорной растительностью. Проведен анализ сонаследования SSR-маркера Sub1A203 с геном *Sub1A*.

При совместной работе селекционеров, физиологов и биотехнологов создан селекционный материал, устойчивый к

низким положительным температурам в период прорастания семян риса. Отобрано два информативных SSR-маркера RM24545 и RM569, которые показали высокий уровень полиморфизма между устойчивыми и восприимчивыми сортами риса.

Впервые на основе методов ПЦР разработана методическая схема контроля генетической однородности семян гибридов F_1 капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) и перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) на образцах коллекции ВНИИ риса.

Теоретическая и практическая значимость исследований.

Созданные сорта и линии риса с генами устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды значительно снижают затраты рисопроизводителей при их возделывании. Они позволяют сокращать использование гербицидов и фунгицидов, а также избежать загрязнения экосистем и получать экологически чистую сельхозпродукцию.

Сорта и линии риса с тремя и пятью пирамидированными генами резистентности к патогену являются ценным исходным материалом, который можно использовать как донорный для создания устойчивых к пирикулярриозу сортов риса.

Разработанные мультипраймерные системы для генов *Pi-1+Pi-2*, *Pi-ta+Pi-33*, *Pi-ta+Pi-b*, позволяющие за одну реакцию амплификации идентифицировать в гибридных растениях с пирамидированными генами резистентности к пирикулярриозу одновременно два гена, значительно сокращают время и затраты на ПЦР-анализ, что повышает экономическую эффективность маркер-вспомогательной селекции (MAS- Marker Assisted Selection).

Повышение холодостойкости у отечественных сортов риса в период прорастания семян и образования всходов позволит начинать посев риса в более ранние сроки, используя для вегетации растений благоприятный по температуре период, получать дружные и оптимальные по густоте всходы, что даёт возможность в большей мере реализовать потенциальную продуктивность сортов.

Созданная база данных, содержащая информацию о полиморфизме ДНК-локусов штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., выделенных с пораженных растений риса, может быть использована фитопатологами для прогнозирования появления новых рас и патотипов возбудителя пирикулярриоза, а также является необходимой теоретической базой для диверсификации и создания генисточников с длительной устойчивостью к заболеланию.

Информация об эффективных генах устойчивости к пирикулярриозу является важной и необходимой для селекционеров при

подборе доноров как с одиночными, так и с комбинацией генов *Pi* в программах по созданию резистентных сортов риса.

Разработанные схемы контроля генетической однородности размножаемых коммерческих партий семян гибридов F_1 перца сладкого и капусты белокочанной на основе методов ПЦР позволяют с высокой точностью оценить их генетическую однородность в год производства семян, что является актуальным и важным для оригинатора, а также для повышения конкурентоспособности отечественных гибридов данных культур и их импортозамещения.

Методология и методы исследований. Методологической основой диссертационной работы являлся системный анализ в планировании и проведении исследований в области биотехнологии, генетики, селекции, семеноводства, защиты растений и фитопатологии. При выполнении лабораторных и полевых экспериментов применялся комплексный подход, использовались как общепринятые, так и оригинальные методы исследований. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 10.0 for Windows.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Исследования, представленные в диссертационной работе достоверны, что подтверждается многолетними данными, которые получены в рамках государственного задания на 2007-2012 гг. по темам 04.03.02.02 «Создать устойчивые к пирикуляриозу линии риса с использованием методов ДНК-маркирования» и 04.05.03.02. «Изучить на основе ДНК-анализа сортовые качества семян овощных культур для совершенствования семеноводческого процесса», а также Программ фундаментальных научных исследований Государственной академии наук на 2013 – 2020 гг.: раздел 10 «10.4. «Растениеводство»: подраздел 150 по теме № 0685-2014-0039: «Создать новые линии риса, устойчивые к пирикуляриозу с использованием методов маркерной селекции»; подраздел 149 по теме № 0685-2014-0037 «Разработать методику оценки сортовых качеств семян перца сладкого, капусты белокочанной на основе молекулярно-генетического подхода для совершенствования семеноводческого процесса».

Достоверность результатов исследований также подтверждается статистической обработкой полученных данных, широким обсуждением их в печати и на научных конференциях, форумах различного уровня. По результатам полученных исследований опубликовано 95 научных работ, 76 из которых

входит в базу РИНЦ, из них 45 - в периодических изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе 1 научная работа, входящая в базу данных статей Web of Sciences и 3 – Scopus, 1 методические рекомендации. Экспериментальные данные, представленные в работе, получены лично соискателем и в результате совместных исследований, что отражено в соавторстве публикаций.

Результаты исследований ежегодно докладывались и были одобрены на заседаниях методической комиссии и учёного Совета ФГБНУ «ВНИИ риса» в 2007-2018 гг., а также представлены на научно-практической конференции «Современные иммунологические исследования, их роль в создании новых сортов и интенсификации растениеводства (Москва, 2009); III Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов «Инновационные процессы в АПК» (Москва, 2011 г.); XII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». (Москва, 2012 г.); Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014 г.); Международном конгрессе по рису (Тайланд, 2014 г.); научно-образовательной конференции молодых ученых «Инновационные биотехнологии в развитии АПК» (Краснодар, 2015 г.); Круглом столе по Международному сотрудничеству с Республикой Вьетнам (Ханой, 2016 г.); Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС» (Москва, Сколково, 2016 г.); IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности» (Москва, 2018 г. в рамках Международного форума «Неделя Национальной Безопасности») и др.

В 2010 г. научная работа по созданию резистентных сортов риса с генами устойчивости к пирикулярриозу была представлена на Всероссийском выставочном центре (ВВЦ, г. Москва), в рамках научной конференции «Научно-техническое творчество молодёжи». Получена золотая медаль. В 2012 г. - получен диплом Российской академии сельскохозяйственных наук за лучшую завершённую научную разработку в конкурсе молодых ученых. В этом же году получена премия Администрации Краснодарского края в области науки за 2012 год. В 2017-2018 гг. на 19-й и 20-й Российской агропромышленной выставке «Золотая Осень» в номинации «Инновационные разработки в области агробиотехнологии» соискатель получила золотые медали.

В 2018 году соискатель в соавторстве с коллегами института стала лауреатом премии Правительства РФ в области науки и техники за работу «Создание и внедрение устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам генетических ресурсов риса с использованием постгеномных и клеточных технологий для решения проблемы импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны».

Связь работы с крупными научными программами. Исследования проводились в рамках проектов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) № 16-44-230178 «р_а»; РФФИ № 16-44-230435 «р_а» в 2016-2018 гг. и контрактов по программе «У.М.Н.И.К.» (№3р от 4 марта 2010 г. и №9557р/14195 от 4 июля 2011 года).

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя состоит в теоретической подготовке и разработке плана исследований, постановке и проведении научных экспериментов, опытов, синтезе и анализе полученных результатов, в частности: непосредственном участии в проведении научных исследований, сборе экспериментальных данных, их анализе и обработке; апробации результатов исследований; подготовке и опубликовании результатов исследований в научных изданиях, включая рекомендуемые перечнем ВАК Минобрнауки РФ, WOS и Scopus.

Экспериментальные результаты получены автором лично при совместном сотрудничестве с селекционерами, фитопатологами, физиологами ФГБНУ «ВНИИ риса», коллегами из ФГБНУ «Аграрный научный центр "Донской"» (г. Зерноград) и ФГБНУ «ВНИИСБ» (г. Москва).

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, включающих: обзор литературы, описание использованных материалов и методов для исследований, результаты и их обсуждение; заключения; выводов; предложений для практической селекции и семеноводства; списка литературы и приложений. Содержит 275 страниц машинописного текста, включающих 20 таблиц и 74 рисунка. Список использованной литературы включает 246 источников, в том числе 167 – иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, определены научная новизна, теоретическая и практическая

значимость работы, степень достоверности и апробация результатов, личный вклад автора, состав и структура диссертационной работы.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе освещаются основные понятия молекулярно-генетических маркеров, их типы, классы. Описывается преимущество и перспективы использования ДНК-маркеров, основанных на полимеразной цепной реакции, для изучения генетических источников сельскохозяйственных растений с целью их использования в селекционных программах по созданию сортов и гибридов с хозяйственно-ценными признаками, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам. Приводятся примеры успешного применения зарубежными коллегами маркер-опосредованной селекции в создании высокопродуктивных сортов риса с заданными характеристиками. Описываются механизмы устойчивости риса к пирикулярриозу, толерантности к длительному затоплению и низким положительным температурам в период прорастания семян риса. Приведён обзор по генам устойчивости к данным стресс-факторам. Кроме того, поднимаются вопросы о необходимости использования систем молекулярного маркирования для контроля семенного материала овощных культур.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии и молекулярной биологии, на вегетационных и лизиметрических площадках Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» в 2007-2018 гг. (г. Краснодар, пос. Белозёрный). Полевые опыты проводили на рисовой оросительной системе ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса в 2010 – 2018 гг. (Краснодарский край, Красноармейский район, пос. Рисоопытный).

Исходный материал.

В программе по созданию устойчивых к пирикулярриозу сортов риса в качестве доноров использовались линии риса C104-LAC, C101-A-51- LAC, C101-LAC, IR 83260-2-10-5-2-1-B, BL-1, IR-36, которые имеют гены широкого спектра устойчивости *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-1+Pi-33*, *Pi-40*, *Pi-b*, *Pi-ta*, соответственно (Deng et al., 2006). В качестве материнских форм использовались российские сорта риса Флагман, Снежинка, Боярин и крупнозерные скороспелые линии ВНИИР9678, ВНИИР5242 и КП-25-14.

В рамках программы по созданию толерантных к длительному затоплению сортов риса донорами для введения гена *Sub1A* в отечественную генплазму риса стал сорт зарубежной селекции Khan Dan (Вьетнам). В качестве материнской формы для гибридизации были подобраны скороспелые сорта и линии риса с периодом вегетации не более 100-105 дней: сорт риса Новатор и также крупнозерные скороспелые линии риса ВНИИР9678, ВНИИР5242 и КП-25-14.

В программе по созданию холодоустойчивых сортов риса использованы сорта – доноры из Южной Кореи Odaebyeo, Jinbubyeo, а также отечественные сорта риса Кубань 3 и Северный.

В рамках программы по разработке методической схемы оценки генетической однородности гибридов F_1 овощных культур на основе методов ПЦР использовались генотипы капусты белокочанной и перца сладкого, используемые в селекционной работе отделом овощекартофелеводства ФГБНУ «ВНИИ риса».

Объектом исследований также стали штаммы *Pyricularia oryzae* Sav., выделенные с поражённых растений сортов риса, собранных в рисовых агрофитоценозах юга России.

Методы и методики исследований.

При проведении молекулярно-генетических исследований геномную ДНК из клеток растений и мицелия гриба выделяли по методу Murray and Thompson, используя в качестве основного лизирующего буфера цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ; Murray and Thompson, 1980).

Аmplификацию проводили в ДНК-амплификаторе «Терцик» и «Bio Rad», оптимизировав при этом условия ПЦР.

Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при напряжении 3,9 - 4,5 В/см. (Поморцев и др., 2004).

Визуализацию результатов электрофоретического разделения продуктов ПЦР проводили с использованием бромистого этидия (BrEt) в УФ свете и фотографировали цифровой фотокамерой. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы: 100 bp+1,5 Kb +3Kb (СибЭнзим).

Гибридизацию материнских форм растений риса проводили методом пневмокастрации, опыление «Твелл»-методом (Лось, 1987).

Донорные аллели генов *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40* визуализировали тесно сцепленными с ними фланкирующими микросателлитными маркерами (сиквенс взят из базы данных NCBI, доступной на web-

странице <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> (Senior M., et al., 1996). Для идентификации в гибридных растениях генов *Pi-ta*, *Pi-b* использовали внутривидовые молекулярные маркеры (Шилов, 2016).

Для идентификации гена *Sub1A*, а также донорных аллелей устойчивости к низким положительным температурам в период прорастания семян риса использовали праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров. Их сиквенс также взят из базы данных NCBI. Установлено, что эти маркеры тесно сцеплены с данными признаками (Takeuchi et al., 2001).

Для изучения биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. был апробирован 41 SSR-маркер из базы данных генетических ресурсов NCBI (Adreit et al., 2007). Данные маркеры высоко полиморфны (73% локуса), что позволяет использовать их для геномного картирования, популяционного изучения и ДНК «паспортизации» возбудителя пирикулярриоза риса по всему миру (Ahn et al., 2000).

Для молекулярно-генетических исследований *Brassica oleracea* L. и *Capsicum annuum* L. использовали SSR из Международной базы данных <http://www.VegMarks> (Minamiyama et al., 2006 ; Hanacek et al., 2009).

Оценка донорных линий риса и селекционных образцов на устойчивость к местной популяции *Pyricularia oryzae* Cav. проводилась в полевых условиях инфекционного питомника рисовой оросительной системы ФГБНУ «ВНИИ риса» в соответствии с методическими указаниями (Аверьянов и др., 1990; Фролова и др., 1983) и на опытных полевых полигонах ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса в 2010-2018 гг. В качестве восприимчивого контроля использовали сорта риса Волгоградский и Победа 65, а устойчивого контроля - сорт риса Авангард.

Учёт степени поражения растений проводили на 14 день после инокуляции, согласно экспресс-методу оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу. Оценку осуществляли, учитывая два показателя: тип реакции (в баллах) и степень поражения (в процентах), используя при этом десятибалльную шкалу Международного института риса (Коломиец Т.М., 1990):

- устойчивые – 0-1 баллов - отсутствие поражения, мелкие коричневые пятна, покрывающие менее 25% общей поверхности листьев; среднеустойчивые – 2-5 баллов - типичные пирикулярриозные пятна эллиптической формы, 1-2 см длиной, покрывающие 26-50% общей поверхности листьев; неустойчивые – 6 - 10 баллов - типичные

пирикулярные пятна эллиптической формы, 1-2 см длиной, покрывающие 51 и более % общей поверхности листьев.

Интенсивность развития болезни (ИРБ, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИРБ} = \sum (a*b) / n*9,$$

где - ИРБ - интенсивность развития болезни, %; $\sum (a*b)$ – сумма произведений количества инфицированных растений, умноженных на соответствующий балл поражения, n - число учтенных растений, шт.

В зависимости от балла поражения все сорта условно делили на 4 группы: устойчивый тип, промежуточный, восприимчивый, сильновосприимчивый.

Для оценки по хозяйственно-ценным признакам и устойчивости к пирикуляриозу исследуемые образцы риса высевали в ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса на рисовой оросительной системе по предшественнику многолетние травы. Все агротехнические работы выполнялись по общепринятой методике ВНИИ риса (Доспехов, 1979; Сметанин и др., 1972).

Посев опытных образцов проводили ежегодно в первой декаде мая, согласно схемам селекционных питомников:

Селекционный питомник закладывался однорядковыми делянками 2,5 м с нормой высева 100 зерен в рядок и междурядьями 22 см общей площадью 0,6 м². Сорт-стандарт Флагман высевали через 50 номеров изучаемых образцов риса. Уборку проводили вручную, отбирая метёлки у растений, имеющих агрономически-ценные признаки (период вегетации не более 125 дней, высота растений до 100 см и т.д.).

В **контрольном питомнике** изучаемые образцы риса высевали парностандартным дактиль-методом делянками 6,4 м² в двукратной повторности с нормой высева 6-7 млн. всхожих зёрен на 1 га или 400 всхожих зерен на 1 м². Сорт-стандарт Флагман высевали через 10 делянок. В период вегетации растений риса проводили фенологические наблюдения. Уборку семенных делянок проводили вручную, серпом. В делянках, где отмечалось расщепление по морфометрическим показателям и резистентности к пирикуляриозу, отбирали растения с положительными хозяйственно-ценными признаками для повторного изучения.

В **конкурсном сортоиспытании** сортообразцы размещали на опытных делянках площадью 20 м² методом рендомизированных повторений в 4-х кратной повторности с нормой высева 7 млн. всхожих семян на гектар. В качестве стандартов использовали сорт Флагман. В течение вегетации проводили фенологические наблюдения по принятой во ВНИИ риса методике. Учитывали сроки фаз вегетации до цветения и полной спелости. В фазу полной спелости проводили оценку

полегаяемости и осыпаемости (Практическое руководство, 1986). Перед уборкой проводили сортовую прополку каждой делянки с удалением нетипичных растений в делянках. После жесткой браковки лучшие сортообразцы, выделившиеся по урожайности и другим признакам, размножали и оценивали в производственных условиях. По результатам всестороннего изучения лучший сорт передавали на Государственное сортоиспытание.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 10.0 for Windows.

При расчёте соответствия опытных и теоретически ожидаемых результатов по каждому классу и всему расщеплению в целом использовался метод «хи-квадрата» (χ^2 ; Лобашев, 1969).

По результатам электрофоретического разделения продуктов ПЦР проводилась кластеризация изучаемых штаммов *P.oryzae* на основе сходства их SSR-профилей методом «Одиночных связей» (single linkage) с использованием программы STATISTICA 10,0.

Дискриминантный анализ использовали для оценки расстояний между сравниваемыми объектами (Клекка, 1989).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Селекция риса на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды

Среди факторов, лимитирующих урожай сельскохозяйственных культур, ведущее место занимают болезни, вредители и сорные растения. Преодолеть эти факторы можно путём создания и внедрения в сельскохозяйственное производство сортов, устойчивых к данным стресс-факторам.

3.1.1 Селекция риса на устойчивость к пирикулярриозу на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров

Начиная с 2007 года, на основе использования технологии ДНК-маркерной селекции (marker assisted selection – MAS - селекция с применением ДНК маркеров к генам интереса) методом гибридизации проведено введение генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40* в высокопродуктивные отечественные сорта риса, адаптированные к агроклиматическим условиям рисосеяния Краснодарского края. Эта стратегия была использована для повышения иммунитета отечественных сортов к заболеванию.

На рисунке 1 представлена схема переноса генов *Pi* в генотипы российских сортов риса из линий-доноров.

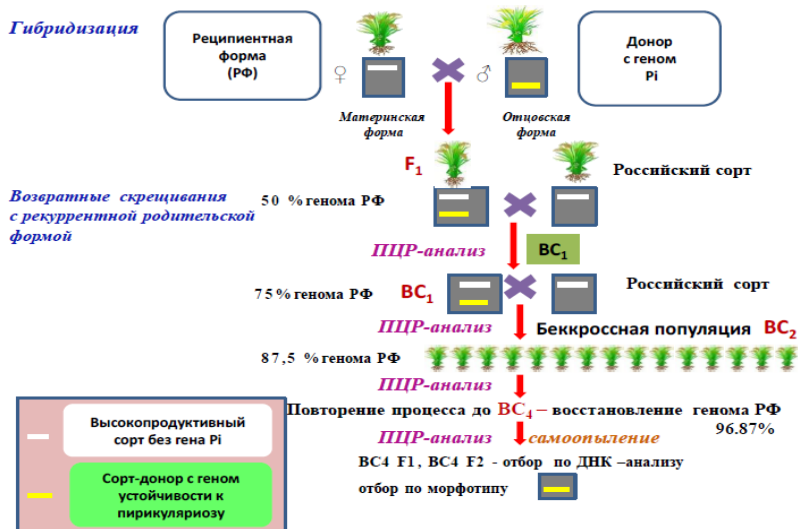


Рисунок 1 - Схема введения генов устойчивости к пирикулярриозу в отечественные сорта риса с помощью MAS

В результате гибридизации каждой комбинации было получено F_1 -поколение, которое использовали в возвратных скрещиваниях с реципиентными родительскими формами (отечественными сортами риса). Следует отметить, что растения F_1 имели высокую степень стерильности (до 95%). После проведения первой серии беккроссов в 2008 году в камерах искусственного климата получено BC_1 - и BC_2 -поколение. В BC_1 -популяциях фертильность возросла и в среднем составляла около 50%. Начиная с первого возвратного скрещивания, проводился маркерный контроль на присутствие переносимых донорных аллелей в гибридном потомстве. Из гибридных растений BC -популяций всех комбинаций выделялись образцы ДНК, которые оценивали на наличие переносимых аллелей методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью внутригенных молекулярных маркеров генов *Pi-ta*, *Pi-b* (Мяжгих 2009; Шилов и др., 2016, 2018) и микросателлитных маркеров, сцепленных с генами *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40*.

Отбирали растения, которые по результатам ДНК-анализа в генотипе имели донорный аллель гена устойчивости к патогену, а также отмечали те растения, которые показали наименьший период вегетации до цветения. Растения, в генотипе которых аллели устойчивости не были обнаружены, выбраковывали.

В полученных BC_2 -популяциях работа проводилась по той же схеме. Отобранные по молекулярным данным растения, несущие донорные аллели, вовлекали в следующий беккросс,

предварительно выбраковав формы с нежелательным морфотипом.

В 2009 году получены растения BC₃- и BC₄-поколения. Среди этих растений были отобраны формы с наименьшим вегетационным периодом и наибольшей фертильностью метёлки. По каждой комбинации было проведено четыре беккросса, поскольку известно, что восстановление генома рекуррентного родителя (RP) при возвратных скрещиваниях в BC₄ составляет 96,9 % (Jena et al., 2003).

С этапа BC₄F₁ (первое самоопыление растений риса, которое даёт возможность перевести донорный аллель в гомозиготное состояние), проводился индивидуальный отбор. Отбирали растения, наиболее близкие по морфотипу к реципиентной родительской форме и несущие, кроме того, донорные гены устойчивости к патогену в гомозиготном состоянии (Дубина и др., 2015 г.).

В результате работы на основе отечественных сортов риса получен большой объём предселекционного материала риса с генами резистентности к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-33*, *Pi-b*, *Pi-2*, *Pi-ta*, *Pi-40*, которые в 2010-2018 гг. изучались по комплексу морфологических и агрономически ценных признаков в полевых условиях в селекционных питомниках.

На рисунках 2, 3 представлены результаты ПЦР-анализа на наличие переносимых генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2* в высокопродуктивный отечественный сорт риса Флагман (рис. 2, 3).

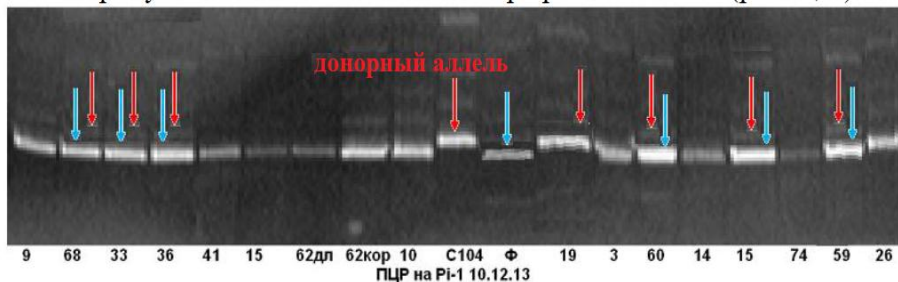


Рисунок 2 - Результаты ПЦР-анализа на наличие переносимого гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*

Примечание: 9...26 - анализируемые гибридные растения BC₄F₂ - популяции; Ф - сорт-реципиент Флагман; C104 - линия C104-LAC - донор гена *Pi-1*; красной стрелкой показан донорный аллель гена *Pi-1*, синей – рецессивный аллель; электрофоретические дорожки с красной и синей стрелками - гетерозиготы.

Из рисунка 2, где представлен анализ ДНК гибридных растений из BC₄F₂-поколения комбинации C104-LAC × Флагман,

видно, что растения под №№ 19, 26 имеют ген *Pi-1* в гомозиготном состоянии; растения 9, 41, 15, 62 дл, 3, 14, 74 имеют в генотипе аллель материнской формы и являются гомозиготами по рецессиву; растения под №№ 68, 33, 36, 10, 60, 15, 59 являются гетерозиготами. По данным ДНК-анализа из проанализированных 172 растений получено следующее соотношение: 43 растений имели в генотипах доминантный аллель целевого гена в гомозиготном состоянии, 90 – являлись гетерозиготами и 39 растений – гомозиготы по рецессиву, что соответствует Менделевскому расщеплению 1:2:1.

На рисунке 3 представлены результаты ПЦР-анализа на наличие переносимого гена устойчивости к пирикулярйозу *Pi-2* в высокопродуктивный сорт риса Флагман.

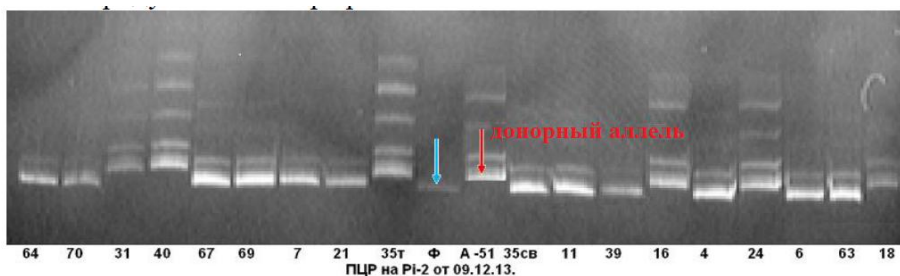


Рисунок 3 - Результаты ПЦР-анализа на наличие переносимого гена устойчивости к пирикулярйозу *Pi-2*

Примечание: 64...18 - анализируемые гибридные растения BC₄F₂-популяции; Ф – сорт-реципиент Флагман; А-51 - линия C101LAC-A-51-донор гена *Pi-2*; красной стрелкой показан донорный аллель гена *Pi-2*, синей – рецессивный аллель.

Из рисунка 3, видно, что растения под №№ 31, 40, 35т, 16, 24 и 18, полученные в комбинации C101-LAC-A-51 × Флагман, имеют в генотипе доминантный аллель гена *Pi-2*; растения 64, 70, 67, 69, 7, 21, 35св, 11, 39, 4, 6, 63 - гомозиготы по рецессиву. По результатам маркерного анализа из выборки 96 растений получено следующее соотношение: 22 гибридных растения имели в генотипе доминантный аллель гена *Pi-2* в гомозиготном состоянии, 47 – в гетерозиготном, 27 растений – гомозиготы по рецессиву, что также соответствует Менделевскому расщеплению 1:2:1. Из-за небольшого количества полученных семян в данной комбинации отбирали растения, имеющие в генотипе ген *Pi-2* в гомо- и гетерозиготном состоянии. После получения следующего поколения (самоопыление) гетерозиготные формы методом ПЦР оценивали на наличие в генотипе донорного аллеля гена *Pi-2*. Для дальнейшего

изучения по комплексу хозяйственно-ценных признаков отбирали растения с геном *Pi-2* в гомозиготном состоянии.

Аналогичные результаты были получены и на другие переносимые гены *Pi*.

С 2010 г. весь полученный предселекционный материал, согласно схемам селекционного процесса, изучался по комплексу хозяйственно-ценных признаков и устойчивости к пирикулярриозу в полевых условиях в ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса. В результате оценки и жесткой браковки на государственное сортоиспытание переданы: в 2017 году сорта риса Альянс с геном *Pi-ta* и Пируэт (*Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*); в 2018 году сорта риса Ленарис и Капитан с геном *Pi-ta*.

Однако результативная стратегия селекции на устойчивость к высоковариабельным грибным патогенам заключается в объединении нескольких эффективных генов устойчивости на генетической основе элитных сортов. Поэтому была выполнена программа по объединению генов устойчивости к пирикулярриозу. Проведена гибридизация полученных генотипов с интрогрессированными генами *Pi* между собой в различных их сочетаниях. В результате получен селекционный материал с генами *Pi-1+Pi-2*, *Pi-33+Pi-ta*, *Pi-ta+Pi-b*, *Pi-1+Pi-33*, *Pi-1+Pi-2+Pi-33*, *Pi-1+Pi-2+Pi-33+Pi-ta+Pi-b* (Дубина и др., 2015; Костылев и др., 2017).

3.1.2. Объединение генов устойчивости к пирикулярриозу и разработка мультипраймерных систем по их идентификации

Для повышения экономической эффективности маркерной селекции возникает необходимость выполнения исследований, направленных на разработку методических схем идентификации одновременно двух генов в одном генотипе за счет мультиплексной ПЦР. Это значительно снижает время и затраты на ПЦР-анализ.

На первом этапе при подборе ДНК-маркеров для надежной интерпретации ПЦР-продуктов и выявлении неспецифически амплифицируемых фрагментов учитывали температуру отжига вносимых в реакционную смесь пар праймеров; разницу в размерах ПЦР-продуктов, синтезируемых в ходе амплификации с праймерными парами (не менее 100 пар оснований) и самокомплементарность последовательностей праймеров. В результате всех модификаций подобраны оптимальные условия для проведения реакции амплификации. Результаты апробации комбинации пар праймеров, фланкирующих маркерные участки целевых генов *Pi-1* и *Pi-2*, представлены на рисунке 4.

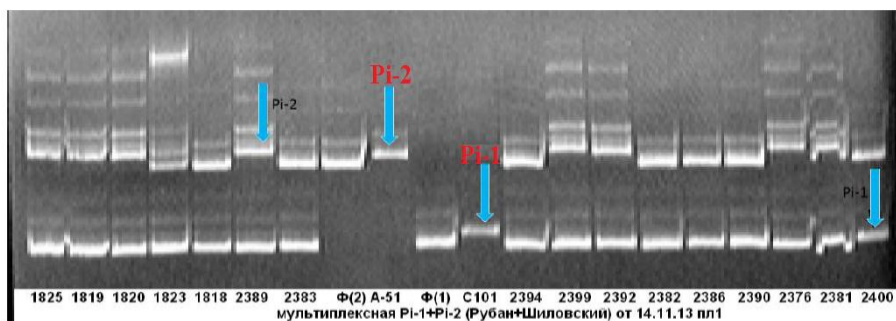


Рисунок 4 - Мультиплексная ПЦР на гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*

Примечание: 1825...2400 – гибридные растения; C101- линия C101LAC - донор гена *Pi-1*; A-51- линия C101LAC-A-51 - донор гена *Pi-2*; Ф – сорт Флагман.

Из электрофореграммы видно, что при проведении ПЦР с таким сочетанием молекулярных маркеров целевые продукты, специфичные для ДНК-маркеров искомым генов, надежно амплифицируются. Образец под № 2400 имеет доминантный аллель гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, остальные образцы, анализируемые на ген *Pi-1*, имеют аллель материнской формы (сорт Флагман); у образцов под №№ 1825-1820, 2389, 2399, 2392, 2376, 2381 с доминантным аллелем гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-2* присутствует специфичный для него ПЦР-продукт.

Аналогичный результат был получен и для комбинации ДНК-маркеров генов *Pi-33 + Pi-ta* (рис. 5).

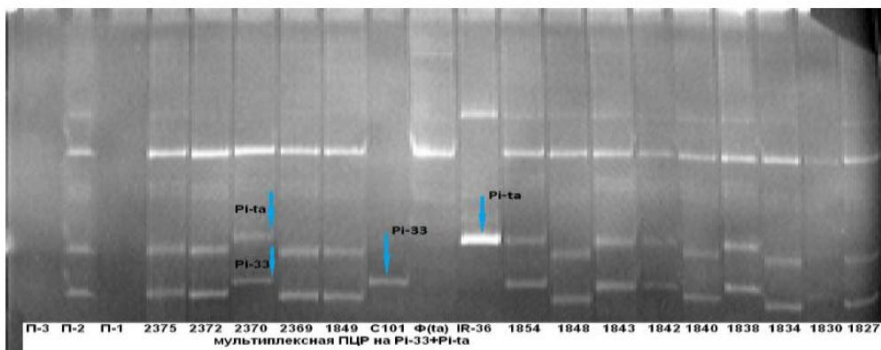


Рисунок 5 - Мультиплексная ПЦР генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-33+Pi-ta*

Примечание: 1827...2375 – гибридные растения; C101- линия C101LAC - донор гена *Pi-33*; IR-36 - линия-донор гена *Pi-ta*; Ф – сорт Флагман.

Из электрофореграммы видно, что при использовании разработанного протокола для постановки ПЦР амплифицируются оба фрагмента и не наблюдается ингибирование синтеза целевых фрагментов в мультиплексной комбинации праймеров ДНК-маркеров на гены *Pi-33+Pi-ta*. Образцы под №№ 1838, 1843 и 2370 имеют специфичные ПЦР-продукты генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-33* и *Pi-ta* в гомозиготном состоянии, и интенсивность амплификации их фрагментов одинаковая.

В ходе дальнейшей работы нами была апробирована и отобрана комбинация праймерных пар, которые содержат гены *Pi-ta+Pi-b* (рис. 6)

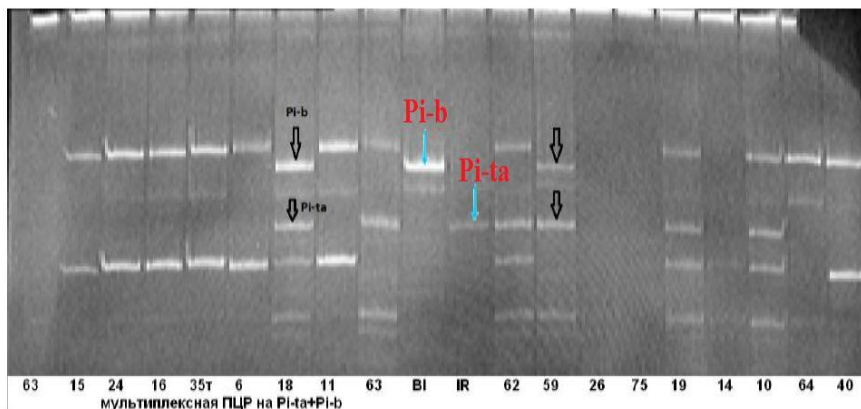


Рисунок 6 - Мультиплексная ПЦР, демонстрирующая гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta+Pi-b* в одном генотипе

Примечание: 63...40 гибридные растения; Bl- линия Bl-1 - донор гена *Pi-b*; IR - линия IR-36 - донор гена *Pi-ta*.

Из рисунка 6 видно, что при постановке ПЦР в данном сочетании молекулярных маркеров также амплифицируются оба фрагмента генов *Pi-ta* и *Pi-b* с одинаковой интенсивностью амплификации. Анализируемые гибридные образцы №№18, 59 и 60 имеют доминантный аллель генов *Pi-ta* и *Pi-b*.

Разработанная мультиплексная технология идентификации одновременно нескольких генов устойчивости к пирикулярриозу внедрена нами в систему маркерной селекции риса по созданию резистентных к патогену генресурсов риса. На основе её использования в 2018 году были отобраны и размножены беккроссные самоопыленные линии риса BC₄F₈ с пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*, *Pi-b+Pi-ta*, *Pi-33+Pi-ta*. Это значительно сокращает затраты расходных материалов, время на выполнение анализа образцов с указанными пирамидированными генами резистентности к *P.oryzae* и позволяет ускорить селекцию устойчивых сортов риса к пирикулярриозу.

3.1.3 Изучение селекционного материала с генами резистентности к пирикулярриозу по хозяйственно-ценным признакам и устойчивости к *Pyricularia oryzae* Cav.

Для диверсификации генофонда риса с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-40* получен исходный материал, который согласно схемам селекционного процесса изучался по хозяйственно-ценным признакам в ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса по предшественнику многолетние травы.

В селекционном питомнике (СП) ежегодно проходили оценку более 300 образцов риса с различным сочетанием генов *Pi* (*Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-b*, *Pi-ta*, *Pi-40*).

В контрольном питомнике (КП) первого и второго года по комплексу хозяйственно-ценных признаков ежегодно изучалось от 25 до 31 линии риса с вышеуказанными генами устойчивости к пирикулярриозу. После оценки и жесткой браковки в третий год испытаний выделилось 12 урожайных линий риса с генами *Pi*, устойчивых к краснодарской популяции *P.oryzae* Cav. Они адаптированы к условиям выращивания на юге России, имеют вегетационный период 105-120 дней, с высотой растений от 75 до 95 сантиметров. Некоторые формы имели слегка пониклую компактную метёлку, а некоторые – свечеобразную, компактную. Масса 1000 зёрен от 23 до 30 и более граммов.

В конкурсном сортоиспытании (КСИ) ежегодно изучались по морфометрическим показателям и устойчивости к пирикулярриозу от 6 до 12 сортообразцов. Характеристика некоторых из них представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика сортообразцов риса с генами устойчивости к пирикулярриозу КСИ 2016-2018 гг. в ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса

Линия/ сорт	Уро- жай- ность, т/га	Вегета- ционный период, дней	Высота растения, см	Масса 1000 зёрен, г	l/b зерна	Выход крупы, %	ИРБ, %
КП-171-14 (Альянс)	9.1	120	85.3	29.1	2.6	73.2	32.3
КП-30 (Ленарис)	10.6	115	77.8	30.4	2.6	72.3	16.7
КП-23 (Капитан)	9.1	115	75.6	30.2	2.4	71.2	21.3
Флагман (St)	8.1	116	91.0	26.7	1.9	71.6	59.1
НСР ₀₅	0.5	2.0	6.7	2.3	0.3	1.4	3.5

Примечание: l/b - отношение длины к ширине у зерновки; ИРБ- индекс развития болезни; St - стандарт.

Данные таблицы показывают, что растения изученных селекционных линий и сортообразцов адаптированы к условиям выращивания на юге России с периодом вегетации 115-120 дней. Растения имели высокую фертильность колосков метелки, короткостебельны (77-85 см), устойчивы к полеганию, а также к краснодарской популяции *P. oryzae*. Метёлка у них слегка пониклая, компактная, длиной 16 - 21 см. Зерно удлинённое (l/b – 2.3 – 2.4 – 2.6), масса 1000 зёрен около 30 и более граммов. Выход крупы – 71-73 %. При пересчете на 1 га формируют урожайность 9.0 -12.0 т зерна.

Сорт риса Альянс, созданный совместно с отделом селекции в 2017 году передан на Государственное сортоиспытание. Сорта риса Ленарис (рис. 7) и Капитан переданы на Государственное сортоиспытание в 2018 году. Семенной материал данных сортов передан в коллекцию исходного материала ВНИИ риса. Они являются ценным исходным материалом для селекционных программ по созданию устойчивых к пирикулярриозу сортов риса. Кроме того, на разных этапах селекционного процесса продолжается изучение новых линий риса с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*, *Pi-2*, *Pi-1*, *Pi-33*, *Pi-40*.



Рисунок 7 - Сорт риса Ленарис с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*

На основе сорта Снежинка для передачи в Государственное сортоиспытание в 2019 г. подготовлена линия риса с геном *Pi-2*, которая имеет положительные показатели по хозяйственно-ценным признакам, а также устойчива к краснодарской популяции *P. oryzae*.

В производственном испытании в ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса в 2017 году сорт риса Альянс показал урожайность 9,1 т/га и высокие технологические свойства (неполегаемость, устойчивость к

пирикулярнозу). При производственном испытании в 2018 году на площади 0,05 га сорт риса Ленарис показал высокую технологичность, неполегаемость и возможность прямой уборки комбайном. Урожайность его составила 10,6 т/га. При производственных испытаниях сорта риса Капитан в ОС «Пролетарское» Ростовской области урожайность составила 8,0 т/га. Сорт также высокотехнологичный, неполегает, что дает возможности для прямой уборки комбайном.

Рекомендуемые зоны возделывания этих сортов в производстве - Северо-Кавказский и Нижневолжский регионы Российской Федерации для выращивания по обычной технологии, а также с получением всходов по естественным запасам влаги или из-под слоя воды.

Экономическая оценка эффективности, как завершающий этап научных исследований, свидетельствует, что прибавка к стандарту условно чистого дохода при возделывании новых сортов риса достигает 9000 – 40000 руб./га (таблица 3). При этом рентабельность составила 130 %, что на 11 % выше, чем у стандартов Флагман (Краснодарский край) и Южанин (Ростовская область).

Таблица 3 - Оценка экономической эффективности сортов риса, созданных на основе MAS

Сорт	Средняя урожайность, т/га	Затраты, руб./га	Прибыль, руб./га	Рентабельность, %	Годовой экономический эффект, руб./га
Производственное испытание в ФГУЭСР «Красное»ВНИИ риса					
Флагман, стандарт	8,1	60000	69600	89	-
Альянс	9,1	60000	85600	142	16000
Ленарис	10,6	60000	109600	182	40000
Производственное испытание в ОС «Пролетарское» (Ростовская обл.)					
Южанин, стандарт	7,49	60000	59840	119	-
Капитан	8,13	60000	78210	130	9000

Внедрение новых сортов в сельскохозяйственное производство позволит дополнительно произвести более 600 тонн зерна риса с каждой тысячи гектаров на сумму 10 млн. рублей. При этом значительно снизятся затраты на обработку фунгицидами, т.к. можно уменьшить их нормы внесения.

3.2 Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пониженным положительным температурам в период прорастания семян

В России рис возделывается в самой северной зоне рисосеяния, и поэтому здесь он испытывает отрицательное влияние пониженных температур в период прорастания семян и получения всходов (Костылев и др., 2004). Повышение холодостойкости у отечественных сортов риса в данный период позволит начинать посев риса в более ранние сроки, используя для вегетации растений благоприятные по температуре условия, получать оптимальные по густоте всходы, что даст возможность в большей мере реализовать потенциальную продуктивность сортов.

Совместно с физиологами и селекционерами нашего института риса в 2011-2018 гг. на основе использования методов молекулярного маркирования проводились научные работы по созданию таких форм (Скаженник и др., 2013).

Для идентификации донорных аллелей и их состояния было апробировано 6 SSR - локусов (Takeuchi et al., 2001; Suh et al., 2010) на родительских формах риса. Высокий уровень полиморфизма микросателлитных последовательностей выявлен у двух: RM24545, RM569. Пример полученных профилей с использованием SSR-маркера RM 24545 представлен на рисунке 8.

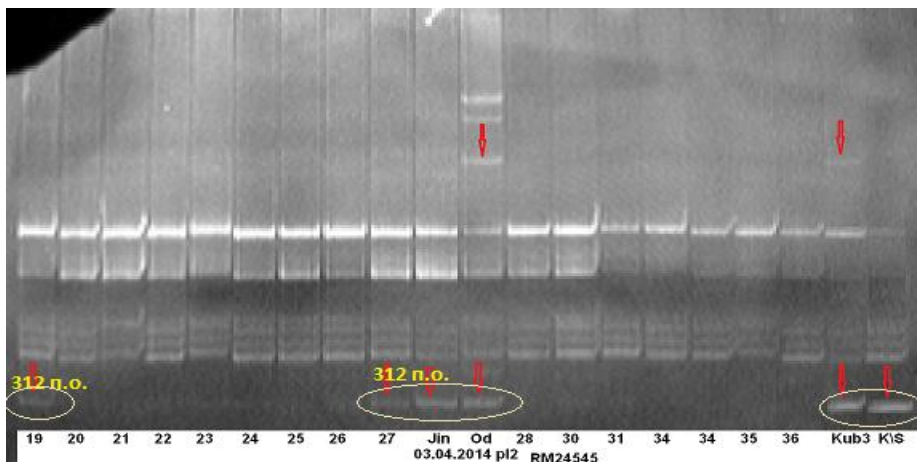


Рисунок 8 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 24545

Примечание: 19...36 дигаплоидные растения риса; Od – Odaebueo сорт-донор, Jin- Jinbubueo сорт-донор, Kub3 – отечественный сорт риса Кубань 3, K/S- гибридная комбинация Кубань 3/Северный.

Образцы 19, 27 и K/S имеют в своем генотипе специфичный ПЦР – продукт как у сорта-донора Jinbubueo, а российский сорт Кубань 3 в генотипе имеет аналогичные аллели устойчивости к холоду как у сорта-донора Odaebueo.

Данные ДНК-анализа согласуются с данными по фенотипу (лабораторные тесты на холодостойкость, проводимые в лаборатории физиологии). В результате генотипического маркирования среди проанализированных гибридных растений риса на данный признак были отобраны линии с доминантными аллелями генов холодоустойчивости, которые переданы в селекционный процесс для изучения по хозяйственно-ценным признакам.

3.3. Введение гена устойчивости к длительному затоплению *Sub1A* в отечественную генплазму риса

В виду того, что необходимость создания генетических источников сельскохозяйственных растений, предлагаемых для возделывания по природосберегающим технологиям увеличивается, целью данного раздела являлось создание селекционных форм риса с геном *Sub1A*, определяющим толерантность к длительному затоплению водой как фактору борьбы с сорными растениями, на генетической основе российских сортов с использованием ДНК-маркеров и ПЦР-анализа. В процессе работы в 2015 году были получены гибридные растения от скрещивания скороспелого российского сорта Новатор с донором гена *Sub1A* Khan Dan. Первое поколение характеризовалось высокой степенью стерильности (90–95%) и бурой окраской цветковых чешуй при созревании, что свидетельствует о значительных генетических различиях между родительскими формами. Во втором поколении в 2016 году наблюдали широкий спектр расщепления по вегетационному периоду, высоте растений, длине и форме метелки, количеству колосков, остистости. Для идентификации гена *Sub1A* в полученных гибридных растениях было апробировано 76 SSR-маркеров на родительских формах. Высокий уровень полиморфизма выявлен у трёх микросателлитов: *Sub1Aq*, *Sub1C173*, *Sub1A203*. На рисунке 9 представлены результаты их апробации.

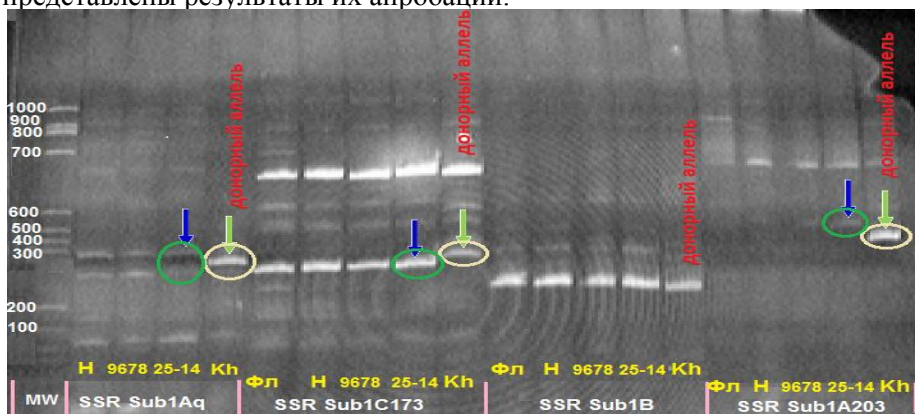


Рисунок 9 - Визуализация продуктов амплификации в SSR-локусах *Sub1Aq*, *Sub1C173*, *Sub1B*, *Sub1A203*

Примечание к рисунку 9: MW – маркер молекулярной массы pBR322/BsuR I (поставщик – комп. Хеликон, Россия); Нов – раннеспелый сорт риса Новатор (материнская форма), ВНИИР9678 – крупнозерная линия риса (материнская форма), КП-25-14 – крупнозерная раннеспелая линия риса (материнская форма), Kh – сорт Khan Dan донор гена *Sub1A*; Sub1Aq, Sub1C173, Sub1B, Sub1A203 – микросателлитные маркеры на локус *Sub1A*.

Данные маркеры вовлечены в программу по созданию толерантных к данному стрессору сортов риса. Среди гибридов F₂ с их использованием отобраны для дальнейшей селекции гомозиготные формы по гену *Sub1A*.

Для визуализации продуктов ПЦР апробирован метод электрофореза в агарозном геле. Подобрана оптимальная концентрация агарозы (2%), при которой продукты ПЦР чётко визуализируются. Его использование позволяет значительно сокращать время (20-30 минут, в сравнении с ПААГ-3-3,5 часа) и трудозатраты на проведение анализа (рис. 10).

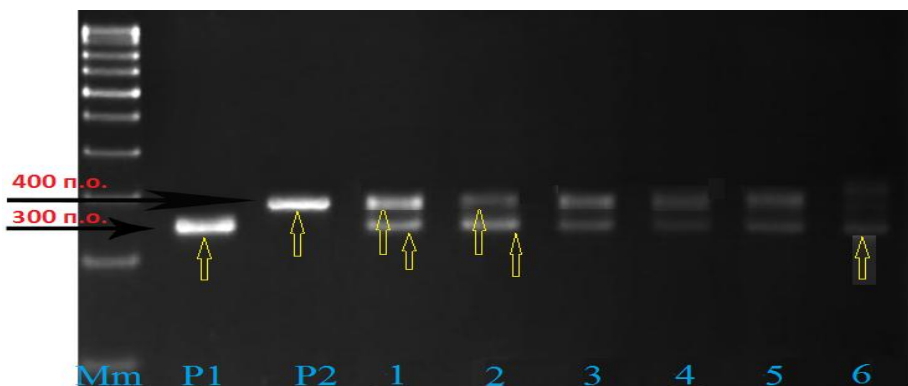


Рисунок 10 - ПЦР-анализ растений риса F₂ – поколения по локусу *Sub1A203*

Примечание: Mm - маркер молекулярной массы ДНК 100 bp+1,5 Kb +3Kb (СибЭнзим); P1 – родительская форма – сорт риса Khan Dan; P2 - родительская форма – сорт риса Новатор; G1...G6 – гибридные растения F₂.

На электрофореграмме видно, что гибридное растение G6 по локусу *Sub1A203* имеет донорный аллель в гомозиготном состоянии, остальные растения по данному локусу - гетерозиготы. Растения, в генотипе которых выявлен только материнский аллель, выбраковывали.

По результатам маркерного анализа в выборке F₂ - поколения (184 растения) получено следующее соотношение: 39 растений несут доминантный аллель в гомозиготном состоянии, 104 – в гетерозиготном, 41 растение – гомозиготы по рецессиву, что соответствует моногенному Менделевскому расщеплению 1:2:1.

Оценку доноров, отечественных сортов риса и полученных гибридных растений на толерантность к длительному затоплению проводили в лабораторных условиях. Семена гибридных растений проращивали в пробирках (Скаженник, 2009). После того как проростки достигали длины 2-3 см (рис. 12 А), растения в пробирках полностью заливались водой, и на 15 суток проводилась оценка растений на толерантность к затоплению.

В результате проведения эксперимента было отмечено, что растения материнских линий КП-25-14 и ВНИИР 9678 из-за недостатка кислорода погибли. Раннеспелый сорт риса Новатор пророс из-под слоя воды. Возможно, это связано с наличием в генотипе у этого сорта генов (SK1/Sk2), обуславливающих усиление энергии роста (Catling et al., 1992; Vergara et al., 1976). Данный механизм основан на активации накопления этилена, который уменьшает количество абсцизовой кислоты и повышает уровень гибберелиновых кислот, что приводит к повышению индуцированного роста растений (Kende et al., 1998; Hattori et al., 2009).

Из 184 полученных растений гибридной комбинации Новатор х Khan Dun выделили 143 растения с целевым геном, которые были высеяны на лизиметрической площадке ФГБНУ «ВНИИ риса» для оценки по хозяйственно-ценным признакам. Отобранные растения с геном *Sub1A* вовлекли в возвратное скрещивание с рекуррентными родительскими формами. Работа по проведению насыщающих скрещиваний начата с той целью, чтобы получить линии риса с комплексом ценных признаков районированного сорта, имеющего эффективный ген толерантности к длительному затоплению *Sub1A*, а также с периодом вегетации не более 125 дней. Получено BC₁F₂ – поколение.

Индивидуальный отбор 2017 г. позволил в гибридах BC₁F₃ – популяции отобрать элитные растения, и в 2018 году в полевых условиях на рисовой оросительной системе ВНИИ риса было выращено и размножено 15 линий BC₁F₄ - поколения. Планируется их дальнейшее изучение.

Таким образом, по данному разделу отобраны информативные SSR-маркеры, позволяющие четко идентифицировать ген *Sub1A* методом ПЦР в полученных гибридных растениях риса. Проведено скрещивание сорта-донора гена *Sub1A* с российскими высокопродуктивными сортами и линиями риса, имеющими в генотипе гены устойчивости к пирикулярриозу (*Pi*). Получен селекционный материал с геном *Sub1A*, а также с совмещенными генами *Sub1A* и *Pi*. Проведено тестирование селекционных ресурсов риса на устойчивость

к длительному затоплению в условиях лабораторного опыта, отобраны толерантные формы риса, которые будут изучаться в селекционном процессе по комплексу хозяйственно-ценных признаков.

3.4 Генотипирование изолятов красnodарской популяции *Pyricularia oryzae* Cav. методом ПЦР

Для успешного выполнения селекционных программ по созданию сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, необходима информация о биоразнообразии и патотипе местной популяции патогена. На основании этих сведений может быть подобран оптимальный подход и выбран наиболее эффективный метод по созданию резистентных генетических ресурсов к заболеванию.

В связи с этим целью наших исследований стало изучение генетической структуры и биоразнообразия высоковариабельного грибного фитопатогена *P.oryzae* с применением методов молекулярного маркирования, а также идентификация эффективных генов резистентности к пирикулярриозу на юге России.

Проведен мониторинг и обследовано 25 рисосеющих хозяйств в восьми экологических зонах Краснодарского края (Красноармейского, Калининского, Крымского, Абинского, Темрюкского, Северского, Славянского районов, Краснодар), а также Ростовской области (Пролетарский район) и Республики Адыгея (Тахтамукайский район). Собран гербарный материал с признаками поражения болезнью на этих территориях. Из пораженных листьев, узлов стебля, метелок растений риса выделено 62 штамма *Pyricularia oryzae* Cav. с различной спорулирующей способностью. Они описаны по морфолого-культуральным признакам (рис. 11) и разделены на группы (морфотипы). Всего выделено 33 морфотипа.

На рисунке 11 представлены фотографии некоторых морфотипов *Pyricularia oryzae* Cav., выделенных из гербарного материала в 2016-2018 гг.

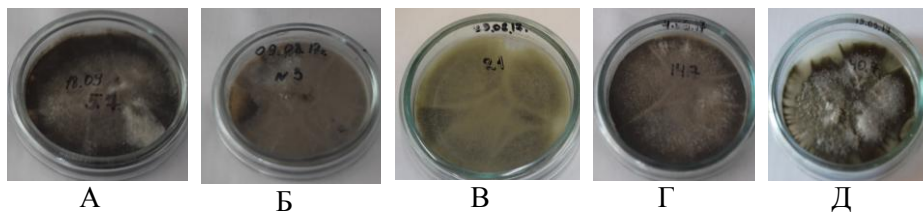


Рисунок 11 - Штаммы возбудителя пирикулярриоза *Pyricularia oryzae* Cav.

Примечание к рисунку 11: А - штамм *Pyricularia oryzae* Cav. № 5-17, имеющий низкий порошистый, концентрический характер роста

колонии серого цвета; Б - штамм № 3-17, имеющий низкий войлочный (слегка пушистый) характер роста колонии от светло-серого до серого и серо-оливкового цвета; В – штамм № 21-17, имеющий низкий плотный (слегка пушистый) характер роста колонии от светло-серого до серого цвета; Г – штамм №14-7, имеющий клочковатую, войлочную и низко порошистую структуру от светло-серого до темно-серого и оливкового цвета; Д - штамм № 40-17, имеющий высокий рыхлый клочковатый «лучистый» характер роста колонии от белого до коричнево-оливкового цвета.

Для генетической классификации штаммов *P. oryzae* использовался полиморфизм SSR-маркеров (Дубина и др., 2017, 2018).

Анализ ДНК 62 штаммов патогена *P.oryzae* проведен методом фрагментного анализа на основе разработанной совместно с ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) мультипраймерной системой, состоящей из шести SSR-локусов со специфичными праймерами, один из которых мечен определенным флуоресцентным красителем (FAM, R6G или ROX), что позволяет анализировать ПЦР-фрагменты отдельно по соответствующему каналу детекции (табл. 4; Дубина и др., 2018 б).

Таблица 4 - Мультипраймерная ПЦР-система для генетического анализа штаммов *P. oryzae* из разных экологических зон рисосеяния Краснодарского края, Ростовской области и Республики Адыгея

№ пп	Прай- меры	Обоз- наче- ние	Флюорес- центный краситель	Генотип 1 Фрагмент ДНК, п.н.	Генотип 2 Фрагмент ДНК, п.н.	Генотип 3 Фрагмент ДНК, п.н.	Генотип 4 Фрагмент ДНК, п.н.
1	Рутms 07-08	A	R6G	130	138	130	124
2	Рутms 47-48	B	ROX	176	174	176	172
3	Рутms 83-83	C	FAM	179	182	179	187
4	Рутms 43-44	D	FAM	222	205	222	212
5	Рутms 99-100	E	R6G	220	214	223	200
6	Рутms 427-428	F	ROX	224	222	224	208

Примечание к таблице 4: синим цветом – показан флюоресцентный краситель FAM; зеленым - флюоресцентный краситель R6G; красным – флюоресцентный краситель ROX; A, B, C, D, E, F - обозначение локусов; цифровое выражение – длина фрагмента, выявленного в каждом локусе.

На основе разработанной мультипраймерной системы по результатам ДНК-анализа для каждого штамма были получены

индивидуальные генетические профили и выявлено 33 генотипа. В качестве примера на рисунке 12 приведены генетические профили некоторых штаммов *P. oryzae* (рис. 12).

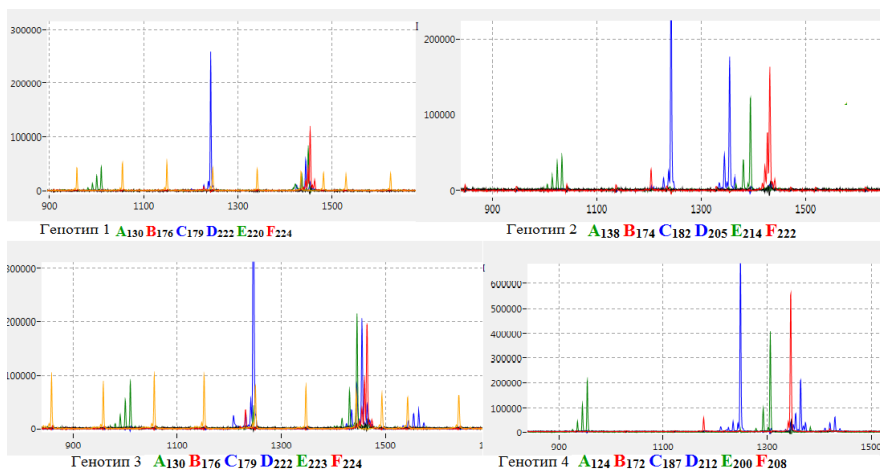


Рисунок 12 - Генетический профиль некоторых изученных в 2016 году изолятов *Pyricularia oryzae* Cav., полученный в результате ДНК-анализа

На оцифрованных генетических профилях штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., полученных с использованием разработанной мультипраймерной системы, каждый пик представляет собой ПЦР-фрагмент определенной длины. Цвет пика соответствует каналу детекции и определяет принадлежность фрагмента к тому или иному локусу (табл. 5).

Таблица 5 – Генетические профили некоторых штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., полученных на основе фрагментного анализа

Генотип	Формула	Название штамма
1	A ₁₃₀ B ₁₇₆ C ₁₇₉ D ₂₂₂ E ₂₂₀ F ₂₂₄	12, 21, 37, 38, 50, 11, 30, 31
2	A ₁₃₈ B ₁₇₄ C ₁₈₂ D ₂₀₅ E ₂₁₄ F ₂₂₂	5, 39, 7, 6
3	A ₁₃₀ B ₁₇₆ C ₁₇₉ D ₂₂₂ E ₂₂₃ F ₂₂₄	2, V, 8

Ввиду того, что рисосеющие зоны юга России, где был собран гербарный материал с признаками поражения болезнью, расположены в разных почвенно-климатических условиях, нами на основании комплекса исследования полиморфизма микросателлитных локусов, а также комплекса данных о размере аллелей, была проведена оценка степени генетического сходства выделенных штаммов. Для этой цели использовали кластерный анализ, а именно метод «Одиночных связей» (single linkage) с использованием программы STATISTICA 10,0,

который выделяет группы – кластеры, по принципу минимума внутрикластерной дисперсии (Олдендерфер и Блэшфилд, 1989).

Результаты кластеризации представлены на рисунке 13.



Рисунок 13 - Кластерный анализ штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. по данным микросателлитного анализа

При разрезания иерархического кластерного дендрита по величине 60 условных единиц среди изученных штаммов патогена выделено 4 кластера. К первому кластеру отнесены штаммы из Крымского, Абинского и Калининского районов, имеющие низкий войлочный и слегка порошистый характер роста колоннии. В состав второго кластера вошли штаммы из Темрюкского района Краснодарского края и Пролетарского района Ростовской области. Третий кластер представлен некоторыми штаммами из Красноармейского района. Четвертый кластер включает штаммы из Крымского, Калининского, Красноармейского и Абинского районов, имеющие неоднородный, клочковатый, низкий плотный и порошистый характер роста колонии.

Для проверки кластерного решения была проведена процедура дискриминантного анализа. На рисунке 14 представлено распределение кластеров в пространстве дискриминантных функций.

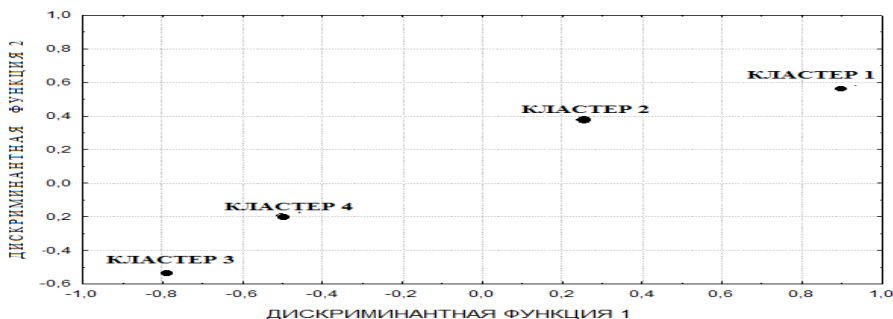


Рисунок 14 - Ординация центров кластеров в пространстве дискриминантных функций.

Из рисунка видно, что кластеры изолятов различаются друг от друга.

Таким образом, полученные и изученные за период 2016-2018 гг. штаммы *Pyricularia oryzae* Cav. при описании по морфолого-культуральным признакам разделены на 33 морфотипа, и по результатам ДНК-анализа выявлено 33 генотипа патогена.

Полученные данные были систематизированы при помощи программного комплекса Microsoft Office Excel 2007 и составлена база данных «Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России». Она состоит из шести взаимосвязанных таблиц, каждая из которых содержит закодированную информацию, отражающуюся в других таблицах в виде числового кода (хозяйствующий субъект; административное расположение места отбора образца; дату отбора; сорт и часть растения, пораженное болезнью; морфологические особенности колонии штамма; его генотип). Это позволяет избежать путаницы в объемных данных, а также ошибок или повторяющихся значений.

В дальнейшем с её использованием можно будет проводить сравнительную характеристику микросателлитного профиля вновь выделенных полевых штаммов патогена *P.oryzae* с имеющимися в базе данных, оценивая, тем самым, степень их генетического родства.

Структура таблиц и их взаимосвязь показана на рисунке 15.

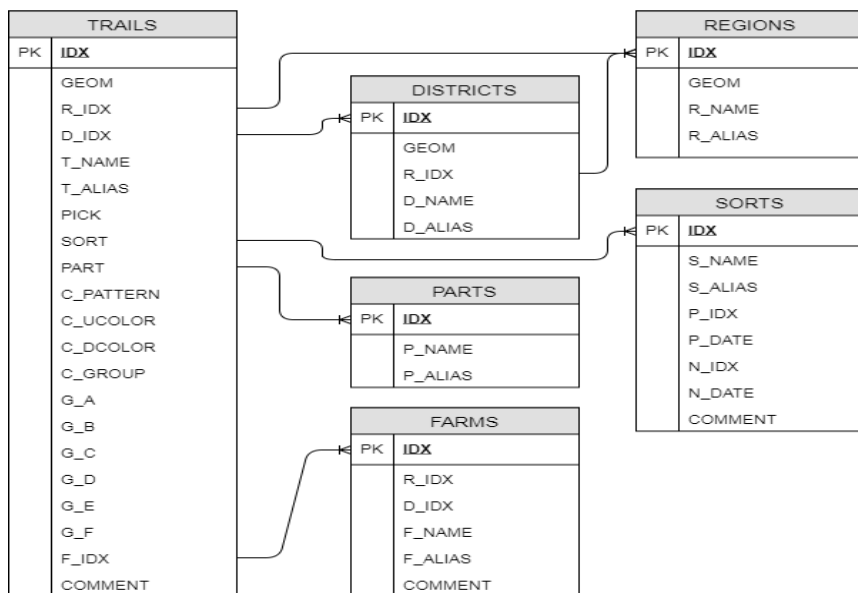


Рисунок 15 - Структура таблиц и их взаимосвязь

Таким образом, в результате выполнения исследований нами сформирована рабочая коллекция фитопатогенного гриба *P. oryzae*, оформленная в виде Базы данных с целью использования культуры

патогена в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу, а также для контроля за изменчивостью гриба. В настоящее время коллекционные штаммы пересеяны в свежую питательную среду и заложены на хранение в холодильник при температуре + 4° С.

3.5 Оценка уровня гибридности гибридов F₁ *Brassica oleracea* L. с использованием SSR-маркеров

Целью данного раздела исследований являлась разработка методической системы оценки генетической однородности семян F₁ *Brassica oleracea* L., основанной на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров.

Для изучения уровня полиморфизма микросателлитных локусов между родительскими формами капусты белокочанной, используемыми в селекционной работе отделом овощеводства ФГБНУ «ВНИИ риса», нами были апробированы кодоминантные SSR маркеры, взятые из базы данных VegMarks на сайте <http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp>. Проведена оптимизация их параметров для постановки ПЦР. Составлен протокол реакции амплификации, при котором ПЦР-продукты четко визуализируются.

Результаты оценки уровня полиморфизма использованных в работе SSR-маркеров между родительскими формами капусты белокочанной представлены на рисунке 16.

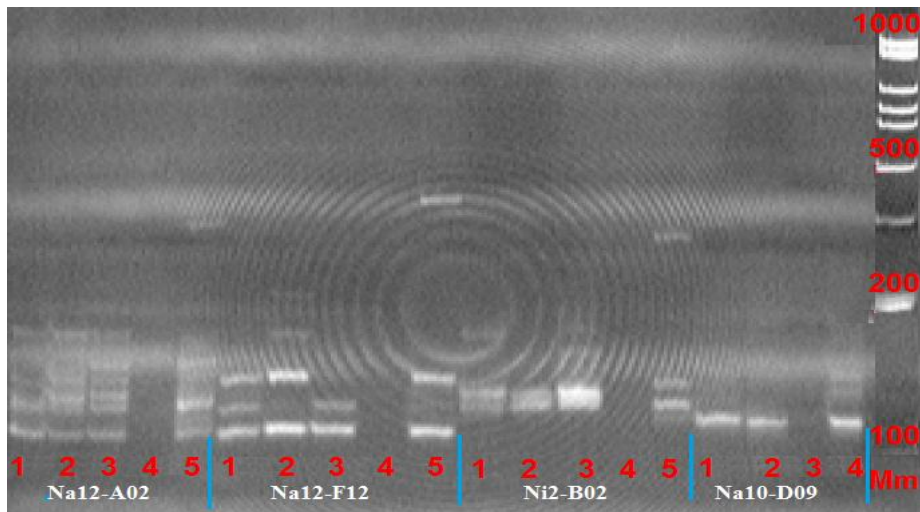


Рисунок 16 - Визуализация продуктов амплификации в SSR - локусах Na12-A02, Na12-F12, Ni2-B02, Na10-D09 у линий *Brassica oleracea* L.

Примечание: дорожка №1 - линия капусты белокочанной Krl; дорожка № 2 - линия Бс1ф; дорожка № 3 - линия Пи 714; дорожка № 4 - линия Хн1ф 144-2; дорожка № 5 - линия 270-488.

Рисунок 16 демонстрирует аллельное разнообразие анализируемых генотипов капусты белокочанной по SSR - локусам. Из электрофореграммы видно, что из исследуемого набора микросателлитных маркеров наибольший полиморфизм между родительскими формами, используемыми в селекционном процессе отделом овощекартофелеводства ФГБНУ «ВНИИ риса», наблюдается по локусам Na12-F12 и Na12-A02.

Всего было обнаружено 28 аллельных состояний для 9 локусов в 5 образцах капусты белокочанной (в среднем по 4 аллеля на локус). Наибольшее число аллелей (6-8) для данного набора генотипов было детектировано для локусов Na12-A02, Na12-F12, локализованных на разных хромосомах, наименьшее (1-2) для локусов Na10-D09, Ra2-E12 и Ni3-G04B (Дубина и др., 2016 б).

На основе ПЦР-анализа с использованием выделенных нами информативных кодоминантных SSR-маркеров проведена оценка гибридности F_1 капусты белокочанной Атаман. Для ДНК-анализа отбирали зеленые листья со 100 растений, а также по одному образцу каждой родительской формы. Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа составил 86,0 %. Гибридологический анализ, проводимый отделом овощекартофелеводства показал 96%.

Несмотря на то, что ДНК-анализ является более точным методом определения уровня гибридности гетерозисных культур, поскольку позволяет дать характеристику исследуемого образца по генотипу, а это имеет ряд преимуществ по сравнению с оценкой по фенотипу, эти два метода могут дополнять друг друга.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показана возможность использования микросателлитного анализа для определения генетической однородности семян гибридов F_1 капусты белокочанной как надежного лабораторного метода для оценки уровня гибридности.

3.6 Оценка уровня гибридности гибридов F_1 *Capsicum annuum* L. на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров.

Цель данного раздела состояла в разработке методической схемы оценки уровня гибридности коммерческих партий семян гибридов F_1 перца сладкого на основе микросателлитного анализа и внедрении её в процесс семеноводства.

Методология разработки данной методической схемы аналогична схеме, описанной в предыдущем разделе.

Был проверен полиморфизм 12 SSR-маркеров между родительскими формами перца сладкого, используемыми в

селекционной работе отделом овощекartофелеводства ФГБНУ «ВНИИ риса».

Из 12 изученных кодоминантных микросателлитных маркеров высокую эффективность в выявлении полиморфизма показали три SSR маркера: CAMS-117 (11 хромосома), CAMS-142 (1 хромосома) и CAMS-405 (8 хромосома).

На рисунке 17 представлено аллельное разнообразие, и показан высокий уровень полиморфизма анализируемых генотипов по локусу CAMS-142.

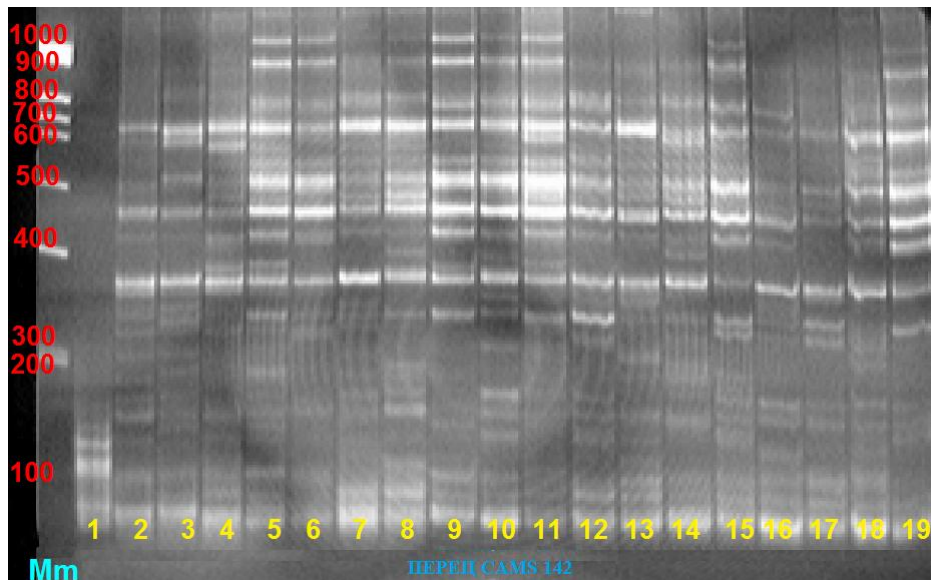


Рисунок 17 - Амплификация ДНК генотипов перца сладкого с парой праймеров CAMS-142

Примечание: Мм – маркер молекулярной массы, Сам – Самоцвет, Пам – Памир, S-6, Фиш – Фишт, Стал – Zg 1, Биа – Бианка132, ЛЗ07нз (плоды опущены вниз), ЛЗ07вх (плоды подняты вверх), Фл – Фламинго, Сам 122 – Самоцвет 122, Креп – Крепыш 312, ПМ 84 – ПМ 84, Гл – Голубок, Лум – Лумина, S-2, Эн – Энэй, Кад – Кад, ПП – Янт1, 55 – Селигер.

По данному микросателлитному локусу у исследованного набора образцов перца сладкого выявлено 15 аллелей.

Всего по изученным микросателлитным локусам у исследованного набора образцов перца сладкого было выявлено 77 аллелей (в среднем по 8 аллелей на локус). Наибольшее число аллелей (15-16) для данного набора генотипов было детектировано для локусов CAMS-405, CAMS-142, CAMS -117, наименьшее (1-2) для локусов CAMS-398, CAMS-811 (Дубина и др., 2016).

Следующим этапом нашей работы было проведение ПЦР-анализа для оценки уровня гибридности районированных на территории Краснодарского края гибридов F_1 перца сладкого Фишт и Памир с использованием двух кодоминантных SSR-маркеров: CAMS-117, CAMS-142.

Молекулярно-генетическую оценку процента гибридности перца сладкого F_1 Памир проводили, анализируя 100 растений. Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа составил 100,0 % (на 100 проанализированных растений, что подтверждается гибридологическим анализом, проведённым в отделе овощекртофелеводства).

Таким образом, разработанная методическая схема по оценке генетической однородности коммерческих партий семян F_1 перца сладкого внедрена в семеноводческий процесс и может быть использована как надежный лабораторный метод определения уровня гибридности гибридов F_1 перца сладкого, а также для оценки сортовых качеств семян.

ВЫВОДЫ

1. Проведено введение генов устойчивости к пирикулярриозу $Pi-1$, $Pi-2$, $Pi-33$, $Pi-ta$, $Pi-b$, $Pi-40$ в высокопродуктивные отечественные сорта риса для повышения их иммунитета к заболеванию. На основе анализа ДНК гибридных растений с использованием микросателлитных молекулярных маркеров, сцепленных с данным признаком, отобраны формы с интрогрессированными генами резистентности в гомозиготном состоянии. Полученный предселекционный материал внедрён в селекционный процесс.

2. Выполнено объединение нескольких генов устойчивости к пирикулярриозу. Это позволило получить формы риса с двумя, тремя и пятью генами резистентности к заболеванию ($Pi-1+Pi-2$, $Pi-ta+Pi-33$, $Pi-ta+Pib$, $Pi-1+Pi-2+Pi-33$, $Pi-1+Pi-2+Pi-33+Pi-ta+Pi-b$). Для повышения экономической эффективности маркерной селекции разработаны мультипраймерные системы идентификации одновременно двух генов Pi ($Pi-1+Pi-2$, $Pi-ta+Pi-33$, $Pi-ta+Pi-b$). Подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР. Это позволило получить высоковоспроизводимые результаты ДНК-продуктов. Данные маркерные системы внедрены в селекционный процесс. На их основе получены беккроссные самоопыленные линии, которые внедрены в селекционный процесс для изучения по хозяйственно-ценным признакам.

3. В результате полевой оценки в селекционных и инфекционном питомниках среди полученного исходного материала с генами Pi по хозяйственно-ценным признакам и устойчивости к

Pyricularia oryzae Cav. при жесткой браковке отобраны перспективные линии (КП-171-14, КП-23 и КП-30), на основе которых созданы сорта Альянс, Капитан, Ленарис с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* и Пируэт с тремя генами – *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, которые переданы в Государственное сортоиспытание.

4. На основе молекулярно-генетического подхода изучена генетическая структура высоковариабельного грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav. Сформирована База данных, которая содержит фактический материал о штаммах патогена. В ней представлена характеристика популяции высоковариабельного грибного фитопатогена *P. oryzae* Cav. по морфолого-культуральным признакам, ДНК-полиморфизму. Составлены «морфо- и ДНК-паспорта» выделенных штаммов возбудителя пирикулярриоза из разных экологических зон рисосеяния юга России. Определено их сходство. Данные, представленные в Базе, можно использовать для анализа и мониторинга популяций и патотипов возбудителя пирикулярриоза в рисосеющих регионах юга России, а также вести контроль за изменчивостью гриба и прогнозировать распространение болезни.

5. Выявлены эффективные для юга России гены устойчивости к самому вредоносному патогену рисовых полей *Pyricularia oryzae* Cav.: *Pi-sh*, *Pi-z-5*, *Pi-z-t*, *Pi-5*, *Pi-1*, *Pi-7*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-k^p*, *Pi-k^s*, *Pi-ta*, *Pi-ta²*, которые могут быть рекомендованы для селекционных программ по созданию перспективных сортов, устойчивых к пирикулярриозу.

6. Выполнена программа по введению гена толерантности к длительному затоплению *Sub1A* как фактору борьбы с сорными растениями. Изучен полиморфизм микросателлитных молекулярных маркеров на данный признак на родительских формах. В результате апробации SSR-маркеров методом ПЦР отобрано три микросателлитных локуса с высоким уровнем полиморфизма. С их использованием отобраны растения, имеющие в генотипе целевой ген в гетеро- и гомозиготном состоянии. Получены образцы F₄- и BC₁F₄-поколения с геном *Sub1A*, а также с совмещенными генами устойчивости к пирикулярриозу (*Pi*) и толерантности к длительному затоплению (*Sub1A*) как фактору борьбы с сорными растениями в гомо- и гетерозиготном состоянии, которое подтверждается данными анализа их ДНК. Проведенное тестирование полученных селекционных ресурсов риса на устойчивость к длительному затоплению в условиях лабораторного опыта позволило отобрать толерантные формы риса, которые будут изучаться в селекционном процессе по комплексу агрономически-ценных признаков. Их использование позволит снизить применение химических средств защиты растений от болезней и сорных

растений, повысив тем самым экологический статус отрасли рисоводства.

7. Для диверсификации генофонда риса на основе методов молекулярного маркирования создан предселекционный материал с донорными аллелями толерантности к низким положительным температурам в период прорастания семян. С использованием микросателлитных молекулярных маркеров (RM24545, RM569), показавших высокий уровень полиморфизма в экспериментальном предселекционном материале, отобраны формы, имеющие в генотипе аллели толерантности к данному стрессору. Они переданы в селекционный процесс для изучения по хозяйственно-ценным признакам.

8. Из 19 изученных микросателлитных маркеров для оценки генетической однородности гибридных семян капусты белокочанной, выявлен различный уровень полиморфизма: от трех до восьми аллелей на один SSR-локус. Наибольшее число аллелей (6-8) для данного набора генотипов было детектировано для локусов Na12-A02, Na12-F12, локализованных на разных хромосомах. С их использованием разработана методическая схема оценки генетической однородности гибридных семян капусты белокочанной на основе молекулярно-генетических методов. Ее использование в практическом семеноводстве повысит надежность контроля генетической чистоты (гибридность) реализуемых партий семян. При изучении микросателлитного полиморфизма для оценки генетической однородности перца сладкого из 12 апробированных SSR-маркеров высокую эффективность показали три: CAMS-117 (11 хромосома), CAMS-142 (1 хромосома) и CAMS-405 (8 хромосома). Четкая интерпретация результатов ПЦР-анализа и достоверность полученных данных свидетельствуют о возможности их использования для оценки генетической однородности семян гибридов F₁ перца сладкого, что востребовано в семеноводческом процессе.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВА

Рекомендовать созданные образцы риса с генами устойчивости к пирикулярриозу и обладающие комплексом признаков, соответствующих агроклиматическим условиям юга России для использования в селекции на устойчивость к заболеванию.

Полученный в работе селекционный материал с генами толерантности к длительному затоплению и низким положительным температурам в фазу всходов рекомендовать к

использованию для дальнейшей работы, направленной на создание образцов, устойчивых к данным стрессорам.

Разработанные мультипраймерные системы по идентификации одновременно двух и трёх генов резистентности к пирикулярриозу в одном генотипе рекомендовать для селекционных программ по созданию перспективных форм, устойчивых к пирикулярриозу, с целью контроля целевых генов в гибридном материале.

Использовать созданные базы данных для анализа и мониторинга популяций и патотипов возбудителя пирикулярриоза в рисосеющих регионах юга России. Это позволит вести контроль за изменчивостью гриба и прогнозировать распространение болезни.

Разработанные маркерные системы по оценке генетической однородности семян гибридов F₁ капусты белокочанной и перца сладкого рекомендовать для практического использования в семеноводческом процессе. Это позволит получать данные о генетической однородности (гибридность) реализуемых партий семян в год их производства, что является особенно важным для оригинатора.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи, опубликованные в журналах, входящих в перечень
международных реферативных баз данных (WOS и Scopus):**

1. **Dubina, E.V.** Creation of blast disease-resistant rice varieties with modern DNA-markers / **E.V. Dubina**, Z.M. Mukhina, E.M. Kharitonov, V.N. Shilovskiy, E.S. Kharchenko, L.V. Esaulova, N.N. Korkina, E.P. Maximenko, I.B. Nikitina // Russian Journal of Genetics. – 2015. – Vol. 51. – № 8. – P. 752-756. – DOI: 10.1134/S1022795415060058.
2. **Дубина, Е.В.** Создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса с использованием ДНК-маркерных технологий / **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина, Е.М. Харитонов, В.Н. Шиловский, Е.С. Харченко, Л.В. Есаулова, Н.Н. Коркина, Е.П. Максименко, И.Б. Никитина // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 8. – С. 881-886. – DOI: 10.7868/S0016675815060053.
3. Костылев, П.И. Объединение генов устойчивости риса к пирикулярриозу в генотипах российских сортов с использованием маркерной селекции / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина // Экологическая генетика. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 54-63. – DOI: 10.17816/ecogen15354-63.
4. **Dubina, E.V.** Introduction of the Sub1 gene into the russian rice varieties using the polymerase chain reaction (PCR) methods / **E.V. Dubina**, A.V. Alabushev, P.I. Kostylev, Yu.A. Makukha, M.G. Ruban, I.V. Balyasnyi, Le.H. Ham, D.X. Tu, Le.H. Linh // African Journal of Agricultural Research. – 2018. – Vol. 13 (48). – P. 2757-2762. – DOI: 10.5897/AJAR2018.13563.

Статьи, опубликованные в журналах, входящих в список ВАК РФ

5. **Дубина, Е.В.** Интрогрессия генов Pi-ta, Pi-b, Pi-z в отечественный сорт риса "Снежинка" с применением методов маркерной селекции / **Е.В. Дубина, Ж.М. Мухина** // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – № 66. – С. 475-485.
6. **Дубина, Е.В.** Разработка систем мультиплексной ПЦР для идентификации генов устойчивости к *Magnaporthe grisea* (Herbert) BARR и создание новых резистентных форм (доноров) *Oryza sativa* L. к патогену / **Е.В. Дубина, П.И. Костылев, Л.В. Есаулова** // Зерновое хозяйство России. – 2015. – № 1. – С. 30-34.
7. **Дубина, Е.В.** Использование ДНК-технологий для создания сортов риса устойчивых к пирикулярриозу / **Е.В. Дубина, В.Н. Шиловский, Г.Л. Зеленский, Е.С. Харченко, Рубан М.Г., С.В. Гаркуша, Л.В. Есаулова, Е.П. Максименко** // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 12. – С. 40-42.
8. **Дубина, Е.В.** Использование SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян сладкого перца / **Е.В. Дубина, С.В. Королёва, С.В. Гаркуша** // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30. – № 8. – С. 42-44.
9. **Дубина, Е.В.** Разработка методической схемы оценки гибридности семян *F₁ Brassica oleracea* L., основанной на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров / **Е.В. Дубина, С.В. Королёва, С.В. Гаркуша, С.А. Юрченко, Л.В. Есаулова** // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30. – № 8. – С. 49-51.
10. **Дубина, Е.В.** Ген Sub1A в селекции риса на толерантность к затоплению, как фактор борьбы с сорными растениями / **Е.В. Дубина, В.Н. Шиловский, П.И. Костылев, С.В. Гаркуша, В.С. Ковалев, Л.В. Есаулова, И.В. Балясный, М.Г. Страховысова, С.Ту. Динь, Х.Л. Ле** // Рисоводство. – 2017. – № 2 (35). – С. 20-26
11. **Дубина, Е.В.** Изучение биоразнообразия *Pyricularia oryzae* Cav. в рисосеющих зонах юга России на основе методов ПЦР / **Е.В. Дубина, П.И. Костылев, М.Г. Рубан, Ю.В. Анискина, И.А. Шилов, Н.С. Велишаева, Л.В. Есаулова** // Зерновое хозяйство России. – 2017. – № 6 (54). – С. 29-35.
12. **Дубина, Е.В.** ДНК-технологии в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / **Е.В. Дубина, В.Н. Шиловский, М.Г. Рубан, А.М. Оглы, Д.А. Пищенко, И.В. Балясный, Ю.А. Макуха, Е.П. Максименко, И.Б. Никитина** // Рисоводство. – 2018. – № 3 (40). – С. 6-12.
13. **Дубина, Е.В.** Изучение биоразнообразия *Pyricularia oryzae* Cav. в рисосеющих зонах юга России на основе метода ПЦР / **Е.В. Дубина, М.Г. Рубан, Ю.В. Анискина, И.А. Шилов, Н.С. Велишаева, П.И. Костылев, Ю.А. Макуха, Д.А. Пищенко** // Достижения науки и техники

- АПК. – 2018. – Т. 32. – № 10. – С. 19-23. – DOI: 10.24411/0235-2451-2018-11004.
14. **Дубина, Е.В.** Анализ популяций возбудителя пирикулярриоза риса (*Pyricularia oryzae* Cav.) по признаку вирулентности / **Е.В. Дубина**, Е.С. Харченко, Л.И. Серая, М.Г. Рубан, С.В. Гаркуша, Л.В. Есаулова, О.А. Подколзин, Д.В. Нартымов, Ю.А. Макуха // Свидетельство о регистрации базы данных RUS 2019620132 22.01.2019 г.
15. **Дубина Е.В.** Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России / **Е.В. Дубина**, Е.С. Харченко, Л.И. Серая, М.Г. Рубан, С.В. Гаркуша, О.А. Подколзин, Д.М. Нартымов // Свидетельство о регистрации базы данных RUS 2019620149 24.01.2019 г.
16. Мухина, Ж.М. Создание внутригенных ДНК-маркеров и их использование в практической селекции риса / Ж.М. Мухина, Т.М. Коломиец, С.А. Волкова, **Е.В. Дубина**, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Ю.А. Мягих // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2003. – № 22. – С. 63.
17. Мухина, Ж.М. Создание внутригенных ДНК-маркеров и их использование в практической селекции риса / Ж.М. Мухина, Т.М. Коломиец, С.А. Волкова, **Е.В. Дубина**, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Ю.А. Мягих // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2009. – № 3. – С. 63-67.
18. Мухина, Ж.М. Создание внутригенных молекулярных маркеров риса для повышения эффективности селекционного и семеноводческого процессов / Ж.М. Мухина, С.В. Токмаков, Ю.А. Мягих, **Е.В. Дубина** // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – № 67. – С. 412-421.
19. Токмаков, С.В. Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / С.В. Токмаков, **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – № 29. – С. 131-134.
20. Мухина, Ж.М. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях / Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – № 66. – С. 386-496.
21. Костылев, П.И. Создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса с помощью ДНК-маркеров / П.И. Костылев, А.А. Редькин, Е.В. Краснова, **Е.В. Дубина**, Е.Т. Ильницкая, Л.В. Есаулова, Ж.М. Мухина, Е.М. Харитонов // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. – № 1. – С. 26-28.
22. Костылев, П.И. Сорт риса Магнат, созданный с помощью биотехнологии / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Н.В. Репкина, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 3. – С. 10-12.

23. Костылев, П.И. Выведение сортов риса с пирамидированными генами устойчивости к болезням / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // *Зерновое хозяйство России*. – 2015. – № 3. – С. 54-57.
24. Шилов, И.А. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикулярриозу риса Pi-ta, Pi-b. / И.А. Шилов, О.С. Колобова, Ю.В. Анискина, Т.В. Шалаева, Н.С. Велишаева, П.Н. Костылев, **Е.В. Дубина** // *Достижения науки и техники АПК*. – 2016. – Т. 30. – № 8. – С. 45-48.
25. Скаженник, М.А. Использование ДНК-технологий для создания и улучшения исходного материала при селекции холодоустойчивых сортов риса / М.А. Скаженник, В.А. Дзюба, В.С. Ковалев, **Е.В. Дубина**, И.Н. Чухирь, Е.Г. Савенко, Т.С. Пшеницына // *Зерновое хозяйство России*. – 2016. – № 5. – С. 23-29.
26. Скаженник, М.А. Создание и улучшение исходного материала при селекции холодоустойчивых сортов риса / М.А. Скаженник, В.А. Дзюба, В.С. Ковалев, С.В. Гаркуша, **Е.В. Дубина**, И.Н. Чухирь, Е.Г. Савенко, Т.С. Пшеницына // *Рисоводство*. – 2017. – № 3 (36). – С. 21-29.
27. Костылев, П.И. Новый, устойчивый к пирикулярриозу сорт риса Пирут / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, Ю.П. Тесля, А.В. Аксенов, Л.М. Костылева, **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина // *Рисоводство*. – 2018. – № 1 (38). – С. 28-34.
28. Шилов, И.А. Технология массового скрининга риса на наличие генов устойчивости к пирикулярриозу Pi-1, Pi-2 и Pi-33 на основе мультиплексного микросателлитного анализа / И.А. Шилов, Ю.В. Анискина, Н.С. Велишаева, О.С. Колобова, Т.В. Шалаева, П.И. Костылев, **Е.В. Дубина** // *Достижения науки и техники АПК*. – 2018. – Т. 32. – № 11. – С. 21-25. – DOI: 10.24411/0235-2451-2018-11105

Свидетельства на базы Данных

29. Свидетельство на Базу данных «Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России» / **Е.В. Дубина**, Е.С. Харченко, Л.И. Серая, М.Г. Рубан, С.В. Гаркуша, О.А. Подколкин, Д.М. Нартымов // *Свидетельство № 2019620149 от 24.01.2019 г.*
30. Свидетельство на Базу данных «Анализ популяций возбудителя пирикулярриоза риса (*Pyricularia oryzae* Cav.) по признаку вирулентности» / **Е.В. Дубина**, Е.С. Харченко, Л.И. Серая, М.Г. Рубан, С.В. Гаркуша, Л.В. Есаулова, О.А. Подколзин, Д.В. Нартымов, Ю.А. Макуха // *Свидетельство № 2019620132 от 22.01.2019 г.*

Публикации в других научных изданиях

31. **Дубина, Е.В.** Селекция риса на устойчивость к пирикулярриозу с применением методики молекулярного маркирования / **Е.В. Дубина** // *Рисоводство*. – 2009. – № 15. – С. 38-41.

32. **Дубина, Е.В.** Использование технологии молекулярного ДНК-маркирования в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / **Е.В. Дубина** // В сборнике: Инновационные процессы в АПК: сборник статей III Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной 50-летию образования Аграрного факультета РУДН. – 2011. – С. 16-18.
33. **Дубина, Е.В.** Использование методов молекулярного маркирования в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / **Е.В. Дубина** // Рисоводство. – 2011. – № 19. – С. 2.
34. **Дубина, Е.В.** Использование молекулярного маркирования в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / **Е.В. Дубина** // Наука Кубани. – 2012. – № 4. – С. 15-18.
35. Костылев, П.И. Создание устойчивых к пирикулярриозу сортов риса с помощью маркерной селекции / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // В сборнике: «Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика»: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. – Большие Вяземы, Московская обл., 2012. – С. 458-461.
36. Костылев, П.И. Использование ДНК-маркеров в селекции сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // Рисоводство. – 2012. – № 20. – С. 8-12.
37. **Дубина, Е.В.** Разработка методологии маркер-вспомогательной селекции риса на устойчивость к *Magnaporthe grisea* L. с использованием методов ПЦР / **Е.В. Дубина**, Ю.А. Мягих, Е.М. Харитонов // В сборнике: Международная научно-практическая конференция "Биотехнология и качество жизни": материалы конференции. – 2014. – С. 244-245.
38. **Дубина, Е.В.** Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / **Е.В. Дубина**, В.Н. Шиловский, Г.Л. Зеленский, Е.С. Харченко, Ж.М. Мухина, Л.В. Есаулова, Е.П. Максименко // Рисоводство. – 2014. – № 2 (25). – С. 20-27.
39. Костылев, П.И. Гриб *Magnaporthe grisea* – возбудитель пирикулярриоза риса и перенос генов устойчивости к нему методом маркерной селекции / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // В сборнике: Ботаника и природное многообразие растительного мира: материалы Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием. – 2014. – С. 97-102.
40. Костылев, П.И. Объединение в одном генотипе риса пяти генов устойчивости к пирикулярриозу с помощью ДНК-маркеров / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // В сборнике: Биологическая защита растений - основа стабилизации

агроэкосистем: материалы докладов, представленных на 8-ю Международную конференцию. – 2014. – С. 369-372.

41. Костылев, П.И. Разработка систем мультиплексной ПЦР для идентификации генов устойчивости к *Magnaporthe grisea* (Herbert) BARR. и создание новых резистентных форм *Oryza sativa* L. к патогену / П.И. Костылев, **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина // В сборнике: Биотехнология. Взгляд в будущее: материалы III Международной научной Интернет-конференции: в 2 томах. – Составитель Д.Н. Синяев. – 2014. – С. 110-116.

42. Костылев, П.И. Использование переноса генов в качестве фактора индуцированной устойчивости растений риса к пирикуляррии / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина // Защита картофеля. – 2014. – № 2. – С. 87-89.

43. **Dubina, E.V.** Biotechnological approach in rice breeding for resistance to *Piricularia oryza* L. / **E.V. Dubina**, V.N. Shilovskiy, V.Ya. Ruban, P.I. Kostylev, G.L. Zelenskiy, V.S. Kovalev, E.S. Kharchenko, M.G. Ruban, S.V. Garkusha, E.P. Maximenko, I.B. Nikitina // В сборнике: Достижения и перспективы развития селекции и возделывания риса в странах с умеренным климатом: Международная научная конференция. – 2015. – С. 205-208.

44. **Дубина, Е.В.** Release of rice lines with five genes of tolerance to blast / **Е.В. Дубина**, П.И. Костылев, Ж.М. Мухина, Е.М. Харитонов, Л.В. Есаулова // В сборнике: Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2015. – С. 85-87.

45. **Дубина, Е.В.** Биотехнологические подходы в селекции риса на устойчивость к *Piricularia oryza* L./ **Е.В. Дубина**, В.Н. Шиловский, В.Я. Рубан, П.И. Костылев, Г.Л. Зеленский, В.С. Ковалёв, Е.С. Харченко, М.Г. Рубан, С.В. Гаркуша, Е.П. Максименко, И.Б. Никитина // В сборнике: Достижения и перспективы развития селекции и возделывания риса в странах с умеренным климатом Международная научная конференция. Составитель Синяев Д. Н. – 2015. – С. 53-57.

46. Kostylev, P. Development of multiplex PCR for identification of resistance genes to *Magnaporthe grisea* (Herbert) BARR. and development of new resistant forms *Oryza sativa* L. to the pathogen / P. Kostylev, A. Redkin, **E. Dubina**, Z. Mukhina // Наука и хозяйство. – 2015. – № 1. – С. 18-20.

47. Mukhina, Zh.M. ARRI breeding programs with use of molecular markers / Zh.M. Mukhina, **E.V. Dubina**, I.I. Suprun, S.V. Tokmakov, E.G. Savenko, S.A. Volkova, V.A. Glazyrina, L.A. Shundrina, N. Epifanovich, Yu. Epifanovich // В сборнике: Достижения и перспективы развития селекции и возделывания риса в странах с умеренным климатом: Международная научная конференция. Составитель Синяев Д.Н. – 2015. – С. 216-218.

48. Скаженник, М.А. Создание исходного материала риса, различающегося по холодостойкости в рамках консорциума стран умеренным климатом / М.А. Скаженник, В.А. Дзюба, И.Н. Чухирь, **Е.В. Дубина** и др. // В сборнике: «Вклад Вавиловского общества генетиков и селекционеров в инновационное развитие Российской Федерации»: сборник статей по материалам научно-практической конференции Кубанского отделения ВОГиС. – 2015. – С. 62-64.
49. Скаженник, М.А. Создание исходного материала риса устойчивого к низким положительным температурам в рамках консорциума стран с умеренным климатом / М.А. Скаженник, В.А. Дзюба, **Е.В. Дубина** и др. // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2015. – № 11. – С. 366-369.
50. Мухина, Ж.М. Селекционные программы ВНИИ риса с применением молекулярного маркирования / Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина**, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Е.Г. Савенко, С.А. Волкова, В.А. Глазырина, Л.А. Шундрин, Н. Епифанович, Ю. Епифанович // В сборнике: Достижения и перспективы развития селекции и возделывания риса в странах с умеренным климатом: Международная научная конференция. – Составитель Синяев Д.Н. – 2015. – С. 118-121.
51. Костылев, П.И. Резистентные к пирикулярриозу линии риса с пятью пирамидированными генами / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. – 2016. – 365 с.
52. **Дубина, Е.В.** Маркерная селекция риса на толерантность к длительному затоплению как фактору борьбы с сорными растениями / **Е.В. Дубина**, Л.В. Есаулова, П.И. Костылев // В сборнике: Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства: Международный саммит молодых учёных. – 2016. – С. 40-44.
53. **Дубина, Е.В.** Интрогрессия генов резистентности к пирикулярриозу как фактор стабилизации устойчивости растений риса к заболеванию / **Е.В. Дубина**, В.Н. Шиловский, С.В. Гаркуша, М.Г. Рубан, Л.В. Есаулова // Вестник защиты растений. – 2016. – № 4. – С. 19-24.
54. Костылев, П.И. Повышение устойчивости риса к пирикуляррии путем пирамидирования нескольких генов с маркерным контролем / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, А.А. Редькин, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // Вестник защиты растений. – 2016. – № 3. – С. 86-87.
55. Харченко, Е.С. Изучение биоразнообразия популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. на юге России / Е.С. Харченко, **Е.В. Дубина**, С.В. Гаркуша, М.Г. Рубан, Л.В. Есаулова, Э.Р. Авакян, И.В. Балясный // Наука Кубани. – 2017. – № 1. – С. 20.
56. **Дубина, Е.В.** Маркерная селекция риса на толерантность к длительному затоплению как фактору борьбы с сорными растениями /

Е.В. Дубина, С.В. Гаркуша, П.И. Костылев, Л.В. Есаулова, И.В. Балясный, Т.С. Динь, Л.Н. Ле // В книге: ИДЕИ Н. И. ВАВИЛОВА В СОВРЕМЕННОМ МИРЕ: тезисы докладов IV Вавиловской международной научной конференции. Федеральное агентство научных организаций; Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР); Вавиловское общество генетиков и селекционеров Санкт-Петербурга; Научный совет «Биология и медицина»; Санкт-Петербургский научный центр РАН. – 2017. – С. 180-181.

57. Костылев, П.И. Выявление генов стрессоустойчивости риса с помощью ПЦР-анализа / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, **Е.В. Дубина** // В книге: Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: научная конференция и школа молодых ученых. Ответственный редактор В.В. Кузнецов. – 2017. – С. 203.

58. Скаженник, М.А. Использование ДНК-технологий для создания исходного материала риса, устойчивого к низким положительным температурам / М.А. Скаженник, В.А. Дзюба, В.С. Ковалев, **Е.В. Дубина**, И.Н. Чухирь, Т.С. Пшеницына, Е.Г. Савенко, В.А. Глазырина, Л.А. Шундрин, К.В. Бутко, Е.В. Чинченко // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2017. – № S12. – С. 193-195.

59. Костылев, П.И. Новые достижения селекции риса в Ростовской области – сорта Вирасан и Пируэт / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, Ю.П. Тесля, А.В. Аксенов, Л.М. Костылева, Ж.М. Мухина, **Е.В. Дубина** // В сборнике: «Инновационные разработки по селекции и технологии возделывания сельскохозяйственных культур»: материалы Международной научной конференции. – 2018. – С. 154-161.

60. **Дубина, Е.В.** Изучение генетической структуры популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. и научное обоснование иммуногенетической защиты культуры риса / **Е.В. Дубина**, М.Г. Рубан, Ю.А. Макуха, П.И. Костылев, И.А. Шилов, Ю.А. Анискина, Н.С. Велишаева // В сборнике: Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем: материалы Международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 91-94.

61. **Дубина, Е.В.** Создание новых линий и сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу с использованием методов маркерной селекции / **Е.В. Дубина**, В.Н. Шиловский, М.Г. Рубан, П.И. Костылев, А.М. Оглы, Д.А. Пищенко // В сборнике: «Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем»: материалы Международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 333-336.

62. Скаженник, М.А. Создание и улучшение исходного материала риса, устойчивого к низким положительным температурам / М.А. Скаженник, В.А. Дзюба, В.С. Ковалев, **Е.В. Дубина**, И.Н. Чухирь, Т.С. Пшеницына, Е.Г. Савенко, В.А. Глазырина, Л.А. Шундрин, Е.В. Чинченко, Н.А.

Шиш // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2018. – № 13. – С. 444-446.

63. Костылев, П.И. Создание сортов риса с несколькими генами устойчивости к пирикулярриозу при помощи маркеров / П.И. Костылев, Е.В. Краснова, **Е.В. Дубина** // В сборнике: «Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем»: материалы Международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 345-348.

64. **Дубина, Е.В.** Создание сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, на основе применения ДНК-технологий / **Е.В. Дубина**, В.Н. Шиловский, П.И. Костылев, М.Г. Рубан, А.М. Оглы // Биотехнология и селекция растений. – 2019. – Т. 2. – № 1. – С. 16-23. – DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-16-23

65. **Дубина, Е.В.** Апробация метода электрофореза в кислом (рН 3,2) буфере для целей сортовой идентификации и контроля сортовой чистоты риса / **Е.В. Дубина**, Ж.М. Мухина // В сборнике: «Эволюция научных технологий в растениеводстве»: сборник научных трудов, посвященный 90-летию КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Российская академия сельскохозяйственных наук, Краснодарский ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко. – Краснодар, 2004. – С. 273-278.