

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РИСА

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

Диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Краснодар, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ.....	22
1.1. Понятие молекулярно-генетического маркера.....	23
1.2. Типы молекулярных маркеров.....	26
1.2.1. ДНК - маркеры, основанные на ПЦР, как информативном методе изучения генетических источников.....	28
1.2.1.1. Микросателлитные молекулярные маркеры.....	33
1.3. Основные направления и преимущества использования молекулярных маркеров.....	35
1.4. Применение маркер-вспомогательной селекции (MAS) на рисе.....	40
1.5. Рис: особенности объекта и состояние исследований.....	44
1.6. Гены устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам и механизмы их действия.....	48
1.6.1. Гены устойчивости к фитопатогенам и механизмы их действия.....	49
1.6.1.1. Гены устойчивости к пирикуляриозу.....	53
1.6.2. Гены толерантности к длительному затоплению и механизмы их действия.....	60
1.6.3. Гены толерантности к низким положительным температурам в период проростания и всходов семян риса и механизмы их действия.....	63
1.7. Пирикуляриоз (<i>Pyricularia oryzae</i> Cav.): особенности объекта и состояние исследований.....	64

1.8. Использование молекулярно-генетических маркеров для оценки гибридности семян F ₁ овощных культур.....	70
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	73
2.1. Исходный материал.....	73
2.2. Выделение геномной ДНК.....	76
2.2.1. Выделение ДНК из растительного материала риса и овощных культур.....	76
2.2.2. Выделение геномной ДНК из мицелия гриба <i>Pyricularia oryzae</i> Cav.....	79
2.3. Условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	78
2.4. Электрофорез продуктов амплификации.....	81
2.5. Проведение гибридизации.....	82
2.6. Молекулярные маркеры, используемые в работе.....	83
2.6.1. SSR-маркеры в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу.....	84
2.6.2. SSR –маркеры в селекции риса на толерантность к длительному затоплению.....	87
2.6.3. SSR-маркеры на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания семян риса.....	89
2.6.4. SSR-маркеры, используемые при изучении биоразнообразия фитопатогенного гриба <i>Pyricularia oryzae</i> Cav.....	91
2.6.5. SSR-маркеры, используемые для оценки генетической чистоты гибридов F ₁ капусты белокочанной (<i>Brassica oleracea</i> L.) и перца сладкого (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	96
2.7. Методика проведения фитопатологического тестирования на устойчивость к пирикулярриозу.....	100
2.8. Оценка селекционного материала по хозяйственно-	

ценным признакам.....	101
2.9. Грунт-контроль, как метод определения уровня гибридности гибридов F ₁ овощных культур.....	103
2.10. Статистический анализ	104
2.11. Агротехнологический фон и условия произрастания сортов и генотипов риса и овощных культур, отобранных для молекулярно-генетического анализа.....	105
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	108
3.1. Селекция риса на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды.....	108
3.1.1. Селекция риса на устойчивость к пирикулярриозу на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров.....	109
3.1.2. Объединение генов устойчивости к пирикулярриозу и разработка мультипраймерных систем по их идентификации.....	122
3.1.3. Изучение селекционного материала с генами резистентности к пирикулярриозу по хозяйственно-ценным признакам и устойчивости к <i>Pyricularia oryzae Cav.</i>	128
3.2. Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пониженным положительным температурам в период прорастания семян	139
3.3. Введение гена устойчивости к длительному затоплению Sub1 в отечественную генплазму риса как фактор борьбы с сорными растениями.....	154
3.4. Генотипирование изолятов краснодарской популяции <i>Pyricularia oryzae Cav.</i> методом ПЦР.....	162
3.5. Определение генов (а)вирулентности высоковариобельного грибного фитопатогена <i>Pyricularia oryzae Cav.</i>	189
3.6. Оценка сортовой чистоты гибридов F ₁ <i>Brassica oleracea</i>	

<i>L.</i> с использованием SSR-маркеров.....	196
3.7. Оценка сортовой чистоты гибридов F_1 <i>Capsicum annuum</i>	
<i>L.</i> на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров.....	204
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	213
ВЫВОДЫ	214
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ И	
СЕМЕНОВОДСТВУ.....	217
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	218
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	249

ВВЕДЕНИЕ

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.

Использование ДНК-технологий в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур, а также в изучение биоразнообразия микроорганизмов позволяет значительно расширить область научных исследований: от поиска и изучения генетических ресурсов растений с комплексом хозяйственно-ценных признаков, устойчивых к био- и абиотическим стрессорам до создания новых генотипов с заданными свойствами, определении их качества и генетической чистоты, а также изучения молекулярно-генетической структуры грибных фитопатогенов для разработки стратегии иммуногенетической защиты от болезней, сочетающей в себе экологичность, ресурсо- и энергосбережение и высокую эффективность для обеспечения продовольственной безопасности страны (Дубина и др., 2017 в).

Ввиду того что пирикуляриоз (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.

Применение методов молекулярного маркирования особенно актуально и 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. Применение ДНК-маркеров для контроля генетической однородности партий семян гибридов F₁ овощных культур (капусты белокочанной и перца сладкого) в условиях постоянно меняющейся конъюнктуры рынка значительно способствует повышению качества получаемых семян, конкурентоспособности и импортозамещению.

На сегодняшний день разработано значительное количество типов молекулярных маркеров, которые основаны на анализе полиморфизма нуклеотидной последовательности ДНК, что является ключевым моментом при выборе маркерных систем. (Kennard, 1994; Леонова, 2013; Хлесткина, 2011, 2013).

В поисках эффективных высокополиморфных молекулярных маркеров мы остановились на SSR-маркерной системе (Simple Sequence Repeats – микросателлиты), которая успешно применяется на различных сельскохозяйственных культурах (Sekic et al., 2001; Tikunov et al., 2003; Staub et al., 2007; Varshney et al., 2005, 2007). SSR распространены по всему геному, нейтральны по отношению к условиям окружающей среды, имеют кодоминантный характер наследования (способность выявлять генотипы в гомо-и гетерозиготном состоянии) и доступность таких маркеров связана с невысокой стоимостью, надежностью, высокой воспроизводимостью метода (Чесноков, 2013).

Цель и задачи исследования. Цель – 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 пирикуляриозу 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 пирикуляриозу (*Pi*) и толерантности к длительному затоплению (*Sub*) на основе методов ПЦП 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.), основанной на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сорты и исходный материал риса с генами устойчивости к пирикуляриозу *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 географическая 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 пирикуляриозу *Pi-ta*, сорт риса Пируэт с тремя генами устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*), Пентаген с пятью генами устойчивости к пирикуляриозу *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 пирикуляриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-40*, а также линии риса с тремя и пятью генами, придающими длительную устойчивость к *Pyricularia oryzae*, которые при фитопатологическом тестировании оценены как устойчивые к смеси штаммов патогена, выделенных из гербарного материала с признаками поражения болезнью, собранного в рисовых агрофитоценозах на юге России.

Впервые разработаны мультипраймерные системы для идентификации двух генов *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 пирикуляриозу 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 пирикуляриозу для юга России, которые рекомендованы практической селекции для программ по созданию устойчивых генресурсов риса.

Проведена генетическая паспортизация штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav., 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», (номер заявки 2018621608, приложения 21, 22).

Впервые в селекционной практике риса в России на основе метода молекулярного маркирования создан селекционный материал риса, совмещающий в себе гены устойчивости к пирикуляриозу 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 большой объем селекционного материала, устойчивого 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 F₁ капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) и перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) на образцах коллекции ВНИИ риса.

Практическое значение работы. 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. (О чём имеется акт о внедрении, приложения 1-2).

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 пирикуляриозу 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 пирикуляриозу одновременно два гена, значительно

сокращают время и затраты на ПЦР-анализ, что повышает экономическую эффективность маркер-вспомогательной селекции (MAS - Marker Assisted Selection).

Возделывание сортов риса, имеющих гены толерантности к длительному затоплению, является экологически щадящей стратегией рисоводства, позволяющей сократить до минимума применение гербицидов на рисовых полях. Безгербицидные технологии в рисоводстве неизбежно улучшат чистоту вод оросительных систем и значительно поднимут экологический статус рисоводства в регионе.

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 *Pyriculari 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 заболеванию.

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 F₁ 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.

Апробация результатов работы. Диссертационная работа обобщает результаты лабораторных и полевых исследований (2007-2018 гг.) по обоснованию использования современных методов молекулярного маркирования в селекции риса и семеноводстве овощных культур. Её основные положения 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 Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» (18-20 ноября 2009 года, Краснодар); 14-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология- наука XXI века» (Пущино, 2010); Научной конференции «Научно-техническое творчество молодежи - путь к обществу, основанному на знаниях», за что получена золотая медаль «НТТМ-2010», ВВЦ (приложение 3, Москва, 2010); VII Всероссийской научной конференции молодых ученых и студентов «Современное состояние и приоритеты развития фундаментальных наук в регионах» - получен диплом (Анапа, 2010); III Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов «ИННОВАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В АПК» - получен диплом (13 – 15 апреля 2011 года, г. Москва); XII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». (Москва, 2012); Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» - получена бронзовая медаль (Москва, 2014 г., приложение 4); Международном конгрессе по рису (Тайланд, 2014 г.); научно-образовательной конференции молодых ученых «Инновационные

биотехнологии в развитии АПК» - получен диплом (Краснодар, 2015 г.); Международной виртуальной интернет-конференции "Достижения и перспективы развития селекции и технологий возделывания риса в странах с умеренным климатом» (Краснодар, 2015 г.); Втором междисциплинарном научном форуме с международным участием «Новые материалы» (Сочи, 2016); Международном саммите молодых ученых «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства» диплом (Краснодар, 2016); Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС» (Москва, Сколково, 2016 г.); Международной научной конференции "Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты", 18 -24 сентября 2017 г., Крым, Судак; IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире». 20-24 ноября 2017 г. Санкт-Петербург; VI Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки в современном мире», г. Уфа, 9 марта 2018 г.; Всероссийской научно-практической конференции Кубанского отделения ВОГиС «Генетический потенциал и его реализация в селекции, семеноводстве и размножении растений», ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ, г. Краснодар, 21 марта 2018 г.; Международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности», ФГБНУ ВНИИФ 22 – 25 августа 2018 года в рамках Международного форума «Неделя Национальной Безопасности»; IV Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в области генетики, селекции, семеноводства и размножения растений», 3-8-сентября 2018 г. на базе Никитского ботанического сада Национального научного центра РАН, г. Ялта; 10-й Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в Российской Федерации», 11-13 сентября 2018 г., г. Краснодар, ФГБНУ «ВНИИБЗР».

В 2010 г. 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. работа получила 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 (Приложение 5, 6).

Имеется ряд дипломов, грамот, призовых мест за участие в конкурсах на лучшую научно-исследовательскую разработку Международных научных конференций.

В 2017-2018 гг. на 19-й и 20-й Российской агропромышленной выставке «Золотая Осень» в номинации «Инновационные разработки в области агробιοтехнологии» соискатель получила золотые медали (Приложение 7, 8).

В 2018 году соискатель в соавторстве с коллегами института стала лауреатом премии Правительства РФ в области науки и техники (Приложение 9) 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 государственного задания в 2007-2018 гг. на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» в лаборатории биотехнологии и молекулярной биологии, на вегетационных и лизиметрических площадках, в камерах искусственного климата, а также на опытных полевых полигонах рисовой оросительной системы института и Федерального государственного унитарного элитно-семеноводческого

предприятия «Красное» Всероссийского научно-исследовательского института риса.

В 2007-2012 гг. по темам 04.03.02.02 «Создать устойчивые к пирикулярриозу 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». С 2013 по 2015 гг. в рамках 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 пирикулярриозу 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». В 2016 г. - по темам (проекту) № 0685-2014-0039 «Создать новые линии риса, устойчивые к пирикулярриозу с использованием методов маркерной селекции. Создать сорта-дифференциаторы рас пирикуляррии на генетической основе отечественных сортов» и по теме (проекту) № 0685-2014-0037 «Разработать методику оценки сортовых качеств семян перца сладкого, капусты белокочанной на основе молекулярно-генетического подхода для совершенствования семеноводческого процесса».

В 2017 г. по темам № 0685-2014-0039 «Создать новые линии риса, устойчивые к пирикулярриозу с использованием методов маркерной селекции. Получить синтетическую популяцию патогена *Pyricularia oryzae* Cav., состоящую из штаммов, выделенных в рисосеющих районах Краснодарского края, с высокой спорулирующей способностью»; № 0685-2016-0001: «Разработать методику оценки капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу на основе молекулярно-генетического подхода»; № 0685-2014-0037 «Разработать методику оценки сортовых качеств семян

перца сладкого, капусты белокочанной на основе молекулярно-генетического подхода для совершенствования семеноводческого процесса».

В 2018 г. - по теме (проекту) № 0685-2014-0039 «Создать новые линии риса, устойчивые к пирикуляриозу с использованием методов маркерной селекции. Получить синтетическую популяцию патогена *Pyricularia oryzae* Cav., состоящую из штаммов, выделенных в рисосеющих районах Краснодарского края, с высокой спорулирующей способностью».

Кроме того, научные результаты получены в рамках проектов РФФИ:

1. «р_а» № 16-44-230178 «Изучение генетической структуры популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. и научное обоснование иммуногенетической защиты культуры риса» в 2016-2018 гг. ;

2. РФФИ «р_а» № 16-44-230435 «Разработка методологических основ ДНК-идентификации генов толерантности к длительному затоплению у риса как фактору экологической борьбы с сорными растениями и создание генетических ресурсов для селекции устойчивых сортов *Oryzae sativa* L.» в 2016-2018 гг.

Международного сотрудничества по Международному Консорциуму по исследованиям риса в странах с умеренным климатом на темы (2015-2018 гг):

1. «Создание устойчивых к *Magnaporthe grisea* L. сортов риса с использованием современных постгеномных технологий (молекулярное маркирование)».

2. «Создание холодостойких сортов риса со стабильным потенциалом продуктивности в рамках Консорциума стран с умеренным климатом».

Контрактов по программе «У.М.Н.И.К.» №3р от 4 марта 2010 года «Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пирикуляриозу» и №9557р/14195 от 4 июля 2011 года «Молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пирикуляриозу»

А также в рамках хозяйственных договоров 2012-2018 гг. с Федеральным государственным унитарным элитно-семеноводческим предприятием «Красное» ВНИИ риса на создание научно-технической продукции по теме «Испытание линий риса с генами резистентности к пирикуляриозу на устойчивость к краснодарской популяции *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Herbert Barr)) в условиях ФГУП ЭСП «Красное».

Публикации результатов исследований. 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 3 научные работы, входящие в базу данных статей Web of Sciences и 1 - Scopus.

Заявки на патенты.

Заявка на сорт риса Ленарис 2018 г. (приложения 10, 11, 12)

Заявка на сорт риса Капитан 2018 г. (приложения 13, 14).

Заявка на сорт риса Альянс 2017 г. (приложения 15, 16, 17, 18).

Заявка на сорт риса Пируэт 2017 г. (приложения 19, 20)

Свидетельства на базы данных.

База данных «Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России», Свидетельство № 2019620149 от 24.01.2019 г. (приложения 21, 22).

База данных «Анализ популяций возбудителя пирикуляриоза риса (*Pyricularia oryzae* Cav.) по признаку вирулентности», Свидетельство № 2019620132 от 22.01.2019 г. (приложения 23, 24).

Личный вклад соискателя. 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 участие в проведении научных исследований, сборе экспериментальных данных, их анализе и обработке; апробации результатов исследований; подготовке и опубликованию 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» (Москва).

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность доктору сельскохозяйственных наук, профессору Зеленскому Григорию Леонидовичу, который привлек меня к научно-исследовательской работе; научному консультанту, доктору сельскохозяйственных наук, профессору Гаркуше Сергею Валентиновичу, а также академику Харитонову Евгению Михайловичу, доктору биологических наук Мухиной Жанне Михайловне, которые помогали, всесторонне поддерживали и предоставляли все необходимые технические возможности для проведения лабораторных экспериментов. Директорам хозяйств Максименко Евгению Петрович и Кизиньку Сергею Владимировичу за предоставленные технические возможности проведения полевых опытов, а также всестороннюю поддержку. Особую благодарность я выражаю доктору биологических наук, профессору Авакян Эльмире Рубеновне и Харченко Елене Семёновне за полезное обсуждение результатов и ценные советы, а также за поддержку и помощь на всех этапах исследования, которую сложно переоценить. Я благодарна докторам биологических наук Чеснокову Юрию Валентиновичу и Шилову Илье Александровичу, чьими советами я руководствовалась при работе с молекулярными методами. Отдельную благодарность выражаю селекционерам докторам сельскохозяйственных наук Костылеву Павлу Ивановичу, Шиловскому Валентину Николаевичу и Королёвой Светлане Викторовне за предоставленный селекционный растительный материал риса и овощных культур для проведения исследований и ценные советы. Я благодарна своему коллективу за плодотворное сотрудничество, поддержку и помощь. Глубокую благодарность выражаю своим родителям и всем друзьям, поддержавшим меня в работе.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, включающих: обзор литературы, описания использованных материалов и методов для исследований, результатов и их обсуждение, заключения, выводов, предложений для практической селекции и семеноводства, списка литературы и приложений, содержит 275 страницы машинописного текста, включающих 20 таблиц и 74 рисунка в основном тексте и 20 рисунков в приложениях. Список использованной литературы включает 242 источника, в том числе 167 – иностранных авторов.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

За последние два десятилетия наблюдается экспоненциальный рост использования молекулярных маркеров в изучении разнообразных аспектов жизнедеятельности растительных организмов. Общее количество работ уже приближается к двум десяткам тысяч. В связи с этим очевидна не только значимость использования различных типов молекулярных маркеров, но и корректность оценки получаемых с их помощью результатов. Опираясь на огромный экспериментальный опыт, в целом ряде обзоров исследователями сформулированы преимущества и недостатки используемых молекулярных маркеров, основные требования при их выборе для того или иного рода исследований. Несмотря на разнообразие маркеров, существует ряд первоочередных общих требований и критериев, позволяющих повысить достоверность получаемых результатов. В их числе выбор адекватного типа маркеров для решения поставленной задачи; достаточно высокая полиморфность маркеров, высокая разрешающая способность, кодоминантность, частота и равномерность распределения по геному, высокая воспроизводимость.

Не менее важным и существенным при генетическом анализе является минимизирование ошибок, которые разделены исследователями на категории. Главные из них: соответствующее качество и количество анализируемой ДНК; оценка и отбор оптимальных праймеров для повышения информативности соответствующих локусов; особенности Taq-полимеразы и оптимизация условий ПЦР; надлежащее использование повторностей и контролей, а также адекватность статистических подходов для оценки полученных результатов и выявления ошибок при анализе. Поэтому в последующих разделах данной главы рассмотрим понятия молекулярного маркера, а также проанализируем возможности их

использования в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур и растительных ресурсов.

1.1 Понятие молекулярно-генетического маркера

Маркер (от англ. Marker) – специфичная метка, индикатор. В биохимии фактор идентификации. В генетике и селекции маркером называют ген известной локализации, по которому можно выявлять другие гены (Конарев, 1998; Дубина, 2003; Чесноков, 2013).

Молекулярные маркеры (синоним – ДНК - маркеры) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне нуклеиновых кислот. В роли маркера может выступать любой фрагмент ДНК, находящийся в тесной генетической связи с анализируемым геном (Хлёткина, 2013; Календарь, 1994).

По Серебряковскому А. С., генетические маркеры, или, как их еще называют, сигнальные гены, представляют собой гены, детерминирующие наследуемый отчетливо выраженный фенотипический признак, различимый у разных особей, который сопряжен с изменчивостью другого, качественного или количественного признака. Последнее позволяет выявить характер его наследования, будучи нейтральным по отношению к самому исследуемому гену или признаку (Серебряковский, 1970).

Генетический маркер может быть определен как:

- хромосомная метка или аллель, позволяющие проследить специфичный район ДНК;
- специфичный фрагмент ДНК с известной позицией в геноме;
- ген, у которого фенотипическая экспрессия обычно легко отличима и может быть использована для идентификации несущей её особи или клетки (ткани, органа) либо как зонд для мечения клеточных органелл (ядер, митохондрий, хлоропластов), хромосом или хромосомных локусов (Чесноков, 2013).

Согласно установленной терминологии, генетические маркеры обычно подразделяют на три основных класса:

1. Морфологические маркеры – маркеры, выявляемые на уровне фенотипа организма. Они являются обычно визуальной характеристикой фенотипически различающихся признаков, таких, как окраска, форма, размер цветка, семян и листья, тип развития растений, соцветий или корневой системы, пигментация, габитус или даже характер произрастания.

2. Биохимические маркеры, основанные на определении генного продукта или продукта его активности и требующие для их выявления и визуализации проведения какого-либо биохимического анализа. Этот класс маркеров включает различного рода белки (запасные, транспортные, строительные, различные ферменты и др.) и метаболиты (сахара, углеводы, вторичные метаболиты и др.), которые выявляют биохимическим путём и очисткой из различных органов или тканей исследуемого организма.

3. Молекулярные маркеры – маркеры, выявляемые на уровне нуклеиновых кислот как источника информативного полиморфизма. Это связано с тем, что каждая отдельно взятая нуклеиновая последовательность уникальна по своей структуре. Последовательность ДНК может быть использована для любых исследований генетического разнообразия и взаимодействия между организмами (Чесноков, 2013).

По мнению ряда исследователей, «идеальный» генетический маркер должен быть:

- полиморфным, т.к. «исходным материалом» генетика и селекционера является изменчивость, а полиморфизм – её отражение или проявление;
- мультиаллельным, поскольку благодаря этому увеличивается чистота и спектр полиморфности;
- кодоминантным, потому что в этом случае гетерозиготный гибрид одновременно проявляет свойства обоих родителей, что позволяет различать обе гомозиготы как друг от друга, так и от гетерозиготы;

- неэпистатичным, поскольку проявление маркера индивидуального генотипа может быть выявлено визуально независимо от местоположения выбранного маркера в геноме индивидуума (кодминирование и неэпистатическое проявление признака могут быть определены как отсутствие внутри- и межлокусного взаимодействия, соответственно);

- «нейтральным», так как замена аллелей в маркерном локусе не имеет фенотипического или селективного эффекта (полиморфизм на молекулярном уровне ДНК почти всегда нейтрален);

- нечувствительным к воздействию окружающей среды, что должно проявляться в корреляции фенотипа и проявлении маркера или маркерного признака вне зависимости от воздействия окружающей среды (Чесноков, 2013; Дубина, 2003).

Морфологические маркеры практически не соответствуют этим критериям. Они полиморфны и в большинстве случаев либо рецессивны, либо доминантны, а также часто подвержены влиянию других свойств или признаков и могут быть зависимы от воздействия окружающей среды (Хлесткина, 2013).

Биохимические и молекулярные маркеры отвечают этим требованиям. Основное ограничение для изоферментов - это малое число локусов в геноме, которое может быть ими (изоферментами) маркировано или определено. Кроме того, не все ферменты активны или присутствуют во всех тканях или органах растений. Полиморфизм разного рода белков, выявляемый не только одномерным, но и двумерным электрофорезом, может быть более многочисленным и информативным, но также зависит от органа или тканей растений, из которых выделяли белки (Чесноков, 2013; Дубина, 2003).

В противоположность этому генетические маркеры на уровне ДНК практически бесчисленны и не зависят от специфичности анализируемых частей растений, а также от стадии развития организма, поскольку ДНК во всех органах и тканях данного растения по своему химическому составу и структуре всегда одна и та же (Weising et al., 1995).

К генетическим маркерам можно отнести и цитогенетические маркеры (Карлов, 2010; Чесноков, 2013). Они занимают особое место, обладая одновременно свойствами как биохимических, так и молекулярных маркеров. Специфика выявления цитогенетических маркеров на цитологическом уровне делает их ограничено доступными и зависимыми от морфо-анатомического строения изучаемого организма и специального дорогостоящего оборудования и химреактивов. Поэтому цитогенетические маркеры, по сравнению с другими классами маркеров, не получили широкого распространения и возможности массового применения.

Можно выделить (хотя и довольно условно) три направления использования молекулярно-маркерных технологий в растениеводстве: в работе с мировыми генетическими ресурсами растений; в селекционной работе; в семеноводстве и семенном контроле (Конарев, 1998).

В настоящее время для решения многих вопросов в биологии, животноводстве и растениеводстве большое значение приобретают ДНК – маркеры (или нуклеиновые). Они генотипичны, не зависимы от условий развития организма в потомстве проявляют кодоминантное наследование и не опосредованы плейотропией гена (Дубина, 2003; Ильницкая, 2007).

1.2 Типы молекулярных маркеров

Маркеры, используемые в молекулярной биологии, прошли достаточно длительный эволюционный путь. Первым поколением молекулярных маркеров являются классические генетические маркеры (Дубина, 2003; Хлесткина 2013). Они соответствуют гену, аллели которого имеют четко выраженные отличия по фенотипу. Белковые маркеры соответствует гену, аллели которого различаются по белковому продукту, а именно по молекулярной массе. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Они соответствуют гену или некодирующему участку генома, аллели которого отличаются на уровне ДНК. Отличия на уровне

ДНК (полиморфизм ДНК), а также к ДНК, амплифицированной непосредственно с РНК могут быть выявлены с помощью гибридизации с известными нуклеотидными последовательностями; при секвенировании нуклеотидной последовательности; при сравнении длины фрагментов, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), в результате обработки ДНК эндонуклеазами рестрикции (Чесноков, 2013).

На сегодняшний день известно несколько десятков типов молекулярных маркеров, которые разделяют на монолокусные и мультилокусные. Монолокусные маркеры чаще всего имеют кодоминантный, а мультилокусные – доминантный тип наследования (Хлесткина, 2013). ДНК-маркеры перечислены на рисунке 1. Их разделяют на три группы, согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации (RFLP), ПЦР (RAPD, AFLP, SSR, SNP, CAPS, SCAR, маркеры на основе ретротранспозонов и др.) и ДНК-чипов.

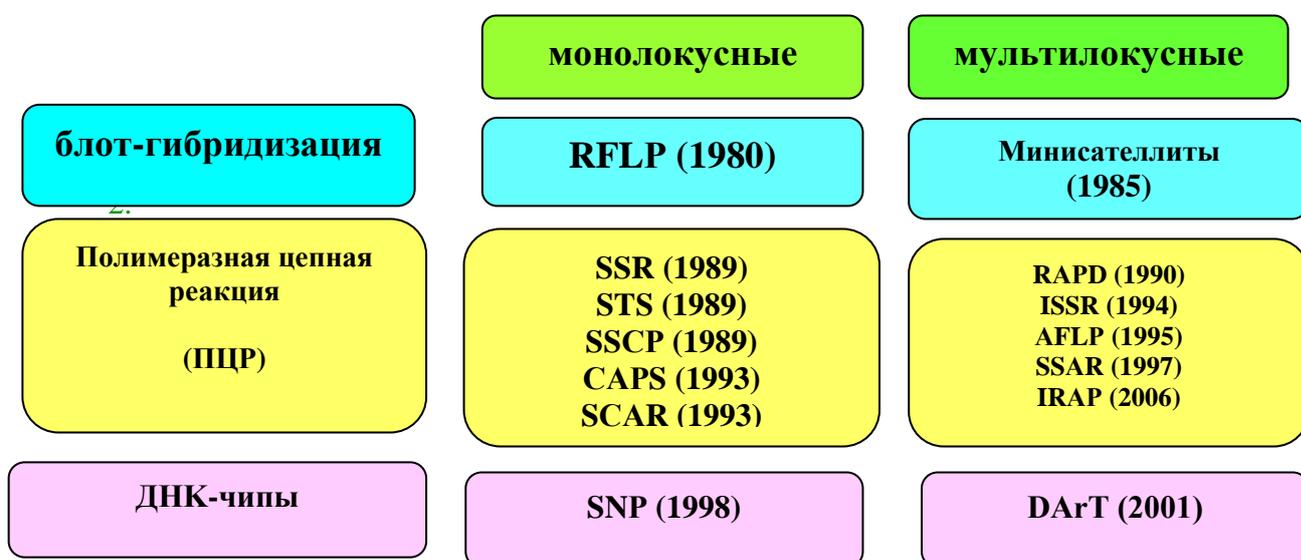


Рисунок 1 – Схематическая классификация молекулярных маркеров (Хлесткина, 2013)

Примечание: 1980, 1985, 1989, 1990, 1994, 1993, 1995, 1997, 1998, 2001, 2006 – год первого упоминания о молекулярных маркерах в научных публикациях.

По Хлесткиной (2011, 2013 гг.) и Чеснокову (2013), данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК-маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое распространение в 1980-е годы. В 1990-е годы ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000-е годы их существенно потеснили молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов. В последнее десятилетие для анализа полиморфизма ДНК всё чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков.

Наиболее широко используемые молекулярно-генетические маркеры условно можно подразделить на следующие типы — маркеры участков структурных генов, кодирующих аминокислотные последовательности белков (электрофоретические варианты белков), маркеры некодирующих участков структурных генов и маркеры различных последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам, как правило, неизвестно — распределение коротких повторов по геному (RAPD — случайно амплифицируемая полиморфная ДНК; ISSR — инвертированные повторы; AFLP — полиморфизм в сайтах рестрикции) и микросателлитные локусы (тандемные повторы с длиной элементарной единицей в 2-6 нуклеотидов).

1.2.1 ДНК - маркеры, основанные на ПЦР, как информативном методе изучения генетических источников

Молекулярные маркеры, образованные при помощи ПЦР, принцип которой был предложен Кэри Мюллисом (фирма “Cetus”, США) в 1983 г. (Mullis et al., 1987) стали очень важным компонентом в расширении научных знаний, потому что в отличие от, к примеру, ранее используемых морфологических маркеров они имеют бóльшую информативность и не подвержены влияниям условий окружающей среды.

В основе метода полимеразной цепной реакции лежит стандартный биологический процесс, происходящий во всех клетках – репликация – комплементарное достраивание ДНК на матрице материнской ДНК при помощи специфического класса ферментов ДНК-зависимых ДНК-полимераз (Engelke et al., 1990).

К ПЦР-маркерам, где предполагается использование специфических праймеров и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК следует отнести:

- **SSR** — (Simple Sequence Repeats - микросателлиты) – ПЦР с фланкирующими праймерами к короткому мини или микросателлитному повтору, которая позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобно для выявления гетерозигот по данному локусу (Taramino et al., 1994; электронный ресурс: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/396708>).

- **RAPD** — (Random Amplified Polymorphic DNA), полимеразная цепная реакция с использованием единичного короткого, обычно, 10-членным праймеров, с произвольной нуклеотидной последовательностью. В RAPD можно использовать как одиночный праймер, так и несколько RAPD праймеров. Продукт RAPD образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированной инвертированной последовательностью используемого праймера. Метод универсален для исследований разных видов, при использовании одних и те же праймеров. Как правило, праймер, выявляющий высокий полиморфизм для одного вида, будет также эффективен и для других видов (Mammadov et al., 2012; Khush et al., 2001; Luce et al., 2000; Чесноков 2013; электронный ресурс: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/396708>).

- **ISSR** — (Inter Simple Sequence Repeats), специализированный вариант RAPD метода, в котором праймер состоит из микросателлитной последовательности. В этом методе так же, как и

в RAPD, используется один или несколько праймеров, длиной в 15-24 нуклеотида. Но в данном случае, праймеры состоят из тандемных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одним или двумя селективными нуклеотидами на 3'-конце праймера. Продукты ISSR амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера (Календарь, 1994; электронный ресурс: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/396708>).

- **AFLP** — (Amplified Fragment Length Polymorphism), технология представляет собой комбинацию между ПДРФ и ПЦР-методами. AFLP — сложный метод и состоит из нескольких этапов: геномная ДНК одновременно рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI), узнающими 4 и 6 оснований, соответственно, получая фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная геномная ДНК лигируется с адаптором, содержащим «липкие» концы для рестрикционных сайтов (EcoRI и MseI). После этого проводится две последовательные ПЦР. В первой ПЦР (преамплификация) используются праймеры полностью комплементарные адапторам EcoRI и MseI. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов амплификации между EcoRI и MseI адапторами, которые трудно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэтому во второй ПЦР праймеры с EcoRI и MseI адапторами содержат на 3'-конце дополнительные и не комплементарные адапторам от 1 до 3 основания, для селективной амплификации. Разделение фрагментов ДНК выполняется в полиакриламидном геле, с радиоактивной или флюоресцентной меткой, соответственно (Vos et al., 1995).

- **SSAP** — (Sequence Specific Amplification Polymorphism) — полиморфизм сиквенс специфичной амплификации. Это модификация метода AFLP. Отличие заключается в двухступенчатой ПЦР (Mackill D.J., Ni J., 2001).

- **IRAP** — (Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism), полимеразная цепная реакция между праймерами, комплементарными последовательностям двух рядом расположенных LTR ретротранспозона. (Powell, et al., 1996).

- **REMAP** — (Retrotransposone Microsatellite Amplified Polymorphism), полимеразная цепная реакция между праймером к фрагменту LTR ретротранспозона и праймером из рядом расположенного, простого микросателлитного повтора (ISSR праймер). (Jansen et al., 2001).

- **RBIP** — (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms), метод, основанный на использовании праймеров к последовательностям ретротранспозонов и выявляющий кодоминантные аллельные варианты. Его принцип основан на мультилокусной ПЦР, в которой используются пара праймеров, фланкирующих участок ДНК до ретротранспозиции и праймер к LTR ретротранспозона, который встроен в данный участок между первыми двумя праймерами. Этот метод выявляет полиморфизм только для данного полиморфного локуса. К его достоинствам относят кодоминантность полиморфных вариантов, возможность использования для дот-блот - анализа большого количества сортов.

- **iPBS** — (inter PBS amplification - участок связывания тРНК), метод, основанный на использовании праймеров к PBS последовательностям ретротранспозонов. Метод эффективен для выявления полиморфизма между образцами, а также для клонирования новых ретротранспозонов у эукариот.

- **SNP** (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм (Хлёткина Е.К., 2013).

- **CAPS** (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности.

- **DArT** (diversity array technology) – ДНК чип технология для изучения разнообразия растений и животных.

- **SCAR** (sequence characterized amplified region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью (Levy M., et. al., 1991).

- **SSCP** (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК (Хлесткина Е.К., 2013).

- **STS** (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью (Park Joong-Hyeop et al., 2005).

Использование ПЦР имеет ряд преимуществ, существенно выделяющих этот метод в арсенале современных биологических технологий: экономность в использовании ДНК; легкость в выполнении; возможность автоматизации процесса; не требует радиоактивных и других меток для визуализации результатов анализа, и, кроме того, в связи с широким выбором праймеров открываются большие возможности для выполнения разносторонних исследований (Кожухова, 1998, 2003; Малюта, 2005).

Именно с появлением ПЦР-маркеров началось широкое внедрение ДНК-маркеров в селекционный процесс. С помощью молекулярных маркеров можно проводить отбор по генотипу, тогда как в традиционной селекции отбор индивидуумов для скрещиваний осуществляется на основе анализа фенотипа. Отбор по генотипу имеет ряд преимуществ по сравнению с отбором по фенотипу.

Имеется целый набор маркеров на основе ДНК-зондов:

- **RFLP** (ПДРФ-маркеры) — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, при котором оценка полиморфизма длин рестриктных фрагментов ДНК может быть осуществлена разными способами, но наиболее традиционен метод с использованием блот-гибридизации. Этот метод включает в себя выделение ДНК, получение фрагментов

рестрикции, их электрофоретическое разделение, перенос на фильтры с последующей гибридизацией специфических ДНК-зондов с полученными фрагментами ДНК. ПДРФ эффективен при картировании генома, маркировании генов многих биологических и экономически важных признаков (Hittalmani et al., 2000).

- **VNTR** — (Variable Number Tandem Repeat), метод получил название ДНК фингерпринта (отпечатки пальцев) тандемные повторы широко распространены в разных геномах и высокополиморфны. В результате высокой вариабельности этих участков ДНК ПДРФ-анализ с зондами к микро- и минисателлитным последовательностям позволяет получать мультилокусные спектры с высоким разрешением на популяционном уровне. Благодаря очень высокому уровню полиморфизма этот подход в настоящее время является хорошим инструментом для анализа внутри- и межпопуляционной изменчивости и определения генетических расстояний между группами организмов. VNTR-аллельные варианты имеют кодоминантный характер наследования.

Мы перечислили лишь небольшую часть методов, используемых современными исследователями. Их количество будет постоянно пополняться и от того, насколько эффективно будет их использование, зависит не только практическая реализация задач по сохранению и поддержанию генетических ресурсов, но и дальнейшие успехи в генетике и селекции растений.

1.2.1.1 Микросателлитные молекулярные маркеры

Идеальной маркерной системой при проведении идентификации генотипа и паспортизации сортов, QTL-анализе (анализ локусов количественных признаков), картировании и клонировании генов, скрининге крупных инсерционных библиотек, осуществлении

маркерной селекции являются микросателлитные маркеры (Weber, 1990).

Микросателлитные генетические маркеры обладают рядом положительных свойств, делающих их очень удобными для исследований:

- микросателлитные локусы в большом количестве распределены по всему геному, что облегчает использование этих маркеров для молекулярного картирования генома;

- эти локусы в основном локализованы в некодирующих регионах генома и, следовательно, селективно нейтральны;

- для этих локусов характерна быстрая эволюция, которая обусловлена дрейфом и мутациями;

- микросателлитам свойственен менделевский кодоминантный тип наследования, что позволяет отличать гомозиготное состояние от гетерозиготного (Morgante, 1993);

- микросателлиты консервативны у близких видов, что зачастую позволяет использовать одни и те же праймеры и сходные протоколы анализов для проведения исследований;

- для анализа микросателлитов требуется очень малое количество ткани анализируемого растения, поэтому возможно прижизненное взятие образцов ДНК для анализа (Thomas, 1993).

Высокая скорость мутирования, большое аллельное разнообразие и гетерозиготность, достигающая 90 %, микросателлитных локусов открывают беспрецедентные перспективы для индивидуальной идентификации, изучения индуцированного мутационного процесса в различных демографических, экологических и природоохранных исследованиях (Ma et al., 1996; Liu et al., 2003; Sasaki, 2001).

Наличие микросателлитных повторов и их наследование в геноме риса впервые продемонстрировано в работах Wand et al. (2008) и McCouch et al. (1997). Так авторами только при скрининге геномной библиотеки было

оценено 5700-10000 микросателлитов, что продемонстрировало их широкое распространение в геноме этого вида растений.

Последующее секвенирование генома риса позволило предположить, что общее количество микросателлитных последовательностей, составляет порядка 100000 (McCouch et al., 2001).

Около 100000 микросателлитных маркеров были локализованы на генетической карте риса. Информация о них представлена на сайте www.gramene.org (McCouch et al., 2001; McCouch et al., 2002; Jaisval et al., 2002).

На основе микросателлитных последовательностей разработана ДНК - маркерная система ISSR (inter simple sequence repeat). ISSR - праймеры представляют собой SSR-повторы различного типа и, таким образом, в ходе ПЦР могут амплифицировать одновременно несколько участков генома, расположенных между микросателлитными последовательностями. Данный метод более надежен в сравнении с RAPD, что во многом обусловлено длиной праймеров (в среднем 18-20 пар оснований). Его широко используют в работах по изучению генетического разнообразия и паспортизации сортов культурных растений.

Дальнейшее расширение использования молекулярных маркеров, по всей видимости, будет идти по пути поиска различных типов маркеров наиболее информативных локусов геномов, причем информативность и, соответственно, подбор локусов будет специфичен для решения конкретных задач.

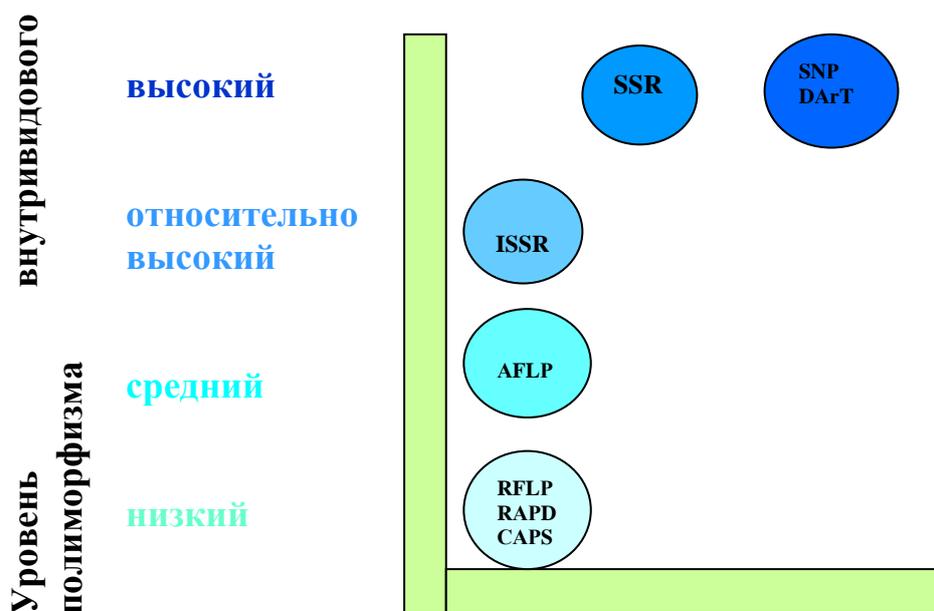
1.3 Основные направления и преимущества использования молекулярных маркеров

За последние годы накопился большой массив данных об эффективности использования молекулярно-генетических маркеров как

на уровне белков, так и ДНК, РНК, для решения многих задач генетики, селекции на устойчивость к различным стресс-факторам (Зайцев, 2001), оценки и сохранения биоразнообразия (Masojc, 2002), изучения механизмов эволюции, картирования хромосом, а также для семеноводства и племенного дела (Abdel-Mawgood, 2006).

Среди молекулярных маркеров различают маркеры с известной локализацией в геноме и маркеры, о локализации которых ничего не известно (как правило, это мультилокусные маркеры). И те, и другие находят свое применение в генетических исследованиях и в селекционных программах.

Молекулярные маркеры с неизвестной локализацией не предназначены для маркирования определенного гена или группы сцепления, но их успешно применяют в филогенетических исследованиях, для паспортизации сортов растений и пород животных. Некоторые мультилокусные маркеры подходят для создания генетических карт (DArT- и AFLP-маркеры), а также для геномной селекции (DArT). На выбор ДНК-маркеров необходимых для решения конкретной задачи влияют и такие характеристики, как уровень внутривидового полиморфизма ДНК и возможность автоматизации процесса анализа (рис.2).



Возможность автоматизации процесса анализа

Рисунок 2 - Уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации анализа различных типов ДНК-маркеров (Хлесткина, 2011)

Основные направления использования монолокусных маркеров: составление молекулярно-генетических карт отдельных хромосом и геномов в целом (обычно AFLP-и DArT-маркеры); картирование генов и QTL (обычно AFLP-и DArT-маркеры); маркирование генов, хромосом и геномов; сравнительная генетика и геномика; отбор с помощью ДНК-маркеров в селекции, геномная селекция (DArT-маркеры), молекулярная паспортизация сортов/пород, диагностика заболеваний, экологический мониторинг, исследование генетического разнообразия, филогенетические исследования, популяционная генетика (Хлесткина, 2011).

Методы селекции, в которых применяются ДНК-маркеры, разделяют на две основные группы:

1. MAS (marker-assisted selection, синонимы: MAC - маркер-вспомогательная селекция или МОС - маркер-опосредованная/ориентированная селекция) (Ashkani et al., 2011).

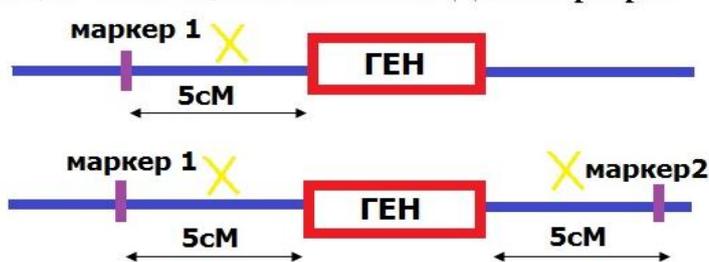
2. Геномная селекция (genomic selection) - метод современной селекции растений и животных, позволяющий при использовании равномерно распределенных по геному ДНК-маркеров проводить отбор по генотипу в отсутствие данных о генах, влияющих на признак.

Маркер – вспомогательная селекция (MAS) предполагает использование ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевым геном или локусом хромосомы, в котором такой ген находится, вместо или вместе с фенотипическим анализом и являются надежным инструментом для предсказания фенотипа. Отбор нужного аллеля целевого гена осуществляется на основе тесно сцепленного с ним аллеля маркера. Это значительно облегчает селекционную работу и позволяет быстрее создавать генотипы аккумулирующие в себе необходимые гены, в том числе гены резистентности к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды (Ashkani et al., 2011; Mohammadi at al., 2002; Костылев и др., 2017).

Для успешного выполнения программ по маркерной селекции и важно, чтобы расстояние между маркером и геном было минимальным, поэтому рекомендуется использовать маркеры, расположенные в непосредственной близости к гену (в пределах 5сМ). Надёжность маркерного отбора возрастает при использовании фланкирующих (окружающих ген с двух сторон) маркеров или внутригенного маркера, напрямую идентифицирующего нужный аллель (Мухина и др., 2011).

Принцип маркер-вспомогательной селекции изображен на рисунке 3.

отбор генотипов, несущих целевой ген, с помощью тесно-сцепленных с ним ДНК-маркеров



надёжность отбора:

1 маркер: ~ 95%

2 фланкирующих маркера:

~ 99,5 %

или маркеров прямо идентифицирующих нужный аллель



надёжность отбора:

1 маркер: 100 %

Рисунок 3 - Принцип маркер - вспомогательной селекции

Преимущество использования MAS состоит в первую очередь в снижении затрат на полевые испытания, которые проводятся от 8 до 10-12 лет, лабораторные анализы при скрининге фенотипических проявлений хозяйственно-ценных признаков, а также на резистентность к стресс-факторам или качество получаемой продукции, которое можно оценить только после репродуктивной стадии. Например, определение содержания амилозы в зерновке риса определяют после уборке урожая, применяя тем самым химический метод оценки. Зарубежными коллегами в своих исследованиях доказана эффективность использования микросателлитных молекулярных маркеров в селекционных программах по созданию сортов риса с повышенным содержанием амилозы (Garg et al., 2008).

При создании сортов и гибридов сельскохозяйственных культур методами классической селекции оценка родительских форм по ряду важных морфометрических и хозяйственно-ценных признаков проводится зачастую после фазы цветения, при которой осуществляется гибридизация, в результате чего скрещивание подобранных образцов можно осуществить лишь в следующем вегетационном периоде. Использование ДНК-маркеров позволяет

подбирать перспективные образцы и осуществлять гибридизацию в первый год их выращивания, что значительно ускоряет селекционный процесс. Благодаря такому преимуществу во многих странах мира использование молекулярных маркеров является неотъемлемой частью селекционных программ по созданию сортов и гибридов с заданными свойствами (Moose, Mumm, 2008).

1.4 Применение маркер-вспомогательной селекции (MAS) на рисе

Рядом зарубежных и российских ученых с использованием молекулярных маркеров на культуре риса были успешно проведены работы по введению и пирамидированию в одном генотипе нескольких генов устойчивости к различным стресс - факторам (Дубина и др., 2015, 2016; Костылев и др., 2012; Jena et al., 2000; Iftekharuddaula et al., 2011; Yoshimira et al., 1992; Huang et al., 1997).

Например, доктором Jena из Международного института риса (Филиппины) с коллегами проведены масштабные работы по введению и пирамидированию нескольких генов устойчивости к пирикулярриозу риса, самой распространённой и опасной болезни во всех рисосеющих регионах мира (Jena et al., 2000).

Группой японских исследователей выполнены работы по созданию и внедрению в производство устойчивых к сосудистому бактериозу сортов и линий риса (Yoshimira et al., 1992; Huang et al., 1997).

Учеными из Южной Кореи создан ряд линий с генами толерантности к длительному затоплению (Iftekharuddaula et al., 2011). Данный признак может быть использован в России как фактор борьбы с сорными растениями.

Коллегами из Китая, Бангладеш, Северной Кореи проведены работы по созданию коммерческих сортов риса толерантных к низким положительным температурам в период прорастания семян. Ими установлено, что

количественный признак холодостойкости риса на стадии проростков контролируется двумя генами *Cts-1*, *Cts-2* (t); в фазе трубкования – множественными генами. Хотя генетические механизмы холодостойкости риса на этой стадии онтогенеза недостаточно изучены, тем не менее, некоторые из них были удачно идентифицированы с помощью QTL анализа. Например, в работе Saito et. al. показаны два тесно связанных количественных локуса (*Ctb-1* и *Ctb-2*) холодостойкости, ассоциированные с длиной пыльника (Saito et. al., 2004). Проведенный другой исследовательской группой QTL-анализ позволил идентифицировать еще три QTL-локуса (qPSST-3, qPSST-7, and qPSST-9) и их доля в фенотипическом варьировании признака составила 27,4%.

Takeuchi и др. сконструировали карту сцепления с помощью RFLP и RAPD молекулярных маркеров и обнаружили в общей сложности восемь количественных локусов холодостойкости (Takeuchi, Y., et al., 2001).

Группой исследователей из Международного института риса (IRRI, Филиппины) создан обширный спектр сортов и линий риса с генами, отвечающими за полезные хозяйственно-ценные признаки (Collard et al., 2013).

В научных работах N. Lang с коллегами показана возможность использования молекулярных маркеров для идентификации уже на ранних этапах развития растений риса гена *Tms3*, отвечающего за признак термостабильной мужской стерильности (Lang et al., 1999).

Группой японских ученых была разработана ДНК-маркерная система по идентификации генов восстановителей цитоплазматической мужской стерильности риса (Wang et al., 2008; Ichikawa et al., 1997; Shalini et al., 2015).

Корейскими учеными в ряд сортов риса с использованием двух сцепленных RFLP-маркеров был интрогрессирован ген *sd-1*, отвечающих за признак полукарликовости (Kumar et al., 2012).

Главное преимущество использования молекулярных маркеров состоит в том, что они позволяют проводить идентификацию целевого гена в генотипах гибридных растений ещё на стадии проростка, а это очень важно для селекционера, поскольку позволяет получать желаемые генотипы за короткий период времени, в сравнении с классическими методами селекции.

В качестве родительских форм для внедрения приоритетных генов в селекции часто используют дикие виды с ценными признаками либо экзотические сорта. Но одновременно с переносимыми ценными генами наследуются и нежелательные донорные аллели. Для устранения этого процесса применяют методы насыщающих, или возвратных, скрещиваний (беккроссов) гибридной популяции с рекуррентной родительской формой, при этом её доля генома в потомстве после каждого последующего беккросса уменьшается наполовину.

Таблица 1- Доля донорного генома при беккроссировании (Jena et al., 2003)

Поколение	% RP genome recovery
	Con. BC
F ₁	50,0
BC ₁	75.0
BC ₂	87.5
BC ₃	93.7
BC ₄	96.9

Изучив эти данные Openshaw S.J. с коллегами (1994) сделали заключение, что количество беккроссов при MAS может быть сокращено с шести до трёх-четырёх (Openshaw et al., 1994; Temnykh et al., 2000; McCouch et al., 2002).

Группой ученых разработана генетическая карта риса, насыщенная молекулярными маркерами (Young, 1989; Temnykh et al., 2000; McCouch et al., 2002), которая широко используется для определения генотипа разных потомств беккроссов и повышения эффективности возвратных скрещиваний. Это позволяет проводить отбор отдельных растений с ценной генетической основой.

Возможности использования ДНК-маркирования для ускоренного восстановления генотипа рекуррентного родителя в гибридных растениях широко продемонстрировано в исследованиях корейских ученых по введению генов резистентности к *Pyricularia oryzae* Cav. из риса подвида *indica* в генотипы подвида *japonica* (Jeung J.U. et al., 2005). Маркерная система на основе AFLP позволила уже в BC₁F₁ и F₂ поколениях отобрать растения, имеющие максимальную долю генома рекуррентного родителя (до 94,7% и 68,2% в BC₁F₁ и F₂ поколении, соответственно).

Такие работы в практической селекции имеют важное значение, поскольку перенос целевых генов из сортов подвида *indica* в подвид *japonica* методами классической селекции довольно затруднен. Получаемое потомство характеризуется низкой фертильностью и различными нежелательными морфометрическими показателями (Visscher P.M. et al., 1996; Young N.D., 1999). Это связано с тем, что генплазма риса подвида *japonica* обладает узким разнообразием и объединение признаков, например, устойчивость к био- и абиотическим стрессорам, для улучшения сортов ограничены.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод о том, что маркерная технология – это технология, открывающая новые возможности для избирательного переноса определенных генов в определённую генплазму (Jeung J.U. et al., 2005).

Экономическая эффективность использования MAS определяется, прежде всего, снижением материальных и трудовых затрат на многолетние полевые испытания, лабораторные анализы для скрининга фенотипических проявлений хозяйственно-ценных признаков (устойчивость к болезням или качество продукции). Кроме того, её применение значительно сокращает селекционный процесс и позволяет идентифицировать целевой ген раньше, чем признак проявится фенотипически (Костылев и др., 2017).

1.5 Рис: особенности объекта и состояние исследований

Рис - вид рода *Oryza* – это растение семейства злаков (Poaceae), относящееся к крупяным культурам. Появился на нашей планете более 10 тысяч лет назад на территории Юго-Восточной Азии (Индия, Китай, Тайланд). В роде 19 видов.

К культурному виду относится рис посевной (*Oryza sativa* L.), появившийся путём одомашнивания дикого вида *O. perennis* Moench, теперь же известен и ценим по всей планете.

В Западной Африке выращивают рис голый (*O. glaberrima*). Остальные виды дикорастущие и размножаются самосевом. Некоторые из них, например рис точечный (*O. punctata*), рис короткоязычковый (*O. breviligulata*), произрастающий в Африке, имеет большое значение в питании местного населения.

Культурный рис является одной из трёх важнейших продовольственных культур. Выращивается в 116 странах между 49' с.ш. и 35' ю.ш. По данным ООН, в Азии больше 2 миллиардов человек получают 60-70 % калорий из риса или его производных. В глобальном масштабе рис - это 20 % «диетической поставки энергии».

В пределах вида *O. sativa*. принято деление на два подвида: *indica* и *japonica*. Первый возделывают в тропических и субтропических областях Южной и Юго-Восточной Азии, а второй - в умеренных регионах Северной и Южной Америки, Северо-Восточной и Центральной Азии, Центральной и Северной Африки и Европе, Австралии (Костылев, 2004). За всё время возделывания этой культуры было создано огромное количество сортов, адаптированных к различным агроклиматическим условиям. На первом месте по её выращиванию стоит Китай и Индия, около 35 % и 21 % от мирового объема риса, соответственно (Гаркуша, 2015). В России центром рисосеяния является Краснодарский край, где производится более 80 % российского риса (Госпадинова, 2016).

Рис обладает высокими пищевыми достоинствами и имеет огромную народно-хозяйственную ценность как важная мелиорирующая культура на засоленных и заболоченных почвах.

По калорийности рисовая крупа не уступает пшенице. Содержание крахмала в зерне риса составляет около 85%. По качеству белок рисовой крупы приближается к белку животного происхождения и содержит почти все аминокислоты, необходимые человеку (Sasaki T., 2001). Рис широко используют как диетический и лекарственный продукт. В животноводстве на корм идёт зерно и мучка, которые богаты органическими и минеральными веществами. Лузга применяется в производстве строительных материалов как наполнитель для прессованных плит. В косметической промышленности рисовая пудра идёт на изготовление различных тальков, детских присыпок и т.д.

Однако особая роль отведена этому злаку и в современной биологической науке.

В масштабных работах ученых всего рисового сообщества установлено, что данная культура характеризуется небольшим размером

генома и имеет гомологию с геномами других зерновых культур. Японским ученым Кувада в 1910 г. был определен основной набор хромосом у риса (*O. sativa*). Он установил, что гаплоидное число хромосом (n) у риса равно 12, а диплоидное ($2n$)—24 (<http://selekcija.ru/ris-genetika.html>).

На совещание селекционеров Международной комиссии ФАО по рису, проведенное в 1955 г., была назначена рабочая группа, которая должна была провести стандартизацию правил генной символики риса.

В 1963 г. Nagaо с коллегами установили 12 групп сцепления. Однако, группы сцепления у подвидов *japonica* и *indica* имеют некоторые различия (Nagaо et al, 1963). Прежде всего, это различия в генетической структуре их хромосом и их конституции (Ronald et al., 2001). Позднее другой группой ученых была создана традиционная карта сцепления, включающая около 200 генов, локализованных на 12 хромосомах (Kinoshita T., 1995).

В настоящее время у риса описано более 50 тысяч генов, и установлено положение каждого из них на 12 хромосомах. (Дзюба, 2004).

Группой ученых из Корнельского университета США (McCouch и др., 1988) была разработана первая генетическая карта риса с использованием 135 RFLP маркеров.

В рамках Международного Проекта «Сиквенс Генома Риса» (IRGSP), при взаимодействии 15 исследовательских центров из десяти стран (Бразилия, Великобритания, Китай, Корея, Индия, Тайвань, Франция, Таиланд, Япония и США), стартовавшего в 1991 году в Японии, было разработано около десяти молекулярно-генетических карт различного типа.

Каждый исследовательский центр занимался секвенированием определенной хромосомы. Для исследований был взят сорт Nipponbare

(подвид *japonica*). Две коммерческие компании Monsanto и Syngenta также проводили исследования в рамках научно-исследовательских программ по секвенированию генома риса с использованием этого же сорта (Barry et al., 2002).

Аналогичные работы проводились и в Пекинском Институте Геномики на сорте подвида *indica* (Yu et al., 2002).

Созданные молекулярные генетические карты в рамках данной программы позволяли установить гомологию среди других зерновых культур.

Например, рядом зарубежных ученых (Modan et al., 1997; Kurata, 1994; Saghai Maroof et al., 1996) у пшеницы, риса и кукурузы было выявлено гомологичное родство в некоторых регионах их геномов. Это несмотря на то, что геном риса в одиннадцать раз меньше генома кукурузы и в сорок раз меньше генома пшеницы (Foote et al., 1997).

Исследования областей ДНК SH2/AL у риса и сорго также показали высокую степень консерватизма в составе и порядке генов (Martin et al., 2005).

Более полная генетическая карта для риса была создана в 1996 году в рамках Международного проекта «Сиквенс генома риса». Она содержала 2275 ДНК-маркеров (Harushima et al., 1998). На её основе группой зарубежных исследователей была разработана физическая карта (Wang et al., 2009; Kurata et al., 1997; Nga et al., 2009; Chauhan et al., 2002; Chen et al., 2002).

Успешные работы по физическому картированию генома начинался с создания YAC (yeast artificial chromosomes – дрожжевые искусственные хромосомы) и BAC (bacterial artificial chromosomes - бактериальные искусственные хромосомы) библиотек.

Библиотека ВАС содержала 11000 клонов, в каждый из которых входило около 125 Кб ДНК риса (Wang et al., 1995). Наибольшее значение имела разработанная коллекция YAC-клонов, в каждый из которых входило от несколько сотен Кб до 1 Мб встроенной ДНК (Umehara et al., 1995). На её основе был клонирован ген риса *Xa1*, определяющий устойчивость к бактериальному ожогу (Jiang et al., 2006 б).

Совместными усилиям ряда ученых в 1999 году была создана первая физическая карта риса на основе YAC клонов, которая перекрывала около 70% генома (Saji et al., 2001). Несмотря на то, что её физическая длина, соответствующая единице генетической дистанции, составляла от 100 до 300 kb/cM, это значение было приближено с показателем как у *Arabidopsis*, что позволило использовать культуру рис в качестве модельного организма (Ronald et al., 2001).

В 2005 году геном риса был полностью расшифрован. Это даёт возможности для более расширенного проведения различных биологических исследований, в том числе по филогении.

1.6 Гены устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам и механизмы их действия

Устойчивость растений к био- и абиотическим стрессорам, а также патогенность микроорганизмов, как и все другие свойства живых организмов, контролируются генами, одним или несколькими, качественно отличающимися друг от друга. Наличие таких генов обуславливает абсолютный иммунитет к определенным расам или патотипам патогенов и толерантность к неблагоприятным условиям среды (затоплению, холодостойкости, засолению и т.д.).

Одним из компонентов, оказывающим влияние на иммунную систему любого живого организма, являются рецепторы, первые сенсоры на опасность. У растений они представлены мембранными и специфическими цитоплазматическими белками, которые запускают иммунный ответ. Основными показателями ответной реакции являются: изменение уровня ионов кальция, активных форм кислорода, синтез сигнальных гормонов.

1.6.1 Гены устойчивости к фитопатогенам и механизмы их действия

Гены устойчивости к заболеваниям защищают растения от грибной, бактериальной, вирусной и др. инфекций, являясь первым уровнем сложной генетической защитной системы. Растения, несущие доминантный (или кодоминантный) ген устойчивости (R), реагируют на патогены, содержащие соответствующий ген авирулентности (AVR), запуская сигнальный трансдукционный путь, который активирует защитную систему (Bent, 1996).

О взаимоотношениях растений-хозяев и паразитов, выдвинуто много различных гипотез и теорий. В 1955 Х. Т. Флором выдвинута теория о том, что возбудители болезней имеют гены вирулентности, позволяющие патогенам преодолевать защитное действие генов устойчивости растений, т.е. на каждый ген устойчивости растения может выработаться соответствующий ген авирулентности, и была сформулирована как теория «ген-на-ген». (Шкаликов и др., 2005). Гены устойчивости или R-гены (от англ. resistance) чаще доминантны, обуславливают несовместимость растения и паразита, т.е. вызывают защитные реакции у растения и их сравнительно легко передать потомству при селекции. Гены вирулентности или P-гены (от англ. pathogenicity) – рецессивны и определяют сверхчувствительный тип

устойчивости (кодирующий белок паразита полимеризуется с белком растения и устанавливается совместимость).

В 1981 году Ван дер Планком была выдвинута концепция, в которой описываются понятия о больших и малых, майор- и минор- генах, моно-, олиго- и полигенах, генах расоспецифической и расонеспецифической устойчивости (Чекалин, электронный ресурс: https://agromage.com/stat_id.php?id=407).

Гены сверхчувствительности, или R-гены, определяют сверхчувствительный тип устойчивости, которую называют также олигогенной, моногенной, истинной, вертикальной. Она обеспечивает растению абсолютную непоражаемость при воздействии на него рас без комплементарных генов вирулентности. Однако с появлением в популяции вирулентных рас патогена устойчивость теряется.

R-гены у грибов изучены значительно меньше из-за крупного генома и трудностей их генетической трансформации (Diwan et al., 1997). При изучении R-белков установлено, что они состоят из 2 основных компонентов: LRRs (лейцин-богатого домена) и нуклеотид-связывающего домена (NBS). NBS-LRRs цитоплазматические рецепторы могут непосредственно взаимодействовать с эффекторами либо опосредованно через белки, на которые воздействуют эффекторы (Lee et al., 2009) (рис. 4).

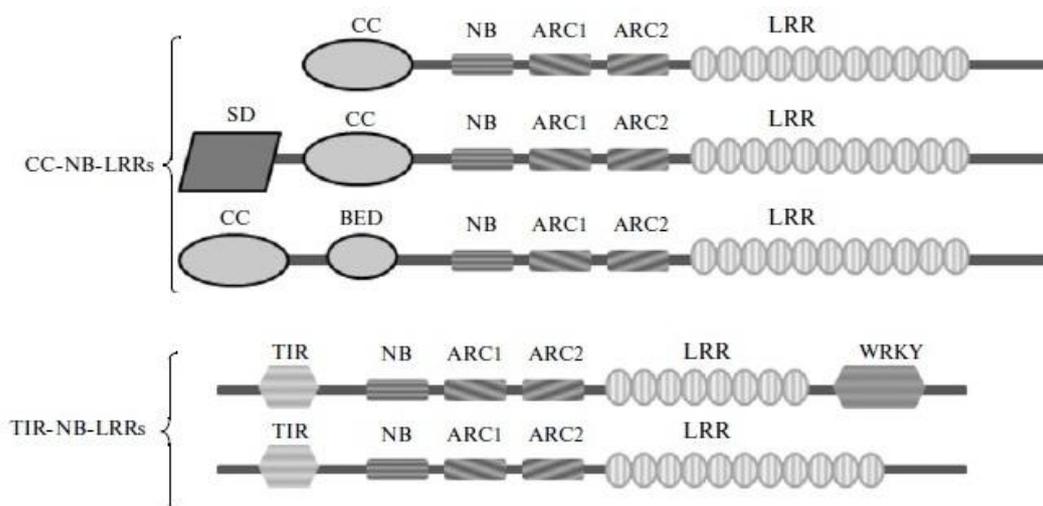


Рисунок 4 - Схематическое изображение R-белков растений (Вахрушева и др., 2011)

NBS участвует в связывании и гидролизе аденозинтрифосфата (АТФ), что приводит к конформационным изменениям в молекуле рецептора и последующей активации сигнального каскада. NBS-домен входит в состав NBS-ARC-домена, который обнаруживается в таких молекулах как Araf-1, CED-4, R-белках (Вахрушева и др., 2011).

Распространенность в растительном царстве белковых структур, в состав которых входят LRR и NBS-домены, указывает на физико-химическую «пригодность» такой структуры для осуществления двух сопряженных процессов: узнавания лиганда и дальнейшей передачи сигнала (Felix et al. 1999).

По отношению к любым патогенам в настоящее время различают целый ряд типов устойчивости.

Ван дер Планк в 1963 г. ввел понятие о двух типах устойчивости к патогенам: вертикальная или расоспецифическая устойчивость, эффективная только против определенных физиологических рас, биотипов; горизонтальная или нерасоспецифическая устойчивость, эффективная против всех генетических вариантов конкретного патогена (Ван дер Планк 1981).

Первый тип устойчивости имеет олигогенный генетический контроль, слабо модифицируется внешними условиями и специфически реагирует на заражение различными штаммами возбудителя заболевания. Второй тип — полигенная или относительная (полевая) устойчивость, зависящая от совокупного действия множества генов. При высоком ее уровне патологический процесс замедляется, что дает возможность растению расти и развиваться, несмотря на пораженность болезнью, но под воздействием условий выращивания (уровень и качество минерального питания, влагообеспеченность, длина дня и ряд других факторов) она может колебаться. Такой тип устойчивости наследуется трансгрессивно и закрепить его путём селекции сортов проблематично.

Отличаются и механизмы устойчивости этих двух типов: в случае перпендикулярной устойчивости мы имеем дело с активными защитными механизмами, в то время как механизмы горизонтальной устойчивости весьма разнообразны (Rohlf, 1988).

Моногенная или расоспецифическая устойчивость означает резистентность к одним расам патогена и поражаемость другими. Она контролируется главными генами или олигенами и обуславливает реакцию сверхчувствительности, которая проявляется в виде некрозов. В месте образования очага поражения наблюдается образование перидермы. Предположительно, что в апоптозе растений участвуют хлоропласты (Ma et. al., 1996).

Нерасоспецифическая или горизонтальная устойчивость обычно даёт восприимчивый тип реакции, и степень устойчивости сорта в этом случае выражается в повышении выносливости (сокращение числа пятен на растении, числа спор в одном пятне и т.д.). Таким образом, наблюдая поведение сортов в поле на инфекционном фоне, можно по проявлению болезни предположить форму их устойчивости. Но этот вывод может рассматриваться лишь как предварительный. К

примеру, если полевая популяция патогена состоит из смеси вирулентных и авирулентных рас (как в случае возбудителя пирикулярриоза риса *P. oryzae*), то первые вызовут образование пятен болезни, а наличие вторых будет выражаться в снижении числа инфекционных пятен и проявлении вертикальной устойчивости, будет сходно с проявлением латеральной (Дьяков и др., 2001).

Со временем сорта, как правило, утрачивают устойчивость либо в результате изменения патогенных свойств возбудителей инфекционных болезней, либо нарушения иммунологических свойств растений в процессе их воспроизводства. Поэтому перед районированием сортов обязательно необходимо проводить их иммунологическое испытания в разных эколого-географических зонах будущего районирования.

1.6.1.1 Гены устойчивости к пирикулярриозу

Для успешной селекции на устойчивость к пирикулярриозу, у селекционера в первую очередь должна быть чёткая информация об эффективных генах резистентности для местной зоны возделывания культуры риса, а также необходимая информация о биоразнообразии самого патогена *P. oryzae* (Dubina et al., 2015).

Идентификация основных генов устойчивости была начата в начале XX века, когда Sasaki открыл физиологические расы *Pyricularia oryzae* Cav., отличающиеся способностью заражать различные сорта риса (Sasaki, 1922, 2001).

Первым изученным геном, придающим устойчивость к пирикулярриозу, был *Pi-a*, определенный Н. Shinoda (Shinoda et al., 1971). В дальнейшем широкое генетическое изучение привело к открытию 25 основных генов устойчивости к пирикулярриозу и подбору стандартных сортов риса для дифференциации этих генов (George et al., 1998). К

настоящему времени известно о 96 генах, контролирующих устойчивость риса к пирикуляриозу. Информация об этих генах доступна в базах данных Oryzabase (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>) и Gramene (<http://www.gramene.org/>).

В ряде сообщений отмечается, что гены, влияющие на устойчивость к пирикуляриозу, расположены совместно на хромосоме 6, 11 и 12 (Kiyosawa, 1989; Kiyosawa et al., 1982; Jena et al., 2003; Vonman et al., 1992).

На 6-й хромосоме не менее 14 генов и/или аллелей (*Pi2*, *Piz*, *Piz-t*, *Piz-5*, *Pi8(t)*, *Pi9*, *Pi13*, *Pi13(t)*, *Pi25(t)*, *Pi26(t)*, *Pi27(t)*, *Pid2*, *Pigm(t)* и *Pi40(t)*) были сопоставлены в районе центромеры. Среди них *Pi2*, *Piz-t* и *Pi9* клонированы и подтверждены в той же геномной области. Они встраиваются в геном кластера, содержащего тандемные повторности NBS-LRR генов (Wu et al., 2005).

На длинном плече хромосомы 11 девять генов (*Pi1*, *Pi7*, *Pi18*, *Pif*, *Pi34*, *Pi38*, *Pi44(t)*, *PBR* и *Pilm2*) и шесть аллелей локуса *Pik* (*Pik*, *Pik-s*, *Pik-p*, *Pik-m*, *Pik-h* и *Pik-g*) были сопоставлены. Hayashi et al. (2006) показали, что три аллеля локуса *Pik*: *Pik*, *Pik-p* и *Pik-m* картированы на одном и том же хромосомном регионе, используя анализ сцепления в расщепляющейся популяции F₂, состоящей из 300-2100 растений (Hayashi et al., 2006).

На хромосоме 12 не менее 17 генов и/или аллелей устойчивости (*Pita*, *Pita-2*, *Pitq6*, *Pi6(t)*, *Pi12(t)*, *Pi12(t)*, *Pi19(t)*, *Pi20(t)*, *Pi21(t)*, *Pi24(t)*, *Pi31(t)*, *Pi32(t)*, *Pi39(t)*, *Pi62(t)*, *Pi157(t)*, *Pi1* и *Pi13*) были сопоставлены в районе центромеры (генный символ *Pi12(t)* используется для различных двух генов) (Hayashi et al., 2006).

Суммируя локализацию генов резистентности риса к пирикулярриозу в геноме, группой исследователей была построена генетическая карта с позициями описанных генов (рис. 10, Koide et al., 2009). Положение генов было основано на высокой плотности генетической карты, построенной по Программе генома риса. Локализация генов в хромосомах представлена на рисунке 5.

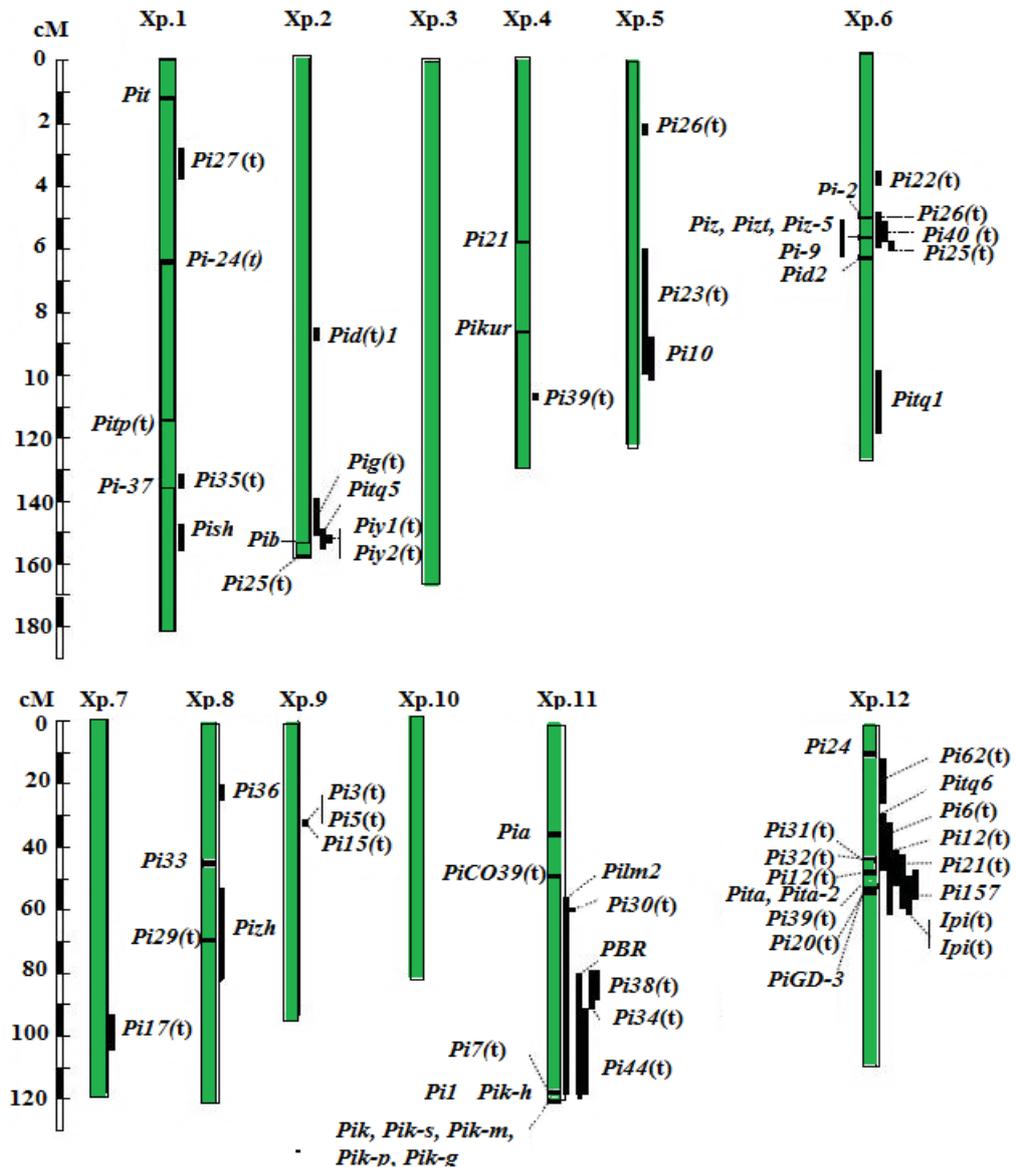


Рисунок 5 - Молекулярно-генетическая карта расположения генов *Pi* на группах сцепления у риса (*O. sativa*) (Koide et al., 2009)

Для идентификации горизонтальной устойчивости к *P.oryzae* зарубежными коллегами было идентифицировано около десяти QTLs

(McCouch et al., 1997; McCouch et al., 1988; McCouch et al., 1994; McCouch et al., 2001).

В таблице 2 представлены гены резистентности к патогену *P.oryzae*, хромосома, в которой они локализованы и сорта, имеющие искомые гены.

Таблица 2 – Некоторые клонированные гены *Pi* у риса

Локус	R гены	Хромосома локализации	Донор	RGA тип
<i>Pit</i>	<i>Pit</i>	1	K59	NBS-LRR
<i>Pi37</i>	<i>Pi37, Pish, Pi35, Pi64</i>	1	Shin2, Bl-1	NBS-LRR
<i>Pib</i>	<i>Pib</i>	2	Bl-1 BL7, IR8	NBS-LRR
<i>Pi21</i>	<i>pi21</i>	4	japonica	Proline rich
<i>Pi2/9</i>	<i>Pi2, Pi9, Piz-t, Pi50 [Piz, Pi40, Pigm]</i>	6	C101A51, WHD-1S-75-1-127, Toride1, IR 83260-1-1-1-5-B, IR 83260-2-10-5-2-1-B	NBS-LRR
<i>Pid3</i>	<i>Pid3, Pi25</i>	6		NBS-LRR
<i>Pid2</i>	<i>Pid2</i>	6	indica	B-lectin
<i>Pi36</i>	<i>Pi36, Pi-33</i>	8	Bala, IR64, C101 LAC	NBS-LRR
<i>Pi5</i>	<i>Pi5, Pii [Pi3, Pi15]</i>	9	Moroberekan, C104PKT	NBS-LRR,
<i>Pia</i>	<i>Pia/Pi-CO39</i>	11	Aichi Asahi	NBS-LRR
<i>Pi63</i>	<i>Pi63</i>	4		NBS-LRR,
<i>AC134922</i>	<i>12 alleles</i>	11		NBS-LRR

Продолжение таблицы 2

Локус	R гены	Хромосома локализации	Донор	RGA тип
<i>Pik</i>	<i>Pik, Pikm, Pikp, Pi1, Pik*</i> , [Pi7]	11	Kanto 51, K60, C101LAC, RIL29	NBS-LRR
<i>Pi54</i>	<i>Pi-k^h (Pi54)</i>	11		Atypical NBS-LRR
<i>Pi1</i>	<i>Pi1</i>	11		Atypical NBS-LRR
<i>Pita</i>	<i>Pita [Pi12, Pita2, Pi19, Pi6, Pi20]</i>	12	IR-36, IR-64, K-1, C105TTP2L9	NBS-LRR

В 1992 году Maskill с коллегами был обнаружен ген *Pi-1* (Ahn et al., 2000). Несколькоми годами позже на основе разработанной RFLP-маркерной системы были проведены работы по локализации данного гена и установлено, что он расположен на концевом участке 11 хромосомы риса. (Mew et al., 1994; Yu et al., 2002; Yu et al., 1996). Было отмечено, что наибольшую устойчивость данный ген проявляет при объединении его в одном генотипе с геном *Pi-2* (Levy et al., 1995; Chen et al., 1996; Chen et al., 2001; Mekwatanakarn et al., 1999), который локализован на шестой хромосоме риса (Mew et al., 1994; Wu et al., 2002).

Группой ученых выполнены масштабные работы по картированию гена *Pi-2* и ими были выявлены информативные ДНК-маркеры, тесно сцепленные с ним, которые рекомендованы практической селекции (Jiang and Wang, 2002). В Международном институте риса (Филиппинах) при тестировании донорной линии C101A51, имеющей в генотипе искомый ген более четырёхсот пятидесятью штаммами патогена она показала высокую устойчивость к заболеванию. Ряд других сортов и линий,

имеющих в генотипе ген *Pi-2*, при фитопатологических тестированиях ещё в 15 рисопроизводящих странах (Chen et al., 1996; Chen et al., 2001) показали устойчивость к 36 из 43 рас *P.oryzae*, полученных для фитопатологических исследований этих сортов и линий риса (Liu et al., 2002).

В проведенных исследованиях группой ученых из Японии в 1994 было установлено, что ген *Pi-2* является аллелью гена *Pi-z* (Inukai et al., 1994). Это было подтверждено зарубежными коллегами и в более поздних исследованиях (Wu, 2005).

Ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-33* расположен на коротком плече восьмой хромосомы риса и был выявлен в нескольких полукарликовых сортах риса подвида *indica*. Проведенные В.Вегуер с коллегами фитопатологические исследования показали эффективность данного гена по резистентности к пирикулярриозу. Из двух тысяч изолятов патогена, собранных в пятидесяти пяти странах учеными было выявлено всего несколько штаммов, показавших вирулентность. (Verguier et al., 2003). Этими же учеными были определены и микросателлитные ДНК-маркеры, фланкирующие ген *Pi-33*.

Во многих научно-исследовательских центрах, занимающихся изучением культуры риса, проведены селекционные программы, в которых объединение генов *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* в одном генотипе использовали для создания длительной резистентности риса к пирикулярриозу (Hittalmani et al., 2000; Kumar et al., 1995; Correa - Victoria et al., 2003). Отбор в селекционном материале проводился с помощью фланкирующих ДНК-маркеров на искомые гены.

Ген *Pi-ta* локализован на 12 хромосоме и относится к семейству NBS-LRR R-генов. Он содержит 928 пар нуклеотидов и кодирует цитоплазматический рецептор распознавания гена вирулентности. Кластер R генов, связанный с центромерой двенадцатой хромосомы, включает аллельные или тесно сцепленные *Pi-ta* и *Pi-ta*² гены, идентифицированные

Kiyosawa с коллегами. Взаимосвязь между этими двумя генами устойчивости, извлеченными из подвида индика, проявляется настолько сложно, что большинство исследователей считают, что для функционирования гена Pi-ta необходим ген Pi-ta² (Bryan et al., 2000). Также в цетромерном регионе двенадцатой хромосомы картированы и другие R гены, включая Pi-4a (t), Pi-4b (t), Pi-6 (t) и Pi-12 (t).

Ген *Pi-b* впервые ген был открыт японскими учеными в 1971 году. Он расположен на дистальном конце длинного плеча хромосомы 2, состоит из 417 пар нуклеотидов и относится к семейству NBS-LRR. Данный ген был определён в сортах риса подвида *indica* (Miyamoto et al., 1996). В отличие от Pi-ta, он не имеет четко выраженного сайта связывания с геном авирулентности и, возможно, служит медиатором для запуска других генов устойчивости (Wang et al., 1999).

Ген *Pi-40* был перенесен в геном культурного риса *Oryza sativa L.* подвида из дикого вида *Oryza australensis* и является геном широкого спектра устойчивости, влияющий на высокую степень резистентности к пирикуляриозу. Он расположен на коротком плече хромосомы 6 и было установлено, что область генома данного гена состоит из девяносто пяти тысяч пар оснований (Jeung et al., 2007). В качестве реципиента при интрогрессии был использован корейский сорт подвида *japonica*. Получена линия IR65482-4-136-2-2, несущая данный ген, которая использовалась при создании гибридной популяции, а также выполнении картирования данного гена (Jeung et al., 2007).

Ballini et al. (2008) сообщали, что 80% всех генов устойчивости к пирикуляриозу локализуется вместе с NBS-LRR кандидатами. Это свидетельствует о том, что неслучайное распределение генов устойчивости отчасти объясняется локализацией NBS-LRR домена, содержащего гены в геноме (Ballini et al., 2008).

1.6.2 Гены толерантности к длительному затоплению и механизмы их действия

В мире большие площади сельхозугодий подвержены наводнениям, что приводит к частичной или полной гибели урожаев сельскохозяйственных культур. Рисосеющие регионы Юго-Восточной Азии, Бангладеш и северо-востока Индии, имеющие такие климатические особенности, как продолжительные ливневые дожди с высоким количеством осадков, подвержены длительному затоплению сельскохозяйственных площадей и полному погружению растений под воду, что является лимитирующим абиотическим стресс-фактором, оказывающим угнетающее действие на рост и развитие растений важных сельскохозяйственных культур, в том числе и риса (Fukao et al., 2011; Jung et al., 2010; Niroula et al., 2012; Mickelbart et al., 2015). Несмотря на то что растения риса хорошо приспособлены к водной среде, они не могут выжить, если полностью погружены под воду длительное время (14 и более дней). Отрицательное воздействие на рост и развитие растений риса в это время оказывают недостаток кислорода и ограниченная диффузия углекислого газа. Недостаток света из-за мутной паводковой воды в рисовом чеке в этот период ограничивает способность растений к фотосинтезу и даже может привести к их гибели. Температура воды также является фактором, влияющим на выживание растений во время затопления. Высокая температура (30 °C) ускоряет анаэробное дыхание, что быстро приводит к кислородному голоданию и гибели растений риса (Septiningsih et al., 2009; Linh et al., 2013).

Преодолеть этот фактор можно путём создания и внедрения в сельскохозяйственное производство сортов риса, устойчивых в фазу прорастания к длительному затоплению (Kostylev et al., 2015).

Saika с соавторами установили, что толерантность к длительному затоплению растений риса является комплексным полигенным признаком и обуславливается одновременным действием нескольких физиолого-биохимических механизмов, затрагивающих различные метаболические процессы растения риса (Mickelbart et al., 2015; Fukao et al., 2008).

Азиатскими учеными был найден генетический локус *Sub1*, который регулирует реакцию растений риса на этилен и гиббереллин. Этилен – это фитогормон, который быстро и интенсивно накапливается в тканях погруженных под воду растений риса и регулирует в них углеводный обмен. Гиббереллиновая кислота (ГК) стимулирует деление и удлинение клеток в междоузлиях, что способствует росту побегов растений риса во время затопления. При взаимодействии с гиббереллиновой кислотой этилен снижает потребление углеводов у растений риса в период их длительного затопления, ограничивает работу гиббереллиновой кислоты, в результате чего формирование придаточных корней и стеблей у растения приостанавливается и наступает состояние покоя (Дубина и др., 2017).

Зарубежными учеными изучена генетика наследования признака толерантности к длительному затоплению. Ими установлено, что генотипы риса *Oryza sativa* L. ssp. *indica* более толерантны к данному абиотическому стресс-фактору, по сравнению с таковыми у подвида *O. sativa* L. ssp. *japonica* (Mickelbart et al., 2015).

К. Xu and D.J. Mackill (1996), используя популяцию, полученную от скрещивания устойчивой к затоплению линии риса IR40931-26 (подвида *indica*) и восприимчивой линии P154385 (подвида *japonica*) в 1996 году картировали основную QTL на 9 хромосоме вблизи её центромеры между RFLP маркерами C1232 и RZ698 и дали ему обозначение *Sub1* (рис. 6).

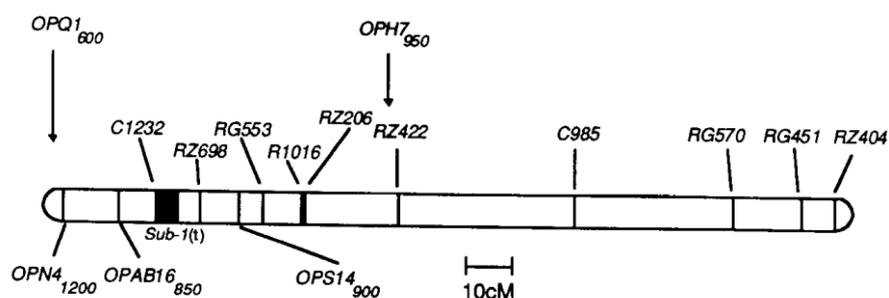


Рисунок 6 - Локализация гена Sub 1 в 9-й хромосоме

Данный локус входит в ERFs-кластер (ethylene response factors), который кодирует реакцию отзывчивости этилена на повышенный и продолжительный уровень воды в период получения всходов.

В 2006 году Ху К. с коллегами картировали данный локус уже на интервале размером в 0,06 морганид используя для составления генетической карты популяцию из 4022 растений, полученную от скрещивания устойчивого сорта FR13A (IR40931-26) подвида *indica* и неустойчивого сорта M.202 подвида *japonica* (Xu et al. 2006).

Позже Ху с соавт., изучая генетические механизмы толерантности к длительному затоплению у риса, с помощью QTL-анализа установили, что количественный признак данного абиотического фактора контролируется тремя генами – *Sub1A*, *Sub1B* и *Sub1C*, – расположенными в локусе *Sub1* на хромосоме 9, вблизи ее центромеры (Xu et al., 2006). Суммарный вклад вышеупомянутых генов в фенотипическое варьирование по данному признаку составляет 70 %. Несмотря на то что все три гена попадают в В-2 подкласс ERFs белков, только ген *Sub1A* усиливает у растений толерантность к затоплению.

В России ген *Sub1A* можно использовать в селекции риса на толерантность растений к затоплению в фазу прорастания. Этот приём может быть эффективным способом борьбы с сорными растениями в рисовых агрофитоценозах без применения химических средств защиты.

В работе М. Zhang с соавторами с использованием 5291 SNP-маркеров, а также анализа профилей экспрессии с устойчивостью к затоплению на стадии прорастания был ассоциирован ген *Har2* (Zhang et al., 2017).

Несколько QTL устойчивости к анаэробному прорастанию было обнаружено на 5 и 11 хромосомах (Jiang et al., 2006). В другой работе на основе гибридной популяции, полученной при скрещивании линии IR64 и донора устойчивости *Khao Hlan On* (Мьянма), были идентифицированы пять перспективных QTL, расположенных на 1 (*qAG-1-2*), 3 (*qAG-3-1*), 7 (*qAG-7-2*), и 9 (*qAG-9-1* и *qAG-9-2*) хромосомах (Septiningsih et al., 2015). При этом, как отмечают авторы, наиболее многообещающим для селекции является QTL, расположенный на длинном плече хромосомы 9 (*qAG-9-2* или *AG1*) и ассоциированный с локальной модуляцией уровня трегалоза-6-фосфата (Т6Р). Еще один локус устойчивости к анаэробному прорастанию был обнаружен на коротком плече хромосомы 7 (*qAG7.1* или *AG2*) при исследовании популяции растений, полученных от скрещивания чувствительной линии IR42 и толерантного китайского сорта *Ma-Zhan Red* (Septiningsih et al., 2013). Однако в данных работах использовались в основном маркеры полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP), что затруднило точное определение положения QTL.

1.6.3 Гены толерантности к низким положительным температурам в период прорастания семян риса и механизмы их действия

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. Перед селекционерами стоит задача создать сорта, устойчивые к пониженным температурам в период образования всходов, не снижающие полевую всхожесть и обладающие повышенной силой роста семян. Установлено, что холодостойкость риса является

комплексным полигенным признаком и обуславливается одновременным действием нескольких физиолого-биохимических механизмов, затрагивающих различные метаболические процессы (Азарин и др., 2017).

Известно, что генотипы риса подвида *japonica* более устойчивы к низкой температуре и обладают повышенной холодостойкостью по сравнению с таковыми подвида *indica*. Количественный признак холодостойкости риса на стадии проростков контролируется двумя генами *Cts-1*, *Cts-2* (t); в фазе трубкования – множественными генами. Хотя генетические механизмы холодостойкости риса на этой стадии онтогенеза недостаточно изучены, тем не менее, некоторые из них были удачно идентифицированы с помощью QTL анализа. Например, в работе Saito et. al. показаны два тесно связанных количественных локуса (*Ctb-1* и *Ctb-2*) холодостойкости, ассоциированные с длиной пыльника (Saito et al., 2004).

Takeuchi и др. сконструировали карту сцепления с помощью RFLP и RAPD молекулярных маркеров и обнаружили в общей сложности восемь количественных локусов холодостойкости (Takeuchi et al., 2001).

Проведенный другой исследовательской группой QTL-анализ позволил идентифицировать еще три QTL-локуса (qPSST-3, qPSST-7, and qPSST-9), суммарный вклад которых в фенотипическое варьирование по данному признаку составило 27,4% (Suh et al., 2010).

1.7 Пирикуляриоз (*Pyricularia oryzae* Cav.): особенности объекта и состояние исследований

Пирикуляриоз, вызываемый несовершенным грибом *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr) из порядка *Hyphomycetales* - одно из самых вредоносных заболеваний риса, распространенных во всех регионах рисосеяния. Патоген впервые был описан в Японии в 1704 году, а заболевание - пирикуляриоз, вызываемое им на культурных растениях – в

1896 году. Возбудитель был идентифицирован в 1891 году итальянским микологом Cavara.

Помимо риса, данный патоген вирулентен для более восьмидесяти видов культурных и дикорастущих растений. В своём развитии гриб проходит вегетативную стадию (*Pyricularia oryzae* Cav.), представленную мицелием и конидиями, и совершенную сумчатую стадию (*Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr), наличие которых привело к использованию двух названий для обозначения этого возбудителя (Тихонова и др., 1983).

По степени вредоносности он занимает первое место. Патоген поражает все надземные органы растения и представляет опасность в течение всего периода вегетации культуры риса (рис. 7).



А

В

С

Рисунок 7 - Формы поражения грибом *P.oryzae* Cav. растений риса.

Примечание: А - узловая форма; В - метельчатая форма; С - листовая форма.

Pyricularia oryzae Cav. приводит к гибели всё растения: на пораженных листьях появляются некротические пятна, которые разрастаясь, образуют овально-удлинённую форму с серовато-бурым центром и темно-коричневым ободком. При увеличении пятна лист засыхает. При поражении грибом стеблей, узлов, веточек метёлок происходит их надламывание, что приводит к нарушению доступа питательных веществ к органам растения, и оно также засыхает. При поражении метёлок инфекция может проникать вглубь

зерновки, в результате чего семена риса становятся щуплыми, частично заполнены меловидным эндоспермом (рис. 8). Токсины, продуцированные грибом, снижают прорастание и всхожесть семян и могут привести к гибели зародыша (Дорофеева Л.Л. и др., 1992).



А

В

Рисунок 8 - Выход крупы риса из заражённых растений пирикуляриозом

Примечание: А - крупа риса, поражённого *P. oryzae* Cav.; В - крупа риса, не поражённого *P. oryzae* Cav.

При наличии благоприятных условий (температуре 26-28 °С и влажности воздуха не менее 90-95%) возбудитель пирикуляриоза может развиваться молниеносно и вызывать массовую гибель растений риса (рис. 9).



Рисунок 9 - Рисовое поле, пораженное пирикуляриозом

Патоген *P.oryzae* размножается бесполом путём с помощью конидий. После того как гриб перезимовал на стерне весной при температуре выше 8 °С развивается мицелий и образуются споры, поэтому плохо запаханная стерня с осени может стать причиной возникновения инфекции. Спороношение начинается при температуре свыше 10 °С, а с повышением температуры интенсивность его увеличивается и прекращается при температуре 32-35 °С (Иванченко Ю.Н., 1971). При увеличении влажности воздуха (90-95 %) возрастает образование спор. Причиной появления болезни может быть и внесение под культуру риса завышенных доз азотных удобрений, но в присутствии двуокси кремния (SiO₂) усвоение азота замедляется, что повышает устойчивость растений к болезни. *P. oryzae*.

За весь вегетационный период растения риса патоген может иметь более десяти генераций (Пересыпкин В.Ф., 1979).

Цикл жизнедеятельности высоковариабельного фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. представлен на рисунке 10.

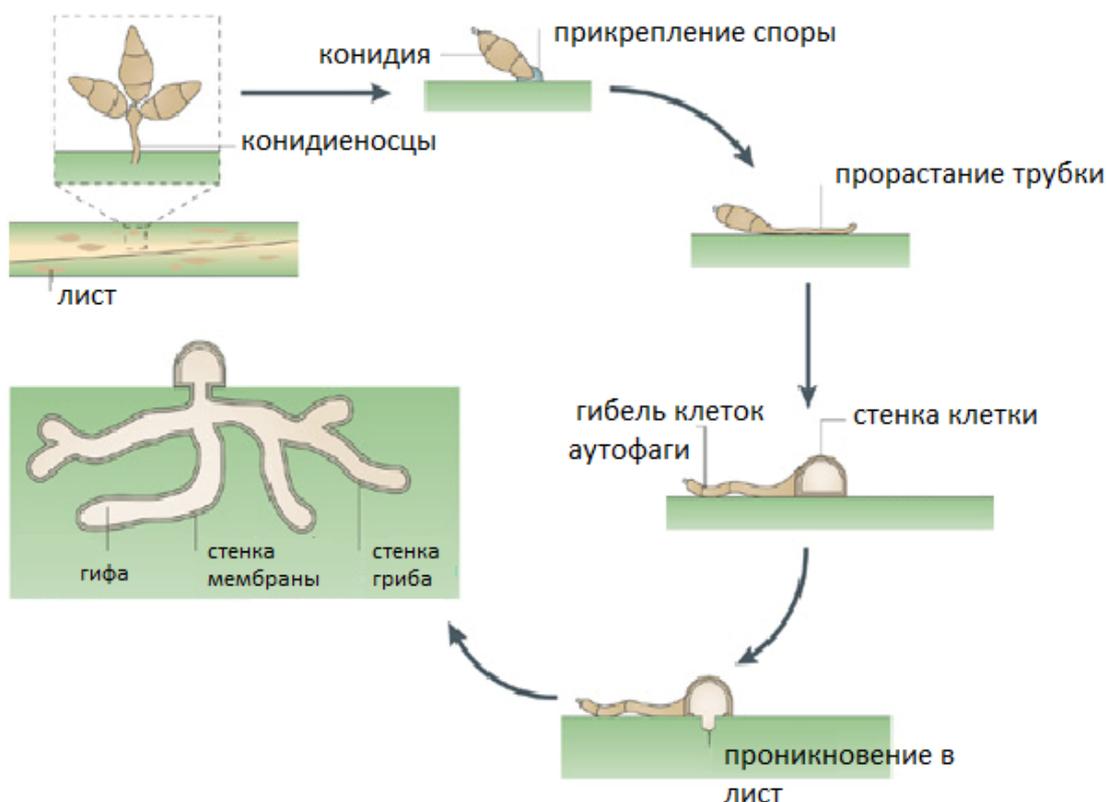


Рисунок 10 - Цикл жизнедеятельности *P. oryzae* Cav. растений риса

Piricularia oryzae Cav. — образует бесцветную многоклеточную грибницу, располагающуюся по межклетникам тканей растений. На грибнице формируется конидиальное спороношение, выходящее через устьица на нижней стороне листа. Один лист может нести на себе до 20000 конидий (бесполое споры). Прорастающие конидии образуют ростовые трубки с аппрессориями, с помощью которых грибок через кутикулу внедряется в эпидермиальные клетки листа риса. После вторжения в клетку патоген формирует инфекционную везикулу (трубку), от которой растут и развиваются толстые первичные гифы. Эти гифы распространяются по тканям хозяина, переходя из клетки в клетку в местах из контактов. При этом грибок локально лизирует клеточную стенку и инвагинирует плазмоллему растения. Каждая клетка, подвергнувшаяся воздействию патогена, остается жизнеспособной не более 24 часов, но массовая гибель клеток хозяина начинается через 6-7- суток после инокуляции.

Контроль распространения пирикулярриоза риса через использование устойчивых сортов довольно сложен из-за высокой изменчивости патогена и благоприятных условий для развития заболевания в агроценозах. Еще пару десятилетий назад фитопатологи для анализа вирулентности и генетической изменчивости возбудителей могли использовать только сорта - дифференциаторы. Появление молекулярно-генетических методов дало возможность получать ДНК «отпечатки» возбудителя пирикулярриоза, что открыло новую страницу в изучении его генетического разнообразия.

Создано несколько генетических карт этого патогена, включая, основанные на различных видах полиморфизма, такие как RAPD, RFLP, REMAP, изозимные, теломерные и т.д (Castiglioni et al., 1998; Kumar et al., 1995; Padmanabhan et al., 1970; Resurreccion et al., 1994). Также создана физическая карта седьмой хромосомы с использованием ВАС клонов, закрепленная на RFLP маркерную карту. Проведено секвенирование всех 7 хромосом *Pyricularia grisea* Sacc (Ahn et al., 2000; Liu et al., 2011).

В 90-х годах прошлого века маркерный анализ *Pyricularia oryzae* Cav. в большинстве случаев основывался на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов и обычно анализировались дискретные клональные линии (Lang et al., 2001; Launder et al., 1987). В 1993 г. Bernardo с соавторами выполнен анализ популяции *Pyricularia oryzae* Cav. При помощи метода RAPD и показана хорошая корреляция между основными группами выделяемыми RAPD и RFLP (Arase et al., 2000; Gard et al., 2008). Позднее были разработаны пары праймеров для амплификации мобильных элементов, присутствующих в геноме *Pyricularia oryzae* Cav. (Yan et al., 2005; Kaye et al., 2003). На следующем этапе анализ штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav., выделенных с пораженных растений риса и элевзины, показал, что изученные популяции возбудителей не имеют общих ДНК «отпечатков». На настоящий момент для изучения возбудителя пирикулярриоза риса создано множество маркеров различного типа (Conaway-Vormans et al., 2003; Fuji et al., 1999; Xia et al. 1993).

Полиморфизм простых, tandemно повторяющихся последовательностей ДНК (SSRs, микросателлитных повторов) обладает рядом преимуществ, но для грибов он не получил пока такого широкого развития как у растений. Это связано с общим отставанием молекулярной биологии и генетики грибов вследствие их сложного и менее изученного аппарата наследственности. Микросателлитные последовательности встречаются по всему эукариотическому геному и обладают несколькими преимуществами перед другими молекулярными маркерами. Они основаны на полимеразной цепной реакции, высоко репродуцибельны, кодоминантны и мультиаллельны (Levy et al., 1993). При сравнение с другими маркерными системами показано, что микросателлитные маркеры давали лучшую генетическую характеристику для *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* и *Fusarium*

circinatum (Khush et al., 2001).

1.8 Использование молекулярно-генетических маркеров для оценки гибридности семян F₁ овощных культур

Успехи селекции реализуются через четко налаженную систему семеноводства.

Для поддержания высокой эффективности линейно-гибридной селекции необходимы мониторинг генетической чистоты и уровня гибридности семян F₁. Для решения этих задач используют традиционный метод грунт-контроля, что требует значительной затраты времени и посевных площадей. Кроме этого, оценка по морфологическим признакам в значительной степени зависит от условий окружающей среды.

В некоторой степени эти задачи решаются при помощи анализа полиморфизма ДНК-маркеров. Общеизвестно, что эти системы маркирования семенного и селекционного материала являются наиболее перспективными. В частности, это микросателлитные повторы ДНК (SSR), расположенные в геноме случайным образом, обладают высоким уровнем полиморфизма, кодоминантны. Применение SSR маркеров даёт возможность повысить уровень идентификации генотипов, оценки типичности и гибридности семян. Особенно это актуально для гетерозисных культур.

Ведущее место среди овощных культур принадлежит капусте белокочанной (*Brassica oleraceae convar. capitata (L.) Alef. var. capitata L. forma alba DC*). Это одна из наиболее распространенных в России овощных культур, занимающая более половины площадей под овощами. В мире под капустой белокочанной заняты более 1 млн. га (данные FAO, 2015 г.). В России капусту выращивают повсеместно на площади около 150 тыс. га; в Краснодарском крае – на площади 5 тыс. га. Широкому распространению

этой культуры способствуют ее высокая урожайность, а также питательная ценность, вкусовые качества и целебные свойства.

Исследования семейства Brassicaceae с использованием молекулярно-генетических маркеров были осуществлены рядом авторов (обзоры: Snowdon, Friedt, 2004) на основе методов RAPD, AFLP (Warwick, Sauder, 2005; Zhao *et al.*, 2005 (Warwick *et al.*, 2005)). Однако при изучении разновидностей *B. oleracea* четких различий по результатам RAPD- и AFLP-анализов не найдено (Allender *et al.*, 2007; Al-Shehbaz с соавт., 2006; Bailey *et al.*, 2006).

Российскими исследователями проведены работы по изучению полиморфизма перца сладкого на основе RAPD PCR с использованием 16 праймеров для проведения побора пар для гибридизации в селекции на гетерозис. Ими было выявлено 136 ампликона, из которых 60 оказались полиморфными. Уровень выявленного полиморфизма составил 44,1 % (Шаптуренко и др., 2013). Однако, перспективно использовать молекулярные маркеры уровень полиморфизма (PIC), которых будет ~ к 1 (Конерев, 1998).

Информации об использовании систем молекулярного маркирования, и эффективных молекулярных маркеров для контроля семенного материала капусты белокочанной и перца сладкого очень мало. Поэтому её накопление, характеризующее как можно большую часть геномов данных овощных культур крайне необходимо.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 Федерального государственного унитарного элитно-семеноводческого предприятия «Красное» Всероссийского научно-исследовательского института риса в 2010 – 2018 гг.

2.1 Исходный материал

В программе по созданию устойчивых к пирикулярриозу сортов и линий риса в качестве доноров доминантных аллелей генов устойчивости нами использованы линии риса C104-LAC, C101-A-51- LAC, C101-LAC, IR 83260-2-10-5-2-1-B (*indica*), которые имеют гены широкого спектра устойчивости *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-1+Pi-33*, *Pi-40*, соответственно (Deng et al., 2006). Именно на этих линиях были определены праймерные пары SSR-локусов, тесно сцепленные с генами резистентности к *P.oryzae* *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* и *Pi-40*.

При изучении данных линий по морфометрическим параметрам они были сходны между собой. Их вегетационный период составлял 140-155 дней, высота растений - 75-80 см и они характеризовались повышенной кустистостью (7-9 побегов). Метёлка у всех донорных линий была поникающей, длиной 16-20 см. Масса 1000 зерен при влажности 14% составляла 19-20 г.

В качестве донора доминантной аллели *Pi-b* гена нами использован сорт BL-1 (*japonica*). Изначально линии и сорта подвида *japonica* с геном

Pi-b получали при скрещивании сортов подвида *japonica* с сортами подвида *indica* – первичными донорами гена. Мамото с коллегами при проведении ДНК - анализа ряда сортов подвида *japonica*, несущих ген *Pi-b* установили, что сорт BL-1 имеет наименьшую долю генома *indica*-типа (Miyamoto et al., 1996). В связи с чем он и был выбран нами в качестве донорной родительской формы.

В условиях юга России сорт-донор BL-1 проявил себя как позднеспелый с периодом вегетации 135-140 дней до выметывания и 165-170 дней до полной спелости высотой растений от востмидесяти пято до девяносто сантиментов и длиной метёлки семнадцать-девятнадцать сантиметров.

Для переноса гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta* использовали сорт риса IR-36 подвида *indica*. Высота растения 75-80 см, длина метёлки 16 – 18 см, период вегетации 140-145 дней.

Ниже указаны российские сорта риса, которые использовались в качестве материнских форм для переноса генов *Pi*:

Флагман. Относится к среднеспелой группе с вегетационным периодом 115 – 120 дней. Ботаническая разновидность *var. italic* Alef. Высота растений 85 – 90 см. Куст компактный, прямостоячий. Метелка компактная, вертикальная, длиной 16 - 18 см, несет в среднем 150 колосков. Масса 1000 зерен - 28-29 г. (Каталог сортов риса и овощебахчевых культур кубанской селекции, Краснодар, 2016 г.).

Снежинка. Подвид *subsp. indica*, ботаническая разновидность *var. gilanica* Gust. Сорт относится к среднепозднеспелой группе с вегетационным периодом при укороченном затоплении 120 – 122 дня. Высота растений 90-95 см, куст компактный, толстый, полый, очень прочный. Метелка длинная 18-19 см, средней плотности, несёт 115 – 125 колосков. Масса 1000 зерен 28-29 г. (Каталог сортов риса селекции ВНИИ риса, Краснодар, 2007).

Боярин. Среднеспелый сорт с периодом вегетации 90-115 дней и высотой растений 95-110 сантиметров. Устойчив к полеганию и осыпанию с массой 1000 зерен 28-32 г. (Костылев и др., 2004).

Все вовлеченные в селекционную программу российские сорта риса характеризуются средней устойчивостью к пирикуляриозу.

В рамках программы по созданию толерантных к длительному затоплению сортов риса донорами для введения гена Sub1 в отечественную генплазму риса стал сорт зарубежной селекции Khan Dan (Вьетнам) с периодом вегетации 156-160 дней. В местной зоне рисосеяния предпочтительно возделывание сортов, созревающих не более чем за 125 дней, поэтому в качестве материнской формы для гибридизации были подобраны скороспелые сорта и линии риса с периодом вегетации не более 100-105 дней: сорт риса Новатор, крупнозерная скороспелая линия ВНИИР9678 и КП-25-14.

Новатор. Ботаническая разновидность – италика. Сорт относится к раннеспелой группе с вегетационным периодом 100 - 105 дней. Стебель средней длины. Метёлка компактная, средней длины; изогнутость главной оси отсутствует или очень слабая, длиной 16 – 18 см и имеет 120-135 колосков с масса 1000 зерен 28 - 31 г. Отличительным признаком сорта является компактный прямостоячий куст с количеством стеблестоя 2 – 3 штуки. Крупнозерная скороспелая линия ВНИИР9678 и КП-25-14 имеют сходные морфометрические показатели с сортом Флагман (Каталог сортов риса и овощебахчевых культур кубанской селекции, Краснодар, 2016 г.).

В программе по созданию холодоустойчивых сортов риса использованы сорта – доноры из Южной Кореи Odaebueo, Jinbubueo, сортообразец IR 83222 – F-11-156 (ИРРИ, Филиппины), которые в условиях юга России характеризуются как очень позднеспелые с периодом вегетации более 150 дней, а также отечественные сорта риса Кубань 3 и Северный.

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

2.2 Выделение геномной ДНК

В настоящее время известно значительное количество методов выделения геномной ДНК из клеток растений. Наиболее широко используют метод выделения с применением цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) (Doyle et al., 1987) и различные его модификации, позволяющие наиболее эффективно выделять ДНК из растительных клеток, в т.ч. с высоким содержанием фенолов или полисахаридов (Stewart et al., 1993; Porebski et al., 1997).

2.2.1 Выделение ДНК из растительного материала риса и овощных культур

Для выделения ДНК из анализируемых образцов риса и овощных культур использовали зеленые листики растений 14-дневных проростков, которые получали на увлажненной фильтровальной бумаге в термостате, при температуре 25 - 27 °С (Скаженник и др., 2009).

Экстракцию ДНК проводили по методу Murray and Thompson, используя в качестве основного лизирующей буфер цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ; Murray and Thompson, 1980) по следующей схеме:

Навески свежей растительной ткани (листик) весом 2 г отбирали в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл и растирали. Затем в пластиковые микропробирки вносили 500 мкл прогретого до 60°C 2×СТАВ

буфера, содержащего 2% СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4М хлористый натрий, 0,1М Трис-гидрохлорид, 20мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). Смесь инкубировали при 65°C в течение 1,5 часов, тщательно перемешивая каждые 30 минут. После к гомогенату вносили равный объем хлороформа и перемешивали в течение 20 минут. Далее пробирки с анализируемым материалом центрифугировали 10 минут при 8000 об/мин. К отобранной в чистую пробирку верхней фракции раствора добавляли 0,2 объема 5×СТАВ буфера, содержащего 5% СТАВ и 350мМ ЭДТА, и экстрагировали 10 минут при 60°C. После супернатанту давали остыть до комнатной температуры и затем в пробирки с образцами вносили равный объем хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), медленно перемешивали в течение 20 минут и затем центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. После центрифугирования супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли равный объем буфера для преципитации (1% СТАВ, 50мМ Трис-НСI, 10мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Центрифугировали при 5000 об/мин и образовавшийся осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1М NaCl, 10мМ Трис-НСI, 1мМ ЭДТА), добавляли 1 мл изопропилового спирта и выдерживали 2-3 часа при -20°C. При добавлении изопропилового спирта ДНК выпадала в осадок. По истечении этого времени образцы центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин, образовавшийся осадок промывали 70% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 100 мкл 0,1×TE буфера (рис. 11). При ограниченном количестве растительного материала использовали меньшие навески сырого материала, пропорционально уменьшая объемы реактивов для выделения и очистки ДНК.

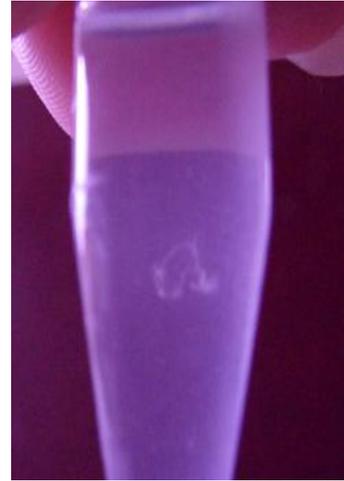
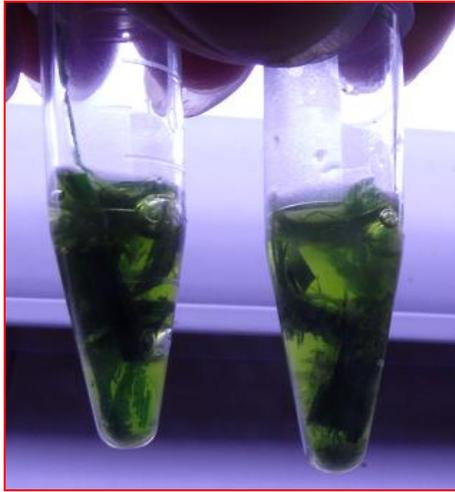


Рисунок 11 - Экстракция и выделение ДНК

Наличие выделенной ДНК в пробирке определяли методом электрофореза в двухпроцентном агарозном геле с добавлением 1мкг/мл бромистого этидия и 10 нг ДНК (Маниатис и др., 1984).

2.2.2 Выделение геномной ДНК из мицелия гриба *Pyricularia oryzae Cav.*

Для исследований генетического разнообразия возбудителя пирикулярриоза молекулярно-генетическими методами грибную ДНК выделяли из смеси мицелия и конидий моноконидиальной культуры гриба *Pyricularia oryzae Cav.* методом СТАВ (Murray and Thompson, 1980). Метод заключается в использовании гексадецилтриметиламмония бромида в качестве детергента в лизирующем буфере.

Состав лизирующего СТАВ буфера: 0,2 М Tris pH 8; 2 М NaCl; 0,05 М EDTA; 2 % СТАВ.

Наращивание мицелия для выделения ДНК проводили в чашках Петри на жидкой морковной агаризированной среде. При достижении необходимой биомассы мицелий снимали с чашек, растирали его в 700 мкл лизирующего СТАВ-буфера в стерильной керамической ступке (рис.12).

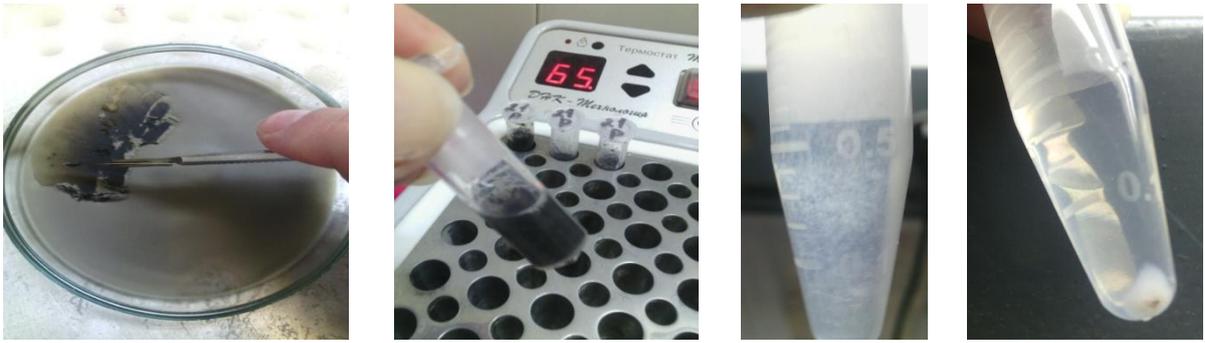


Рисунок 12 - Выделение грибной ДНК

Затем полученную смесь переносили в пробирку Eppendorf и инкубировали при 65°C в течение часа. К полученной смеси добавляли 500 мкл хлороформа и центрифугировали 10 мин. при 13 000 об./мин. После с помощью пипетмана на 1000 мкл отбирали 500 мкл надосадочной жидкости, добавляли к ней ещё 500 мкл хлороформа и повторяли центрифугирование. К полученному супернатанту добавляли 400 мкл изопропанола и ставили в морозильную камеру на 2 часа. После центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин. Выпавший осадок ДНК промывали охлаждённым 70 %-ным этанолом и ресуспендировали в 50 мкл буфера TE для хранения при температуре -20°C.

2.3 Условия проведения полимеразной цепной реакции

ПЦР в программах по созданию устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды сортов и линий риса проводили с 40-50 нг ДНК в конечном объеме 25 мкл. Использовали следующий состав реакционной смеси: 0,3 μM прямого и обратного праймеров, 0,1 μM dNTPs (трифосфатов), 25mM KCL, 60 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,1% Тритон X-100б 10 mM 2-меркаптоэтанол, 1,5 mM MgCl_2 , 1 единица Taq-полимеразы. В пробирки поверх реакционной смеси вносили по 2 капли вазелинового масла во избежание её испарения.

Аmplification проводили в ДНК-амплификаторе Терцик, производства НПО «ДНК-Технология», Россия, оптимизировав при этом

условия ПЦР: начальная денатурация – 5 минут при 94 °С – 1 цикл. Следующие 35 циклов: денатурация – 35 сек при 94 °С; отжиг праймеров – 45 сек при 60 °С; синтез – 30 сек при 72 °С. Синтез – 5 мин при 72 °С – 1 цикл.

Температуру отжига для каждой праймерной пары рассчитали по формуле: $T_a = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) - 3$, где G, C, A, T - количество пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований, соответствующих их сиквенсу, взятому из базы данных NCBI (Dieffenbach et al., 1995). После апробации рассчитанной температуры отжига проводили по необходимости её оптимизацию до достижения идеальных условий, при которых наблюдался высокий выход ампликонов. Для всех SSR-маркеров, используемых в программах по маркерной селекции, отжиг праймеров осуществляли при температуре 60°C.

В программах по оценке генетической чистоты коммерческих партий семян гибридов F₁ капусты белокочанной и перца сладкого ПЦР проводили с 40-50 нг ДНК, следующего состава: 0,1 μM dNTPs (трифосфатов), 25mM KCl, 60 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,1% Тритон X-100б, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 1,5 mM MgCl₂, 1 единица Taq-полимеразы и 0,3 μM праймеров в конечном объеме 25 мкл.

Аmplification осуществляли в ДНК-амплификаторе «BioRad», производства Германия, при следующих условиях:

Программа ПЦР содержала 45 циклов: первичную денатурацию проводили 15 минут при 95°C – 1 цикл; денатурацию при 94 °С продолжительностью 2 минуты – 1 цикл; следующие 25 циклов: 2 мин денатурация при 94 °С, 1 мин денатурация при 94 °С, 30 секунд отжиг праймеров при 65 °С, 45 секунд синтез при 72 °С; затем каждый второй цикл температуру отжига понижали на 1 °С до достижения температуры 55 °С и остальные 20 циклов: 1 мин денатурация при 94 °С, 30 секунд отжиг

праймеров при 55 °С, 45 секунд синтез при 72 °С, завершающий цикл синтеза 1 минута при 72 °С.

Аmplификацию ДНК фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae Cav.* проводили в объеме 25 мкл, содержащем 1-х ПЦР-буфер, 1,25 ед. *Taq* ДНК-полимеразы, 100 мкмоль dNTP (ООО НПО ДНК-Технология, Россия), по 10 пкмоль каждого праймера, и по 5 мкл раствора ДНК в детектирующем термоциклере (CFX-BioRad, США) по программе: 95°С – 10 мин, (94°С – 30 с, 55°С – 30 с, 72°С – 30 с) 30 циклов. Фрагментный анализ проводился на автоматическом генетическом анализаторе «НАНОФОР-05» (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) при поддержке центра коллективного пользования «Биотехнология» ВНИИСБ в рамках гранта РФФИ 16-44-230178.

2.4 Электрофорез продуктов амплификации

Разделение продуктов амплификации с микросателлитными праймерами проводили путем электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) на основе 1×Трис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М Борной кислоты, 2мМ ЭДТА, рН=8,2) в камере для вертикального электрофореза (Helicon). Данный метод позволил разделить фрагменты, отличающиеся на 1 пару нуклеотидов (Поморцев и др., 2004).

Полимеризацию геля проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве катализаторов полимеризации использовали 40 мкл ТЕМЕДа (100% раствор) и 350 мкл аммония персульфата 10%-ного на 40 мл раствора геля.

После окончания полимеризации лунки геля промывали электродным однократным Трис-боратным буфером и проводили предварительный электрофорез без внесенных образцов, для удаления из геля остатков катализаторов и незаполимеризовавшегося акриламида при напряжении 150 Вольт в течение 1 часа. После чего вносили в лунки геля

по 15 мкл продуктов амплификации, предварительно смешав их с буфером нанесения (40% $C_{12}H_{22}O_{11}$, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% ксилен цианол), при этом соблюдали соотношение: продукты ПЦР/буфер нанесения = 5/1.

Полиморфизм контрастных аллелей визуализировали после трех часов электрофореза. В качестве буферной системы использовали 1xTBE. Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 3,9 - 4,5 В/см.

Визуализацию результатов электрофоретического разделения продуктов ПЦР проводили с использованием бромистого этидия (BrEt). После электрофореза гели проявляли в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора, используя метод окрашивания в растворе бромистого этидия (BrEt, 2,7-диамино-10-этил-9-фенилфенатридинийбромид, хомидий бромид), который способен интеркалировать в двойную спираль ДНК и при таком связывании усиливается флюоресценция в проходящем УФ свете и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы: 100 bp+1,5 Kb +3Kb (СибЭнзим) (0,05 г/л).

Для визуализации продуктов ПЦР нами был использован электрофорез в двухпроцентном агарозном геле с добавлением BrEt. Образцы, смешанные с буфером нанесения, загружали по 10 мкл в лунки геля под слой электродного буфера (использовали 0,5xТрис-боратный буфер). Электрофорез проводили при напряжении сто двадцать вольт в течение получаса. Визуализировали продукты в ультрафиолетовом свете и фотографировали цифровой камерой.

2.5 Гибридизация растений

Гибридизацию материнских форм растений риса проводили методом пневмокастрации с последующим опылением донорными образцами, имеющими в гентипе целевые гены, на основе «ТВЕЛЛ» - метода (Лось Г.Д., 1987).

Пневмокастрация включает в себя обрезание цветковых чешуй на $1/3$ с последующим удалением пыльников с помощью вакуумной установки (компрессора). Такой способ кастрации позволяет минимально повреждать рыльца цветков риса (рис. 13 А, В).

После удаление пыльников основание метёлки обворачивали ватой, смоченной дистиллированной водой, и помещали во влажный изолятор с целью избежания быстрого высыхания цветковых чешуй и рылец пестика. Метёлки опыляли через три-четыре часа после кастрации.



А

В

С

Рисунок 13 - Гибридизация растений риса

Примечание: А, В - кастрация материнских форм путем удаления пыльников; С - опыление материнских форм «ТВЕЛЛ»-методом.

Опыление проводили «ТВЕЛЛ»-методом (рис. 13 С; Лось Г.Д., 1987), суть которого состоит в том, что верхнюю часть изолятора срезают и вводят в него одну - две метёлки отцовской формы, интенсивно вращая. После опыления верхнюю часть изолятора закрывают.

2.6 Молекулярные маркеры, используемые в работе

Микросателлиты, выявляющие полиморфизм ДНК, используются в настоящее время в различных областях биологии, в том числе в изучении и сохранении генетического разнообразия, идентификации индивидуумов, филогенетике, картировании полезных признаков качества и устойчивости к стрессовым факторам, в селекционном процессе, биотехнологии и др. Они высоковариабельны, кодоминантны, практичны, эффективны, имеют высокую воспроизводимость анализа и недорогие по стоимости (Омашева и др., 2013).

2.6.1 SSR-маркеры в селекции риса на устойчивость к пирикуляриозу.

Донорные аллели генов *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40* визуализировали тесно сцепленными с ними фланкирующими микросателлитными маркерами: для гена *Pi-1* использовали SSR-маркеры RM224 и RM144; для гена *Pi-2* использовали RM527 и SSR140; для гена *Pi-33* - RM72, RM310; для гена *Pi-40* – RM527 и RM3330 (сиквенс праймерных пар взят из базы данных генетических ресурсов NCBI, доступной на web-странице <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (табл. 3; Senior M., et al., 1996).

Для идентификации в гибридных растениях генов *Pi-ta*, *Pi-b* использовали внутригенные молекулярные маркеры, созданные в лаборатории биотехнологии ФГБНУ «ВНИИ риса» и в лаборатории анализа генома ФГБНУ «ВНИИСБ (Мягких, 2009; Шилов, 2016; табл. 3).

Таблица 3 - Нуклеотидная последовательность праймерных пар маркеров, используемых для идентификации генов устойчивости к пирикулярриозу риса

Название маркера	Ген	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	
Rm 224	Pi-1	F	ATC GAT CGA TCT TCA CGA GG
		R	TGC TAT AAA AGG CAT TCG GG
Rm 527	Pi-2	F	GGC TCG ATC TAG AAA ATC CG
		R	TTG CAC AGG TTG CGA TAG AG
SSR140	Pi-2	F	AAG GTG TGA AAC AAG CTA GCA A
		R	TTC TAG GGG AGG GGT GTA GAA
RM310	Pi-33	F	CCG GCG ATA AAA CAA TGA G
		R	GCA TCG GTC CTA ACT AAG GG
RM 72	Pi-33	F	CCG GCG ATA AAA CAA TGA G
		R	GCA TCG GTC CTA ACT AAG GG
RM3330	Pi-40	F	CAACAAACGGGTCGACAAAGG
		R	CCCCCAGGTCGTGATACCTTC
Pi-b	Pi-b	F4	CAT CAA CGA AGT CCA GCT CA
		R5	CCG CGC TAT CTT GTA CAT TC
		R6	CTC AGC ATA TGT GGC AGC TC
Pi-ta	Pi-ta	F1	GCC GTG GCT TCT ATC TTTA CAT G
		R1	ATC CAA GTG TTA GGG CCA ACA TTC
		F2	TTG ACA CTC TCA AAG GAC TGG GAT
		R2	TCA AGT CAG GTT GAA GAT GCA TCG A

Праймерные последовательности, использованные в работе, синтезированы фирмой ЗАО «Синтол», Россия.

На рисунке 14 представлена генетическая карта области локализации гена широкого спектра устойчивости *Pi-1* и расстояние SSR-маркера до гена (постер Fuentes et al.).



Рисунок 14 - Генетическая карта области локализации гена широкого спектра устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-1* и дистанция SSR-маркеров до гена (постер Fuentes et al.)

На рисунке стрелкой отмечена локализация гена. SSR-маркеры RM1233*I, RM5926, RM224 является косегрегирующими (сонаследуемыми) с данным геном, что делает их наиболее ценным для использования в маркерной селекции.

На рисунке 15 показана область локализации гена *Pi-40* и дистанция SSR-маркеров до гена.

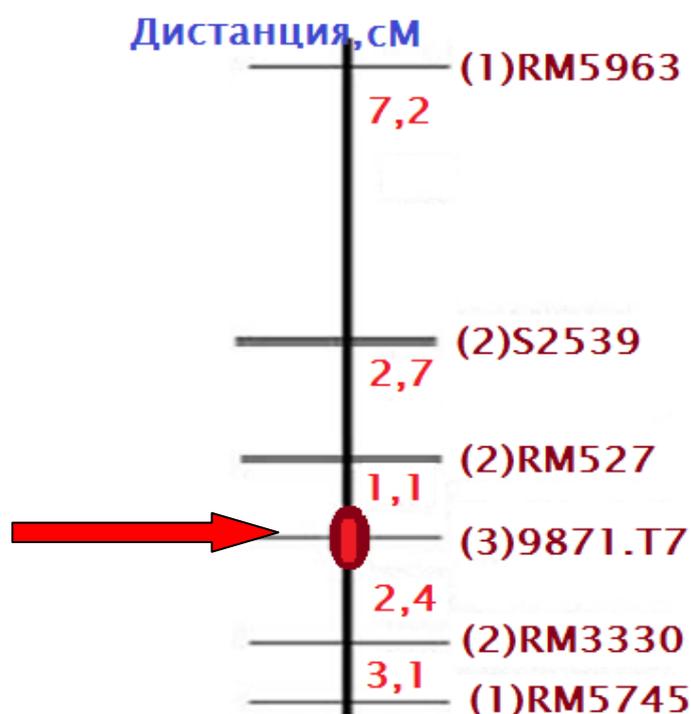


Рисунок 15 - Генетическая карта области локализации гена широкого спектра устойчивости риса к пирикуляриозу *Pi-40*. (Jeung et al., 2007)

На рисунке стрелкой отмечена локализация гена. SSR –маркеры RM527 и RM 3330, расположенных на дистанции 1,1 и 2,4 сантиморганид, соответственно, являются фланкирующими и кодоминантными. Они могут использоваться при идентификации в гибридных растениях гомо- и гетерозиготного состояния локуса данного гена. ДНК-маркер 9871.T7 является косегрегирующим (сонаследуемым) с данным геном, что делает его наиболее ценным для использования в маркерной селекции.

2.6.2 SSR –маркеры в селекции риса на толерантность к длительному затоплению

В Международном институте риса (IRRI, Филиппины) работы по созданию сортов, толерантных к длительному затоплению, проводились несколько десятилетий (Hille Ris Lambers 1982). Недавно филиппинскими коллегами было выполнено объединение разных генов устойчивости к

длительному затоплению, включая Sub1. На генетической основе низкорослого сорта риса Swarna был создан первый «мегасорт» с локусом Sub1 – Swarna-Sub1.

На основе сиквенса Sub1 были разработаны специфические молекулярные маркеры, что значительно облегчило систему маркер-опосредованного беккросирования (МАВС), которая успешно внедрена в селекционный процесс по созданию и возделыванию "мегасортов" в Азии, а также Африке (Mackill et al. 1993, Septiningsih et al. 2009). Благодаря МАВС была сохранена высокая продуктивность, а также потребительские и пищевые качества этих «мегасортов», что стимулирует их спрос у производителей (Septiningsih et al. 2009). К 2011 году было создано уже восемь таких сортов.

Зарубежными учеными сконструирована карта сцепления с помощью RFLP и AFLP молекулярных маркеров для выявления количественных локусов толерантности к затоплению (Xu et al., 2000). Позднее Chakravarthi и Naravaneni при помощи ПЦР выявили SSR-маркеры, тесно сцепленные с вышеуказанными локусами и равномерно распределённые по всем 12 хромосомам *Oryzae sativa L.* (Chakravarthi et al., 2006; рис. 16).

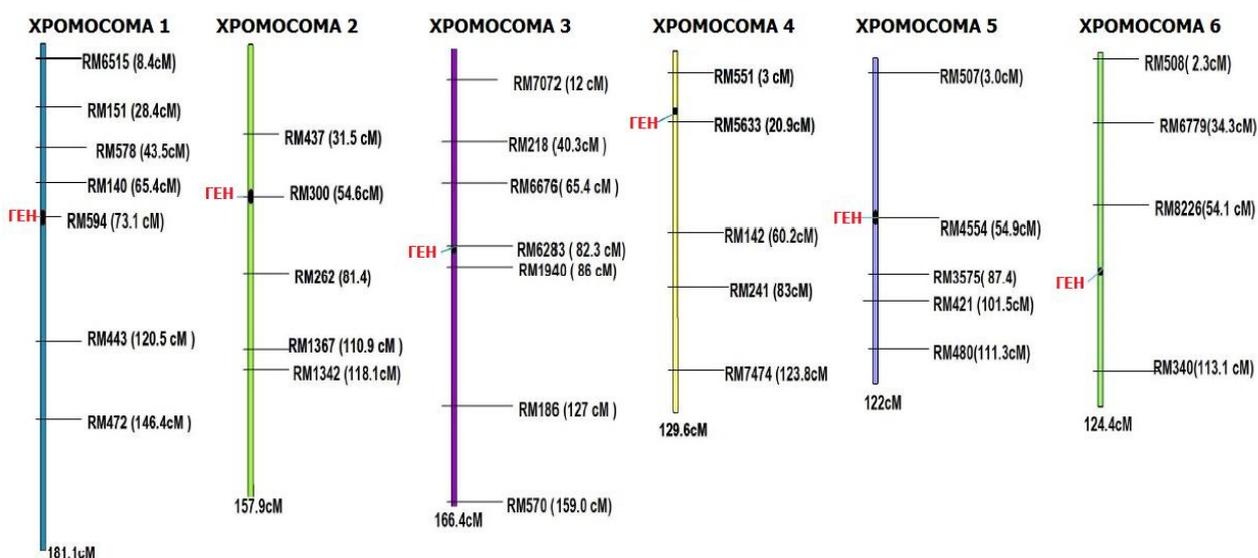


Рисунок 16 - SSR-маркеры, распределенные по 12 хромосомам *Oryzae sativa L.* и используемые для идентификации генов толерантности к длительному затоплению у риса (Дубина, 2017 б; Chakravarthi et al., 2006)

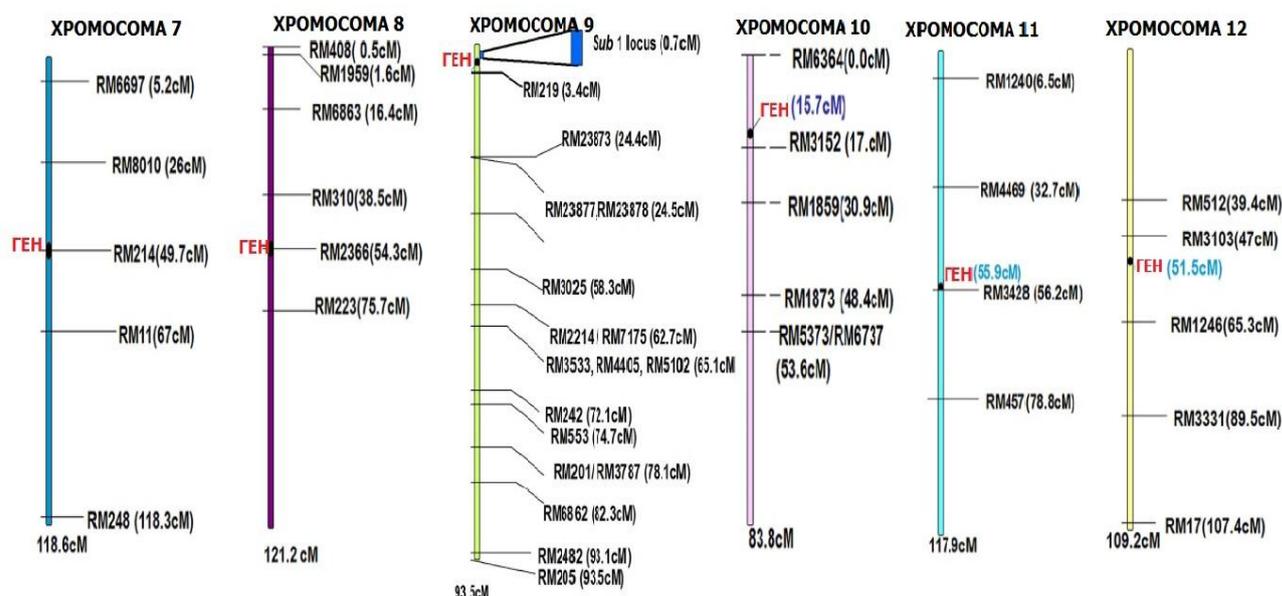


Рисунок 16 - SSR-маркеры, распределенные по 12 хромосомам *Oryza sativa L.* и используемые для идентификации генов толерантности к длительному затоплению у риса (Дубина, 2017 б; Chakravarthi et al., 2006)

Регион Sub1 ограничен маркерами CR25K и SSR1A и охватывает более 182 тысяч пар оснований. Этот интервал кодирует три гена факторов этиленового ответа, обозначенных *Sub1A*, *Sub1B* и *Sub1C*, но только ген *Sub1A* усиливает у растений толерантность к затоплению (Mackill et al. 2012).

Для идентификации гена *Sub1A* использовали известные из литературных источников праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров (табл. 4). Их сиквенс взят из базы данных генетических ресурсов NCBI.

Таблица 4 - Нуклеотидная последовательность праймеров для идентификации гена *Sub1*

Название маркера	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	
Sub1Aq	F	GAT GT GT GGAGGAGAAGT GA
	R	GGTAGAT GCCGAGAAGT GTA
Sub1C173	F	GAT GT GT GGAGGAGAAGT GA
	R	GGTAGAT GCCGAGAAGT GTA
Sub1B	F	GAT GT GT GGAGGAGAAGT GA
	R	GGTAGAT GCCGAGAAGT GTA

Продолжение таблицы 4

Название маркера	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	
Sub1A203	F	GAT GT GT GGAGGAGAAGT GA
	R	GGTAGAT GCCGAGAAGT GTA
Sub1A_6	F	GAT GT GT GGAGGAGAAGT GA
	R	GGTAGAT GCCGAGAAGT GTA
Sub1A_7	F	GAT GT GT GGAGGAGAAGT GA
	R	GGTAGAT GCCGAGAAGT GTA
RM219	F	CGTCGGATGATGTAAAGCCT
	R	CATATCGGCATTCGCCTG

Микросателлитные повторы, тесно сцепленные с геном *Sub1*, были определены на генетическом материале донорной линии Khan Dan (Вьетнам).

2.6.3 SSR-маркеры на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания семян риса

Известно, что генотипы риса подвида *japonica* более устойчивы к низкой температуре и обладают повышенной холодостойкостью по сравнению с таковыми подвида *indica*. Хотя генетические механизмы холодостойкости риса недостаточно изучены, тем не менее некоторые из них были удачно идентифицированы с помощью QTL анализа. Например, в работе Saito et. al. показаны два тесно связанных количественных локуса (*Ctb-1* и *Ctb-2*) холодостойкости, ассоциированные с длиной пыльника (Saito et al., 2004).

Takeuchi и др. сконструировали карту сцепления с помощью RFLP и RAPD молекулярных маркеров и обнаружили в общей сложности восемь количественных локусов холодостойкости (Takeuchi et al., 2001).

На рисунке 17 представлена карта использованных SSR-маркеров, распределенных по 3, 7 и 9 хромосомам *Oryzae sativa L.* (рис. 17; Suh et al., 2009).

В таблице 5 представлена нуклеотидная последовательность некоторых SSR, взятых из базы данных генетических ресурсов NCBI, доступной на web-странице <http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi>).

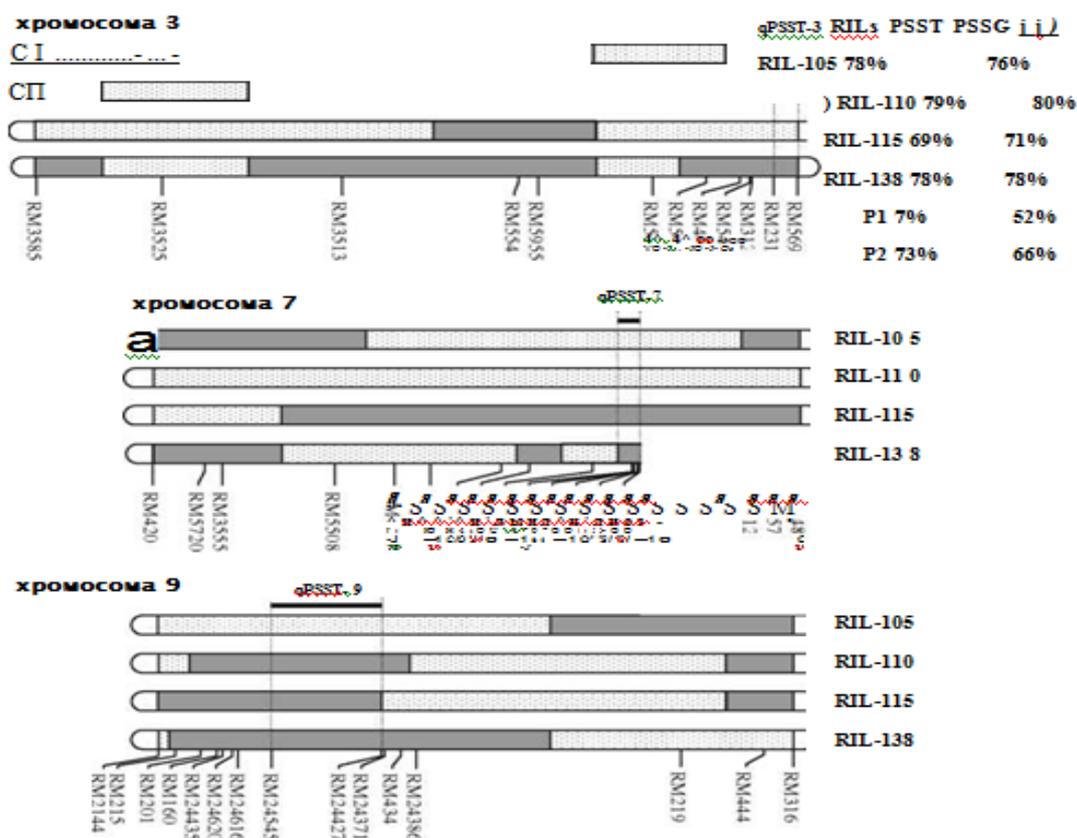


Рисунок 17 - SSR для толератных к положительным низким температурам генотипов отдельных RILs на хромосомах 3, 7 и 9, связанных с Psst и PSSG (Suh et al., 2009)

Таблица 5 - Олигонуклеотидные последовательности использованных праймерных пар на холодоустойчивость

Название маркера	Нуклеотидная последовательность (5' -> 3')
RM24545	F: 5'-ACAGCACAGCACCCGGAAGG-3'
	R: 5'-CGAGCAACAGGAAGGCGATAAGC-3'
RM1377	F: 5'-ATTAGATACATCAGCGGGGG-3'
	R: 5'-GCTGCTGTACGATGTGATCC

Продолжение таблицы 5

Название маркера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')
RM 569	F: 5' GACATTCTCGCTTGCTCCTC
	R: 5'- TGTCCCCTCTAAAACCCTCC
RM 231	F: 5'- CCAGATTATTTCTGAGGTC
	R: 5'- CACTTGCATAGTTCTGCATTG

Установлено, что эти маркеры тесно сцеплены с данным признаком (Takeuchi et al., 2001).

2.6.4 SSR-маркеры, используемые при изучении биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav.

На настоящий момент для изучения возбудителя пирикуляриоза риса создано множество маркеров различного типа.

Микросателлитные последовательности встречаются по всему эукариотическому геному и обладают несколькими преимуществами перед другими молекулярными маркерами. Они высоко репродуцибельны, кодоминантны и мультиаллельны (Levy et al., 1993). Сравнение с другими маркерными системами показало, что микросателлитные маркеры давали лучшую генетическую характеристику для *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* и *Fusarium circinatum* (Khush et al., 2001). Идентифицированы и охарактеризованы SSR содержащие локусы в геноме аскомицета *M. grisea* (Herbert) Barr, возбудителя пирикуляриоза риса (Li et al., 2007). Из множества возможных вариантов микросателлитного полиморфизма исследователи предлагают для работы 41 маркер. Было показано, что эти маркеры способны выявлять полиморфизм среди шести изученных во Франции изолятов (Ahn et al., 2000), а также девяти изолятов, изученных в Китае (Kaye et al., 2003).

Определена позиция на генетической карте для всех 41 микросателлитного локуса, равномерно распределённых по всем семи хромосомам *Pyricularia grisea* Sacc, что отражено на рисунке 18 (Zheng et al., 2008).

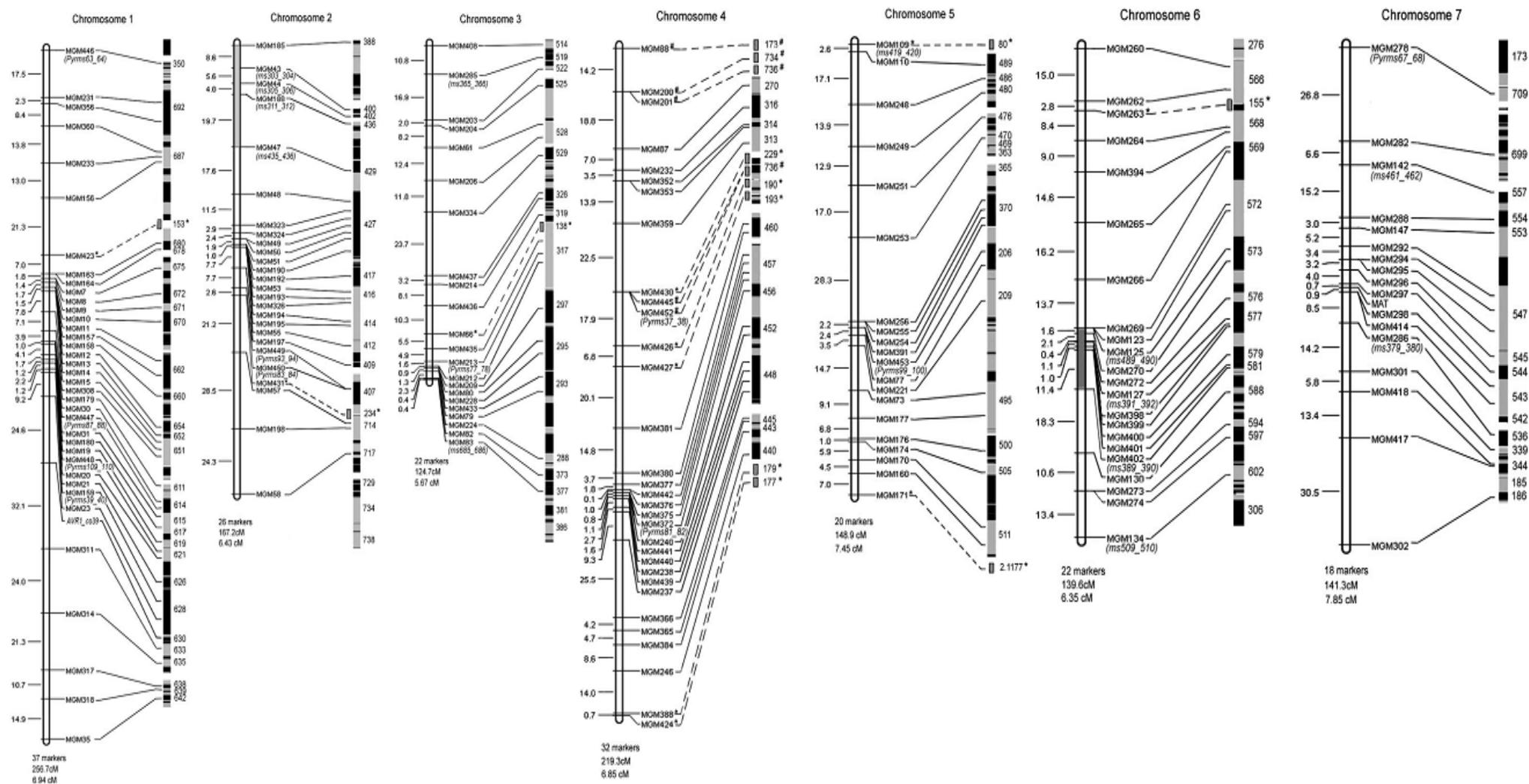


Рисунок. 18 - Генетическая карта *P. oguzae* Cav., созданная на основе физической карты (вариант 5) и ее сравнение с физической картой

Примечание: для каждой хромосомы генетическая карта расположена слева, а физическая – справа. На генетической карте каждой хромосомы названия SSR маркеров указаны справа, а расстояние (сМ) между смежными маркерами - слева; число маркеров, длина хромосомы (сМ) и среднее расстояние между смежными маркерами (сМ) указаны под картой. Маркеры, выделенные курсивом, взяты по Кайе и др. (2003) и имеют приставку ‘Pyrms’. Остальные - по Вонгу и др. (2005) с приставкой ‘ms’. На физической карте черные или светло-серые прямоугольники обозначают контиги, названия которых указаны справа. Отсутствие связей на физической карте обозначено пробелами. Маркеры с неизвестной физической позицией или с измененной позицией (согласно физической карте) обозначены звездочкой или цифрой; их соответствующие контиги показаны как темно-серые прямоугольники, названия контигов также помечены звездочкой или цифрой соответственно. Позиции нарушения сегрегации обозначены либо светло-серым (на хромосоме 2, привязанной к 2539) либо темно-серым (на хромосоме 6, привязанной к Guyl1) цветами на генетической карте.

Сиквенс SSR- маркеров, использованных в работе, представлен в таблице 6 (Adreit et al., 2007).

Таблица 6 - Микросателлитные маркеры, использованные для изучения биоразнообразия возбудителя пирикуляриоза

Праймер	Последовательность праймеров	Микросателлитный мотив	Температура отжига
Pyrms 7 - 8	F: gcaataacataggaacg	(CT)n	53
	R: agaaagagacaaaactgg		
Pyrms 15 - 16	F: ttctccatttctctctcttc	(CT)n	53
	R: cgattgtggggtatgtgatag		
Pyrms 37 - 38	F: accctaccccactcatttc	(CA)n	53
	R: aaggatcagccaatgccaagt	(CT)n	

Продолжение таблицы 6

Праймер	Последовательность праймеров	Микросателлитный мотив	Температура отжига
Pyrms 87 - 88	F: agacttgttactcgggtcttga	(TGC)n	53
	R: ccagatgtcactcccctgta		
Pyrms 93 - 94	F: cctcgactccttcaccaaaa	(ATC)n	55
	R: cggagagctcaggaagagg		
Pyrms 99 - 100	F: caccactttatggcgcagt	(ACC)n	53
	R: acctaggtaggtatacatgttggt		
Pyrms 101 - 102	F: ctgcgttcaacatgcctcta	(AC)n	53
	R: cttgatctgcggtatgagca		
Pyrms 107 - 108	F: gcagcaagcagcaatatcag	(GA)n	53
	R: gtggatatcgaaggccaagg		
Pyrms 115 - 116	F: ttcggtcaccttttggetct	(GA)n	55
	R: ttgtaagtgagcggacgtg		
Pyrms 125 - 126	F: ctctccggccaagattga	(CAA)n	55
	R: ggttggtgggagaaagaacg		
Pyrms 233 - 234	F:tgagatggaccgcatgatta	CAG/CTC ₁₀	55
	R:ttgatggcagagacatgtagc		
Pyrms 319- 320	F:taagaccactggcggaaatct	CAA/GTT ₆	55
	R:ggctttgtctggtgtacgg		
Pyrms 409 - 410	F:tcccagtactgccccatctc	TA/AT ₂₃	55
	R:atctcatatccgtcggctgt		
Pyrms 427 - 428	F:ctgtcaccacaaccaagacg	AT / TA ₁₆	55
	R:ttgccctgattgtcagtca		

Продолжение таблицы 6

Праймер	Последовательность праймеров	Микросателлитный мотив	Температура отжига
Pyrms 453 - 454	F:gaccctcgagaaatgatgga	GAA/CTT ₆	55
	R:gtcaaagagctccccatctg		
Pyrms 505 - 506	F:cctgtcgtagcacctttggt	GAAA/CTTT ₅	55
	R: ttgtcctcgtccccatggtt		
Pyrms 533 - 534	F: cttatcggaggtgcagaac	TCTAGT/AGATCA ₃	55
	R:cacggcatactgcatacgtg		
Pyrms 607- 608	F:cccaagctccataataggctac	GCA/CGT ₁₃	55
	R:tccgagactctttggatagcac		
Pyrms 657 - 658	F: atcagtcgaaccsacaaagc	CA/GT ₁₂	55
	R:atgtgtggacgaaccagtc		

Примечание: F-прямой праймер (5`-нуклеотидная последовательность), R-обратный праймер (3`-нуклеотидная последовательность), n-количество повторов микросателлитного мотива.

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).

2.6.5 SSR-маркеры, используемые для оценки генетической чистоты гибридов F₁ капусты белокочанной (*Brassica oleracea L.*) и перца сладкого (*Capsicum annuum L.*)

Для маркирования геномов растений, выявления филогенетических связей на межвидовом и межпопуляционном уровнях и уточнения

таксономического статуса отдельных видов и родов широко используются SSR- маркеры, которые отражают уникальный для каждого индивидуума полиморфизм нуклеотидных последовательностей.

За последние годы число доступных праймеров к микросателлитным локусам *Brassica oleracea L.* и *Capsicum annuum L.* значительно увеличилось. В настоящее время в Международной базе данных *Brassica* и *Capsicum* Microsatellite Information Exchange (<http://www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm>) представлено 628 пар праймеров к фланкирующим областям микросателлитов видов *B. napus*, *B. rapa*, *B. nigra*, *B. oleracea*.

В базе данных <http://www.VegMarks> имеется более 600 кодоминантных микросателлитных молекулярных маркеров для SSR молекулярно-генетических исследований капусты белокочанной (*Brassica oleracea L.*), а также перца сладкого (*Capsicum annuum L.*) (табл. 7, 8; Minamiyama et al., 2006 ; Hanacek et al., 2009).

Таблица 7 - Праймеры для генотипирования *Brassica oleracea L.*

1.

№	Название праймера	Последовательности праймеров	Диапазон длин ПЦР-фрагментов, п. н.	Мотив	Геном-специфичность
1	Na10-D09	F-AAGAACGTCAAGATCCTCTGC R-ACCACCACGGTAGTAGAGCG	150-170	(GT) _n	ABC
2	Na12-A02	F-AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R-AGTGAATCGATGATCTCGCC	160-218	(CT) _n	ABC
3	Na12-F12	F-CGTTCTCACCTCCGATAAGC R-TCCGATGTAGAATCAGCAGC	170-190	(CCG) _n	ABC
4	Ni2-B02	F-CGCTGCAATTATACGAAAGC R-CCTCATGCTCTCCAAAGACC	80-110	(GGC) _n	ABC
5	Ra2-E12	F-TGTCAGTGTGTCCACTTCGC R-AAGAGAAACCCAATAAAGTAGAACC	125-165	(GA) _n	ABC
6	Ni3-G04B	F-ATACTCGGGATAGGTGTGCG R-CATGTGGCAATCCTACATTTAC	70-140	(AG) _n	ABC
7	O112-A04	F-TGGGTAAGTAACTGTGGTGCC R-AGAGTTCGCATACTCTGGAGC	110-150	(CT) _n	ABC
8	BRMS-006	F-TGGTGGCTTGAGATTAGTTC R-ACTCGAAGCCTAATGAAAAG	140-175	(GA) _n	ABC

Продолжение таблицы 7

№	Название праймера	Последовательности праймеров	Диапазон длин ПЦР-фрагментов, п. н.	Мотив	Геном-специфичность
9	AF051772	F- TCCGAAAGTGGGGAAAGG R- TGTGTCAGAAAGCGAGAAGG	154–187	(aag)5	ABC
10	AF458409	F- AGAAAGCAGACGGGAATGG R - TGGTTAAAGCGAAAGTGTGC	133–168	(aga)6	ABC
11	AJ427337	F- GCTGATGTTGATGGTGTGATGG R - GCCGAAGCAGACAAATAAAAC	187–212	(ga)5	ABC
12	BZ523957	F- ATTATGACGCCTGTTTTA R - TTGGTTAGAAGTTATGGGAAC	231–272	(ttg)6	ABC
13	CC956628	F- GTCCCCTCTCTCTCCCATCC R - TGAGCCATTTCTTTATTTGTTCC	201–218	(tc)5	ABC
14	CC956699	F- TCTCACCTATCTTCTTCTTTCTTCT TTC R - CGCCTCGTGCTTCTTTCTC	158–198	(cac)9	ABC
15	CC969431	F- AAGCCACCTCACCTTAGCC R - GAAATCCCAGAGACTGAAAACC	237–272	(ga)6	ABC
16	CC969459	F- CCAAAGATTCAGAGGAAATGG R - GCGTCAAAAACGGTGTCG	190–205	(cgg)5	ABC
17	CC969497	F- CAAATGACTACGGGAACAGGA R - GGGTGGTGCTCAAGGATAAA	129–145	(tgc)5	ABC
18	CC969507	F- AACTGAAACGACCAAGAAGTCC R - CCAGGAGGAGAGAGAGAGAGC	298–301	(ct)5	ABC
19	X94979	F- TCCAAGACCGTAGAGGAGGA R - AAGCCAACAACCTTCAACAACA	128–138	(atg)5	ABC

Таблица 8 - Нуклеотидная последовательность SSR-маркеров на *Capsicum annuum L.*

№ пп	Название праймера	Сиквенс	Мотив	Хро мосо ма	PIC	Ожида емый размер продук та
1	CAMS-142	F gagcgcttaagtggatcatagg	(ta)3...(ac)7 ... (ac)12a(ta)8	7	0.78	241
		R ctacaacgccccaaaacaat				
2	CAMS-153	F tgcacaaatgatcccaaga	(ta)7(tg)14cg(tg)6	6	0.73	243
		R aagtcagcaaacacatctgacaa				
3	CAMS-156	F ccctatgctttcacaactct	(ac)14a(ta)6	10	0.71	181
		R gacgtggttatgacgataggc				
4	CAMS-398	F atggccatggcagcagat	(ag)22	7	0.73	165
		R gggcagaacagtggatgatt				
5	CAMS-606	F gactagtccccgttcaacca	(gt)3...(tc)14	7	0.78	208
		R tttgcgagaagatgcttcag				
6	CAMS-806	F tgcacaagtgtcaaggtaggag	(aga)19	10	0.79	227
		R cccccaaaattttccctcat				
7	CAMS-117	F ttgtggaggaaacaagcaaa	(tg)21(ta)3	11	0.86	223
		R cctcagcccaggagacataa				
8	CAMS-405	F ttcttgggtcccactttc	(tc)18	8	0.83	241
		R aggttgaaaggagggaata				
9	CAMS-811	F gaagaaacgaaggatgaacaaa a	(aag)3...(gaa) 3... (gaa)7	9	0.82	260
		R cctgtttccttctcagc				
10	CAMS-234	F tatagcccatgggtgccttt	(ta)5(tg)6cg(tg)7	6	0.78	157
		R aaaaccaatattaacatgca a				
11	CAMS-236	F ttgtagtttgctaccatttga	(ac)14a(ta)10	2	0.70	191
		R atgaatccagggtccacaa				
12	CAMS-864	F ctgttggaagaagaggaca	(aga)32	7	0.86	222
		R gcttcttttcaacctctcct				

Праймерные последовательности, использованные в работе, синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» и ООО «Beagle», Россия.

2.7 Методика проведения фитопатологического тестирования на устойчивость к пирикулярриозу.

Оценка донорных линий риса IR-36, BL-1, C104-Lac, C101-A-51, C101-Lac, IR 83260-2-10-5-2-1-B на устойчивость к местной популяции *Pyricularia oryzae* 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.

Растения риса заражают культурой гриба *P.oryzae* в фазе 4-5 листьев путём опрыскивания суспензией его конидий. Для инокуляции используют 2-3 недельные колонии. Каждую колонию смывают 20-30 мл воды в колбу. Для отделения конидий от мицелия колбы встряхивают в течение 10. Затем суспензию процеживают через марлю и подсчитывают под микроскопом титр конидий в суспензии, который должен быть равен 100000кон/мл или 10-14 спорам в поле зрения микроскопа при 120х увеличении.

Растения опрыскивают из пульверизатора с нормой расхода суспензии 0,5 мл на одно растение. В суспензию для лучшей адгезии добавляли «Tween» (Россия) из расчёта 1 капля на литр воды (Коваленко и др., 1988).

Учёт степени поражения растений (в процентах) проводили на 14 день после инокуляции, согласно экспресс-методу оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу. Оценку осуществляют, 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 пирикулярриозные 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 делят на 4 группы: устойчивый тип, промежуточный, восприимчивый, сильновосприимчивый.

2.8 Оценка селекционного материала по хозяйственно-ценным признакам

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

Посев опытных образцов проводили ежегодно 01 - 09 мая 2009-2018 гг., согласно схемам селекционных питомников:

1. Селекционный питомник
2. Контрольный питомник

3. Конкурсное сортоиспытание + экологическое сортоиспытание.

Селекционный питомник закладывался сеялкой СКС6-10 однорядковыми деланками 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, имеющие 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 дактильметодом деланками 6,4 м² в двукратной повторности с нормой высева шесть – семь миллионов всхожих зёрен на 1 га или 400 всхожих зерен на 1 м². Сорт-стандарт – Флагман высевали через 10 деланок. Фенологические наблюдения включали фиксацию дат залива, всех обработок, фаз вымётывания и полной спелости. Уборку семенных деланок проводили вручную, серпом. В деланках, где отмечалось расщепление по морфометрическим показателям и резистентности к пирикуляриозу, отбирали растения с положительными хозяйственно-ценными признаками для повторного изучения. После просушки снопы обмолачивали на молотилке, затем определяли влажность, по необходимости просушивали в сушилке до влажности 14% и затем зерно взвешивали, учитывая урожайность.

В конкурсном сортоиспытании сортообразцы размещали на опытных деланках 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. Залив опытного полигона проводился на 3 сутки после посева. Всходы наблюдали на 14-16 сутки после посева. 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 полегаемость и осыпаемость (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.

Уборку провели комбайном ДКС - 685 с очесывающим молотильным аппаратом. Семена высушивали и очищали на лабораторной семяочистительной машине СМ - 1,5 и на «Петкус – Гигант» К-531.

Статистическую обработку полученных данных проводили по Б.А. Доспехову (Доспехов, 1979).

2.9 Грунт-контроль, как метод определения уровня гибридности гибридов F_1 овощных культур

Грунтовой контроль - приём определения степени сортовой однородности семенного материала по морфологическим, биологическим и хозяйственным признакам у растений, выращенных на однородном фоне. Проводится на специальных грунтовых участках контрольно-семенных станций в порядке государственного семенного контроля как выборочная проверка правильности выданных гарантий о сортности семян. При грунтовой контроле взятые из партии семян средние образцы высеваются на небольших делянках с обязательной "привязкой" образцов к соответствующим посевам в хозяйстве (Методика проведения грунтового контроля по группам сельскохозяйственных растений, 2004).

Проведение грунтовой контроле связано с большими трудовыми и материальными затратами на изготовление посевных ящиков, доставку почвы с поля на территорию, где он будет проводиться. Вручную осуществляется подготовка почвы к посеву (просеивание ее через грохот, перемешивание переброской на конус, набивка посевных ящиков) и очистка

посевных ящиков от почвы после уборки посевов. В силу этих причин в грунтовом контроле оцениваются только партии семян из первичного семеноводства.

2.10 Статистический анализ

При расчёте соответствия опытных и теоретически ожидаемых результатов по каждому классу и всему расщеплению в целом использовался метод «хи-квадрата» (χ^2). Суть его заключается в теоретическом расчёте потомков каждого класса расщепления. Для этого, полученное общее количество потомков делят на число возможных сочетаний гамет, определяя тем самым теоретически ожидаемое расщепление (q). Далее определяют величину отклонения (d), возведённую в квадрат (d^2), для избежания получения отрицательных величин. Затем данный показатель делят на теоретически ожидаемую величину для каждого класса. Их сумма и является показателем хи-квадрата. В дальнейшем, используя таблицу Фишера с учётом степеней свободы определяют вероятность случайности отклонения (P) и делают выводы о соответствии полученных результатов (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.

Кластерный анализ включает в себя набор различных алгоритмов классификации. Назначение этих алгоритмов состоит в объединении объектов в кластеры, используя некоторую меру сходства или расстояние между объектами. Типичным результатом кластеризации является иерархическое дерево. На нём в системе координат по горизонтали откладываются объекты в порядке их родства; по вертикали – линии, отражающие расстояния между анализируемыми объектами или группами

объектов. Наиболее прямой путь определения расстояний между объектами состоит в вычислении евклидовых расстояний. Оно является геометрическим расстоянием в многомерном пространстве и вычисляется следующим образом:

$$\text{расстояние}(x,y) = \{ \sum_i (x_i - y_i)^2 \}^{1/2}$$

где расстояние(x,y) – значение дискриминантной функции;

x_i - численное значение i -го признака;

y_i - вклад i -го признака в значение функции.

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

2.11 Агротехнологический фон и условия произрастания сортов и генотипов риса и овощных культур, отобранных для молекулярно-генетического анализа

Отбор биоматериала (зеленых листьев) для молекулярно-генетических исследований проводился у экспериментальных селекционных образцов риса, которые выращивались на опытных полигонах рисовой оросительной системы ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса с 2007-2018 гг., а овощных культур - на багаре ФГБНУ «ВНИИ риса».

Климатические условия. Рисовые оросительные системы Краснодарского края располагаются в низовьях реки Кубань западнее города Краснодара. Эти территории расположены в III агроклиматическом районе центральной зоне региона в направлении с северо-запада на юго-восток и включают следующие административные рисосеющие районы: Славянский, Красноармейский, Темрюкский, Крымский, Абинский, Северский (Агроклиматические ресурсы Краснодарского края, 1975). Благоприятные почвенно-климатические условия этих районов позволяют выращивать как культуру рис, так и овощные культуры.

Третий агроклиматический район характеризуется умеренно-континентальным климатом с умеренным увлажнением (коэффициент увлажнения 0,30- 0,40). За год выпадает 600-700 мм осадков, но неравномерно: основное их количество выпадает в осенне-зимний период (250-400 мм).

По многолетним данным, среднегодовая температура воздуха составляет 11,9 °С. Продолжительность теплого периода со среднесуточной температурой 15 °С составляет 122-146 дней с суммой положительных температур 2300-3000 °С (Агроклиматические ресурсы Краснодарского края, 1975). Средняя температура июня равна 20 °С, в июле 22-24 °С. Эта температура характеризует период усиленного роста вегетативных и генеративных органов, а также накопления в растениях пластических веществ у овощных культур и риса.

В период вегетации возможны ветры со скоростью 15 м/с и выше. Общее число дней с суховеями составляет на большей территории 50-75 дней. Интенсивные и очень интенсивные суховеи почти отсутствуют.

Почвы в зонах рисосеяния расположены на пойменных и плавневых землях в низовьях реки Кубань. Основными типами почв рисовых агроландшафтов являются лугово-черноземные, аллювиально-луговые, луговые, лугово-болотные, пригодные для возделывания риса и других зерновых культур. (Агроклиматические ресурсы Краснодарского края, 1975).

Опыты проводились на рисовой оросительной системе ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса в поселке Рисоопытном Красноармейского района. Земли участка, где проводился опыт, относятся к первой агроэкологической категории и предназначены для возделывания риса и других культур в рисовом севообороте. Скорость фильтрации для них в затопленном состоянии составляет 0,001-0,003 м/сут. Уровень грунтовых вод в межвегетационный период находится ниже 1,5 м.

В структуре почвенного покрова преобладают рисовые, лугово-чернозёмные, мощные, тяжелосуглинистые почвы на аллювиальных

отложениях и деградационных лессовидных глинах. Мощность гумусового горизонта А+В превышает 130 см. По содержанию гумуса почва опытного участка относится к малогумусовым (3,2 – 4,2%). Содержание валового азота равняется 0,16 – 0,20 %, общего фосфора – 0,15 -0,18 %. Легкогидрализуемые соединения азота составляют 7,38- 7,46 мг/100 г. Содержание обменного аммония колеблется от 1,28 до 2,06 мг/100 г; рН= 7,2 – 7,7. Сумма поглощённых оснований составляет 37,0 – 39,3 мг-экв/100 г. В составе почвенно-поглощающего комплекса преобладает кальций. Его доля составляет 69,7 – 75,3 %. Карбонаты в верхней части профиля отсутствуют. (Похно, 2011).

Описываемые почвы характеризуются средней обеспеченностью подвижными формами калия – 17, 5 – 20,0 мг/100 г. По обеспеченности фосфором изменяются от средней (3,77 мг/100 г) до повышенной (5,55 мг/100 г) (Бочко, Авакян, 2006).

Агроэкологические условия рассматриваемого опытного участка отвечают требованиям растений риса, являются благоприятными для его возделывания и при чётком соблюдении агротехнологических требований способны обеспечить получение высоких и стабильных урожаев риса.

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.

В селекции растений, основанной на классических методах – гибридизации и отборе, в настоящее время широко используются методы молекулярного маркирования, которые позволяют идентифицировать целевые гены и отбирать желаемые генотипы, основываясь на ДНК – анализе (Kumar et al., 2012; Jena et. al., 2003). В мировой практике возникло такое направление, как маркер-опосредованная селекция (marker assisted selection - MAS). С её помощью осуществляется молекулярно-генетическое сопровождение селекционного процесса, начиная с подбора исходного материала, наличия желательных генов и заканчивая паспортизацией нового сорта (Хавкин, 2003).

Создание сортов сельскохозяйственных культур, в том числе риса, устойчивых к грибным фитопатогенам, длительному затоплению, а также низким положительным температурам в фазу прорастания семян и всходов наиболее рациональное решение проблемы защиты растений от болезней, сорняков и снижения продуктивности. Внедрение таких сортов в производство является важным природоохранным фактором и, помимо высокого экономического эффекта, обеспечивает существенное снижение энергетических затрат на производство продукции.

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

Рис является одной из трёх важнейших продовольственных культур. Им питается более сотни миллионов человек на планете. Согласно статистическим данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН рис в 2015 г. возделывался на площади 162,3 млн. га, его урожайность в среднем составляла 4,5 т/га, валовой сбор 738,8 млн. т (FAO Rice Market Monitor, July 2016).

В России урожайность риса в 2015 г. составила 6,4 т/га с площади посевов 199,4 тыс. га и валовой сбор риса-зерна– 1220,7 тысяч тонн (Гаркуша и др., 2015).

Краснодарский край является крупнейшим рисосеющим регионом РФ. Ресурсная обеспеченность отрасли природными факторами достаточно высока. Сейчас рисосеющая отрасль края находится на подъеме. В 2018 году в среднем по краю урожайность культуры составила 6,4 т/га в зачетном весе, что является абсолютным рекордом за всю историю рисосеяния на Кубани.

По степени вредоносности для риса пирикуляриоз (возбудитель несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr)) занимает первое место. Патоген поражает все надземные органы растения и представляет опасность в течение всего периода вегетации культуры риса (Дубина и др., 2015a).

Учащение эпифитотий пирикуляриоза риса наблюдается во всех рисосеющих регионах мира. Это объясняется, прежде всего, внедрением новых технологий, предусматривающих применение высоких доз минеральных удобрений, особенно азотных. При перекорме растений азотом болезнь развивается наиболее интенсивно (Зеленский, 2016).

С целью ограничения вредоносности пирикуляриоза на посевах риса во всех странах применяются химические препараты – фунгициды.

Для внесения фунгицидов российские рисоводы вынуждены использовать авиацию из-за отсутствия специальных машин для наземной обработки растений по воде, а также из-за сжатых сроков проведения этих агроприемов одновременно на большой площади сева риса. Применение авиации увеличивает экономические затраты на производство риса и усиливает экологическую напряженность, так как наряду с посевами риса обрабатываются все элементы оросительной системы (каналы, валики, дороги; Зеленский, 2016).

В Краснодарском крае около 30 % рисовых систем расположено в санитарной зоне, где резко ограничен ассортимент применяемых химических средств и запрещено использование авиации. Разрешенные агрохимикаты необходимо вносить наземным способом и только при крайней необходимости, в соответствии с требованиями санитарных правил (Дубина и др., 2015 с).

Практика показывает, что на посевах риса, где систематически применяются химические средства защиты, существует реальная опасность мутирования гриба *Pyricularia oryzae* Cav., появления новых его форм, устойчивых к применяемым фунгицидам. Поэтому основным методом защиты риса от заболевания, вызываемого этим грибом, должно стать внедрение в производство высокоурожайных и иммунных к патогену сортов (Дубина и др., 2015 а, б; Костылев и др., 2012).

В связи с этим наиболее надежным, экологически чистым и экономически оправданным способом сокращения потерь урожая от заболевания является создание и использование устойчивых сортов, которые подавляют агрессивные свойства патогена путём ограничения в фитоценозе инфекционного начала.

Однако селекция на устойчивость к фитопатогенным грибам более сложна, чем селекция на какой-либо другой хозяйственно-ценный признак, что обусловлено непрерывно идущими у патогена формообразовательными процессами (Дубина, 2011 б; Зеленский Г.Л., 1993). Со сменой

возделываемого ассортимента риса происходит жесткий отбор на выживаемость самого патогена, в результате которого возникают новые расы, патотипы возбудителя пирикуляриоза.

Одна из стратегий получения ценной генетической плазмы риса с длительной и стабильной устойчивостью к пирикуляриозу - это объединение эффективных для юга России генов резистентности в высокопродуктивные отечественные сорта.

Большинство генов резистентности к возбудителю болезни, которые идентифицированы у риса, обеспечивают непоражаемость растений ограниченным числом рас патогена, но эти гены при объединении в одном генотипе могут обеспечить стабильную устойчивость к заболеванию (Wang et al., 2009).

Для успешного выполнения программ по созданию устойчивых к пирикуляриозу сортов риса перед селекционером стоит главная задача: подобрать эффективные гены резистентности для определенного региона. Поэтому нами были проведены такие исследования и определены эффективные гены для юга России (Дубина Е.В. и др., 2018). Гены *Pi-ta* и *Pi-b* секвенированы. Гены *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40* относят к генам широкого спектра устойчивости (Kumar et al., 2000).

В связи с этим на основе использования технологии ДНК-маркерной селекции (marker assisted selection – MAS - селекция с применением ДНК маркеров к генам интереса) методом гибридизации в 2007 году проведено введение генов устойчивости к пирикуляриозу *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 нами для повышения иммунитета данных сортов к заболеванию.

В качестве доноров переносимых генов устойчивости (отцовская форма) использованы линии зарубежной селекции С101-А-51 (донор

гена *Pi-2*), С101-Lac(*Pi-1*, *Pi-33*), IR-36 (донор гена *Pi-ta*), BL-1 (донор гена *Pi-b*), IR 83260-2-10-5-2-1-B (*Pi-40*).

Оценка линий-доноров на чувствительность к краснодарской популяции патогена *P.oryzae*, проведенная на вегетационной площадке ВНИИ риса при инокуляции растений риса культурой гриба. Результат оценки показал устойчивость тестируемых линий. Однако, в условиях юга России, данные линии-доноры проявили себя как позднеспелые, с вегетационным периодом 140 - 155 дней и характеризовались низкой фертильностью. В местной зоне рисосеяния предпочтительно возделывание сортов, созревающих не более чем за 120-125 дней (Дубина Е.В. и др., 2015 д; Зеленский, 1993, 2016).

Материнской формой послужили высокопродуктивные районированные сорта - Флагман, Боярин, Снежинка, а также крупнозёрные линии риса КП-163 и ВНИИР5242 (Дубина и др., 2011).

На рисунке 19 представлена схема переноса генов *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40* в генотипы российских сортов риса из линий-доноров.

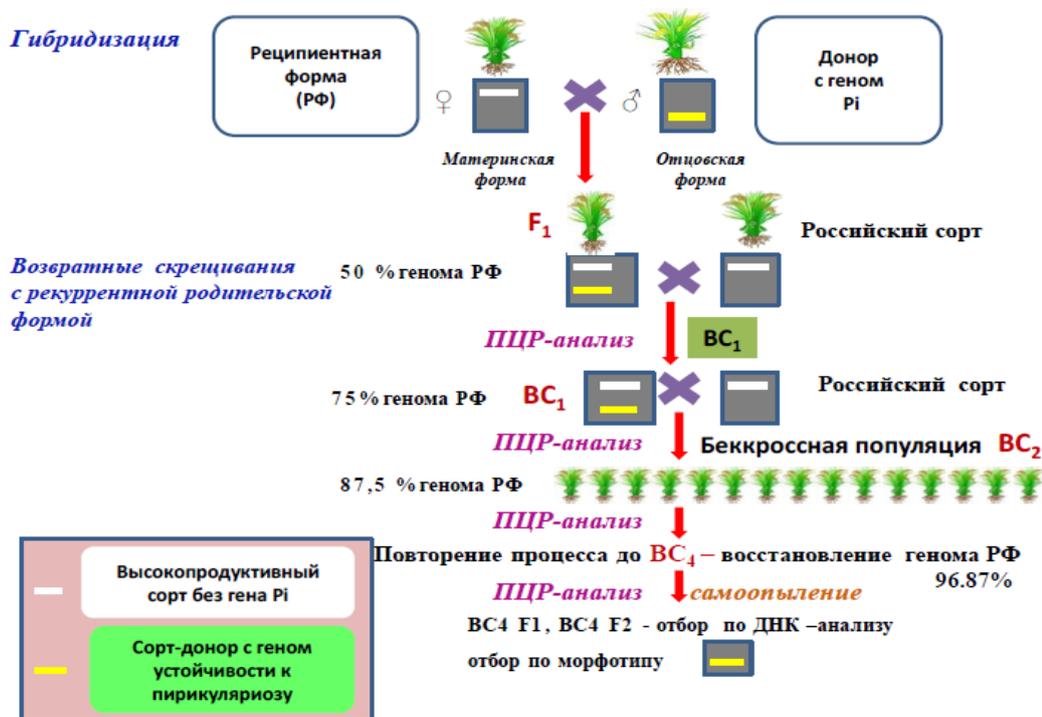


Рисунок 19 - Схема введения генов распецифической устойчивости к пирикуляриозу в отечественные сорта риса с помощью MAS

В результате гибридизации каждой комбинации было получено F₁ поколение, которое использовали в возвратных скрещиваниях с реципиентными родительскими формами (отечественными сортами риса).

Следует отметить, что растения F₁ имели высокую степень стерильности (до 95%). После проведения первой серии беккроссов в 2008 году в камерах искусственного климата получено BC₁ и BC₂ поколение. В BC₁-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* (Мягких 2009; Шилов и др., 2016, 2018) и микросателлитных маркеров, сцепленных с генами *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40*. Для гена *Pi-2* использовали RM 527, SSR 140; для *Pi-1* - RM 224; для гена *Pi-33* - RM 72, Rm 310; для гена *Pi-z* – RM 60510; для гена *Pi-40* – RM 3330 и RM 527 (сиквенс праймерных пар взят из базы данных генетических ресурсов NCBI).

Отбирали растения, которые по результатам ДНК-анализа несли донорную 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 BC₂-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. С этапа BC₄F₁ (первое

самоопыление растений риса, которое даёт возможность перевести донорную 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).

По каждой комбинации было проведено четыре беккросса, поскольку известно, что восстановление генома рекуррентного родителя (RP) при возвратных скрещиваниях в BC_4 составляет 96,9 % (Jena et al., 2003).

В результате работы на основе отечественных сортов риса получен обширный спектр линий риса с генами резистентности к патогену *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 питомниках, согласно схемам селекционного процесса.

На рисунках 20-25, представлены результаты ПЦР-анализа на наличие переносимых генов устойчивости к пирикуляриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-40* в высокопродуктивный отечественный сорт риса Флагман (рис. 20 - 25).

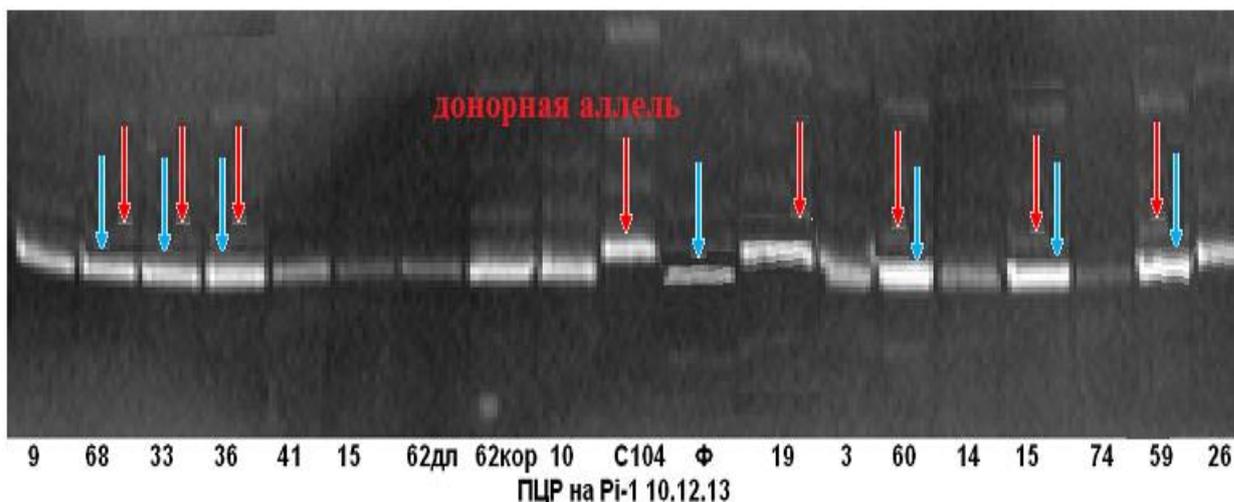


Рисунок 20 - Результаты ПЦР-анализа на наличие переносимого гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-1*

Примечание: 9...26 - анализируемые гибридные растения BC_4F_2 - популяции; Ф - сорт- реципиент Флагман; С104 - линия С104-LAC- донор гена *Pi-1*; красной стрелкой показан донорный аллель гена *Pi-1*, синей –

Примечание: 39....56 - анализируемые гибридные растения BC_4F_2 - популяции; Ф- сорт- реципиент Флагман; С101 - линия С101-А-51- донор гена *Pi-2*; красной стрелкой показан донорный аллель гена *Pi-2*, синей – рецессивный аллель; электрофоретические дорожки с красной и синей стрелками- гетерозиготы.

Из рисунка 21 видно, что растения под номерами 31, 40, 35т, 16, 24 и 18, полученные в комбинации С101-Лас-А-51 (донор гена *Pi-2*) × Флагман, имеют в генотипе доминантную аллель гена *Pi-2*; растения 64, 70, 67, 69, 7, 21, 35св, 11,39, 4, 6, 63 - гомозиготы по рецессиву. По результатам маркерного анализа гибридных растений риса BC_4F_2 - популяции данной комбинации в выборке (96 штук) получено следующее соотношение: 22 гибридных растения имели в генотипе доминантную аллель гена *Pi-2* в гомозиготном состоянии, 47 – в гетерозиготном, 27 растений – гомозиготы по рецессиву, что также соответствовало 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 донорной аллели гена *Pi-2*. Отбирали растения с геном *Pi-2* в гомозиготном состоянии для изучения их по комплексу хозяйственно-ценных признаков в полевых условиях в ФГУЭСП «Красное».

На рисунке 22 представлены результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР с образцами ДНК растений из BC_4F_2 - популяции, полученной от комбинации С101-Лас × Флагман. Молекулярный анализ проводили тесно сцепленными с геном *Pi-33* фланкирующими микросателлитными маркерами – Rm310+RM72.

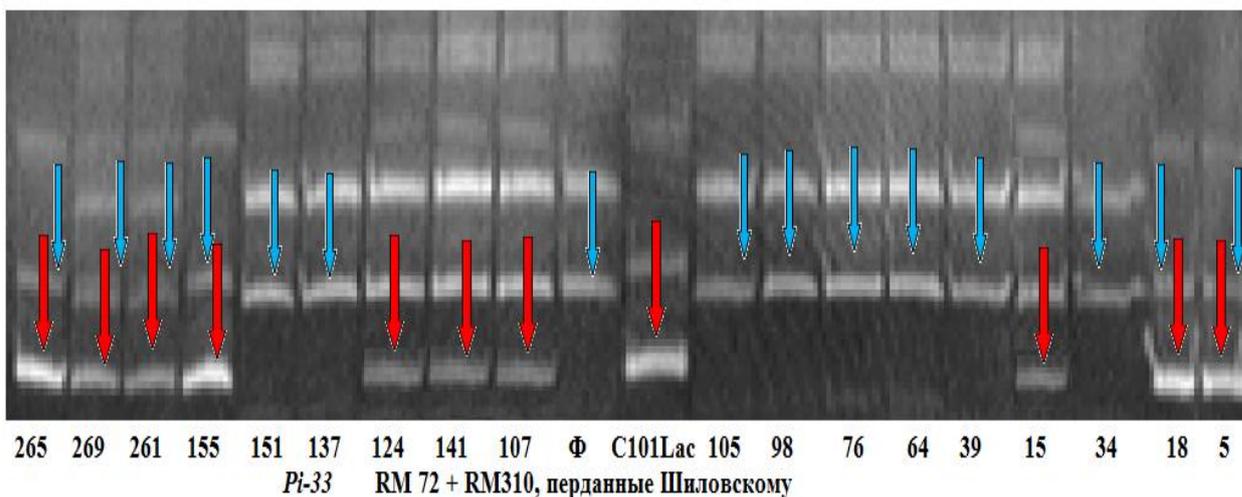


Рисунок 22 - Результаты ПЦР-анализа линий риса на наличие переносимого гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-33*

Примечание: 5...265 - анализируемые гибридные растения; Φ – сорт-реципиент Флагман; красной стрелкой отмечена донорный аллель гена *Pi-33*, синей - аллель материнской формы (сорт Флагман); электрофоретические дорожки с красной и синей стрелками- гетерозиготы.

По результатам ПЦР-анализа растения под номерами 151,137, 105, 98, 76, 64, 39, 34 были выбракованы, остальные растения отобраны и вовлечены в последующие циклы по созданию резистентных сортов риса к патогену *P. oryzae*. В данной комбинации по результатам маркерного анализа из выборки 269 растений получено следующее соотношение: 67:131:71, что соответствует расщеплению Менделя 1:2:1.

Из литературных источников известно, что линия-донор C101-Lac имеет в генотипе два гена резистентности к пирикуляриозу *Pi-1* и *Pi-33* (Jena et al., 2003), поэтому нами был проведен анализ ДНК полученных гибридных растений в данной комбинации и на наличие гена *Pi-1*. Выявлено 29 растений риса, имеющих в генотипе два целевых гена.

Рисунок 23 демонстрирует анализ ДНК гибридных растений риса BC₄F₂-популяции, полученной в результате скрещивания сорта Флагман × IR-36 (донора гена *Pi-ta*).

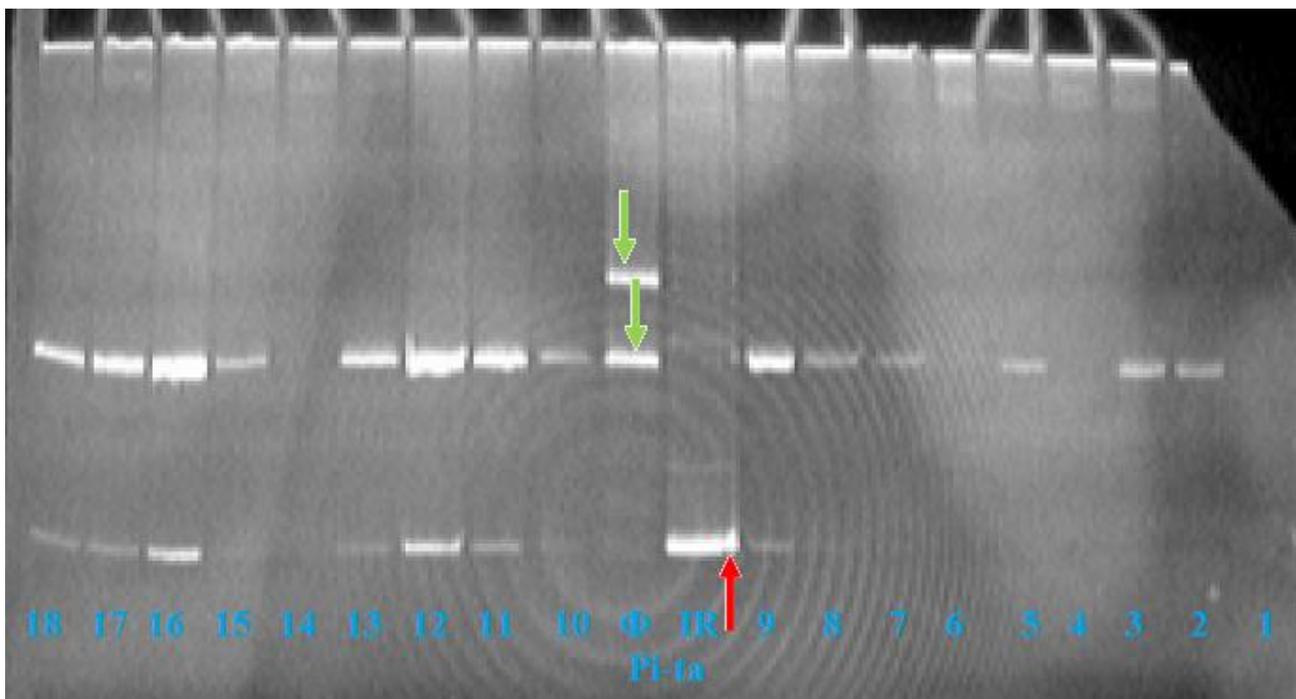


Рисунок 23 - Результаты ПЦР на ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta*

Примечание: Ф - ПЦР-продукт сорта Флагман; IR- ПЦР-продукт сорта IR-36, донора гена *Pi-ta*; 1-18 – гибридные растения BC_4F_2 – поколения; красной стрелкой на электрофореграмме показан донорный аллель целевого гена; зеленой – аллель материнской формы.

Растения под №№15, 14, 1-8 по результатам анализа их ДНК были выбракованы. Остальные отобраны для дальнейшего изучения. Из проанализированных 82 растений получено следующее соотношение: 21:41:20, что соответствует менделеевскому расщеплению 1:2:1. Для дальнейшего изучения были отобраны формы, имеющие в генотипе ген *Pi-ta* в гомо- и гетерозиготном состоянии.

На рисунке 24 представлены результаты анализа ДНК гибридных растений BC_4F_2 -популяции, полученные в результате скрещивания сорта Флагман × BL-1.

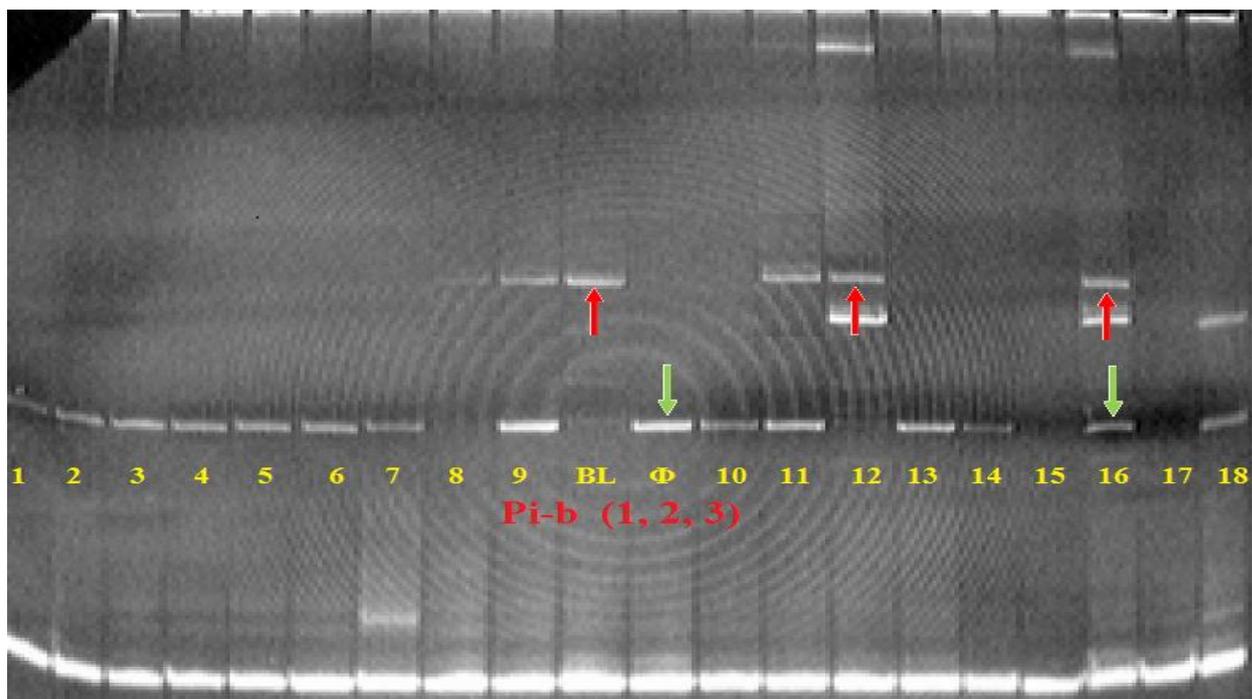


Рисунок 24 - Результаты ПЦР на ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b*

Примечание: VL- сорт риса VL-1 – донор гена *Pi-b*; Ф - сорт риса Флагман (материнская форма); 1-18– анализируемые гибридные растения.

Из рисунка видно, что растения под №№ 8 и 12 являются гомозиготами по доминанте; растения под №№ 9, 11 и 16 – гетерозиготами; остальные растения, имеющие рецессивную аллель гена *Pi-b* были выбракованы. Расщепление по данному гену не соответствовало Менделевскому и было следующим: 14: 47: 20. Это связано с тем, что семена некоторых растений при проращивании их в чашках Петри погибли, в результате чего маркерный анализ был проведен в неполной выборке, а только на 75 выживших растениях. Для дальнейшей работы по изучению полученных образцов на устойчивость к пирикуляриозу и хозяйственно-ценным признакам были отобраны растения, имеющие в генотипе искомый ген в гомо- и гетерозиготном состоянии.

На основе отечественных крупнозёрных, с коротким периодом вегетации линий риса ВНИИР5242, КП-24-15 и ВНИИР9678 и КП-163, а

также сорта Флагман получено BC_3F_2 - поколение с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-40* (рис. 25). По результатам анализа ДНК гибридных растений BC_3F_2 - популяции, полученных в результате скрещивания сорта Флагман × IR83260-2-10-5-2-1-B (донор гена *Pi-40*) отобрано 8 растений, которые имели в генотипе искомый ген в гомозиготном состоянии, а также с положительными хозяйственно-ценными признаками (период вегетации не более 125 дней, высота растений 85- 90 см, длина метелки 15-20 см, масса 1000 зерен 26-31 г). Они размножены и переданы в селекционный процесс для дальнейшего изучения по хозяйственно-ценным признакам, а также оценки на устойчивость к пирикулярриозу.

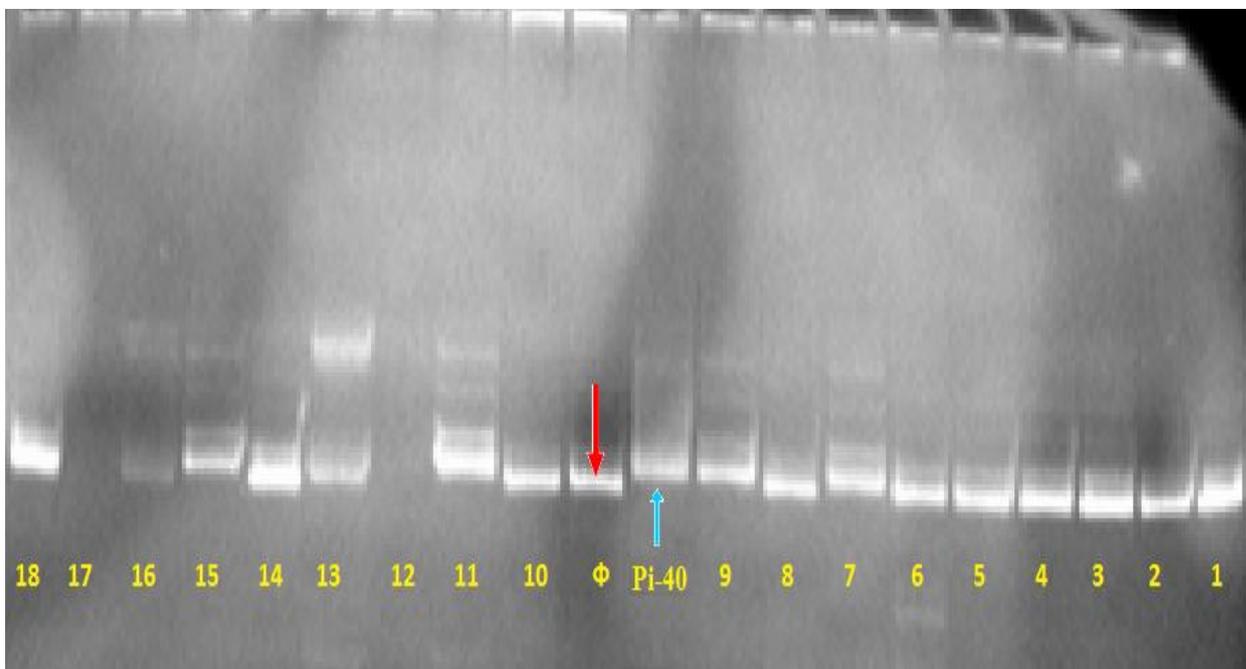


Рисунок 25 - Результаты ПЦР-анализа на наличие переносимого гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-40*

Примечание: 1....18 - анализируемые гибридные растения BC_3F_2 - популяции; Φ- сорт- реципиент Флагман; *Pi-40* - линия IR83260-2-10-5-2-1-B - донор гена *Pi-40*; синей стрелкой показан донорный аллель гена *Pi-40*, красной – рецессивный аллель.

В настоящее время по другим комбинациям также отобраны формы, несущие ген *Pi-40* и имеющие положительные морфометрические

характеристики. Семена данных растений планируется высеять для отбора лучших образцов в потомстве.

На современном этапе для селекции риса желательным является низкорослый тип растений, с высокой интенсивностью первоначального роста, устойчивостью к полеганию, с продуктивной метёлкой и неосыпающимися в фазу полной спелости колосками. Среди растений, которые по результатам ДНК-анализа несли гены *Pi* в гомозиготном состоянии, отобраны образцы, совмещающие в себе все выше перечисленные признаки и в 2010 году они были высеяны в на опытных полевых полигонах в селекционных питомниках в ФГУЭСП «Красное» для изучения их по хозяйственно-ценным признакам и устойчивости к пирикуляриозу. Их характеристика будет представлена в следующем подразделе.

Таким образом, с применением технологии маркерного контроля целевых генов в программе по созданию устойчивых к пирикуляриозу генресурсов риса получен исходный материал с генами *Pi*, которые внедрены в селекционный процесс.

На государственное сортоиспытание переданы:

- в 2017 году сорта риса Альянс и Пируэт (заявки в приложениях 15 -18 и 19-20);

- в 2018 году сорта риса Ленарис и Капитан (заявки в приложениях 10-12 и 13-14).

Однако результативная стратегия селекции на устойчивость к высоковариабельным грибным патогенам заключается в объединении (пирамидировании) нескольких эффективных генов устойчивости на генетической основе элитных сортов. Поэтому была выполнена программа по объединению генов устойчивости к пирикуляриозу.

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

Как отмечалось ранее, одна из стратегий получения сортов риса со стабильной устойчивостью к пирикулярриозу – пирамидирование в генотипе нескольких качественных комплиментарных генов. Это обеспечивает резистентность к широкому спектру рас патогена. Особо перспективным в данном направлении представляется создание сортов риса, сочетающих в одном генотипе гены разного типа устойчивости (расоспецифической устойчивости и широкого спектра действия). Их присутствие в генотипе обеспечит длительную резистентность к патогену *P.oryzae*.

В связи с этим нами была проведена гибридизация полученных генотипов с интрогрессированными генами *Pi* между собой в различных их сочетаниях. В результате получен селекционный материал с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*, *Pi-33+Pi-ta*, *Pi-ta+Pi-b*, *Pi-1+Pi-33*, *Pi-1+Pi-2+Pi-33* (Дубина и др., 2015 в).

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 следующие параметры: 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.

Для идентификации генов *Pi-1+Pi-2* в работе использовали известные праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров (SSR —

simple sequence repeat) RM224+RM527+SSR140 (сиквенс доступен на сайте <http://gramene.com>). Для идентификации генов *Pi-33+Pi-ta* применяли праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров RM310 + RM72 в сочетании с парами праймеров для кодоминантного SSR-маркера PitaF1/PitaR1 и PitaF2/PitaR2, созданного в нашей лаборатории (Мягих, 2009). Для идентификации генов *Pi-ta+Pi-b* использовали пары праймеров для кодоминантного SSR-маркера PitaF1/PitaR1 и PitaF2/PitaR2 в сочетании с праймерами для кодоминантного SSR-маркера Pib4, Pib5 и Pib6, также разработанные в нашей лаборатории (Шилов, 2016).

На начальном этапе при постановке ПЦР в реакционную смесь вносили равное количество праймеров ДНК-маркеров каждого из генов и равное количество ДНК (матрицы) образцов, несущих искомые гены. Концентрация праймеров в реакционной смеси при этом составила 0,3 мкМ. ПЦР осуществляли в ДНК-амплификаторе Терцик («ДНК-технологии», г. Москва) по следующему протоколу: в ПЦР смесь входило 40-50 нг ДНК 0,1 мкМ dNTPs, 25 мМ KCl, 60 мМ Трис-HCl (pH 8,5), 0,1 % Тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5 мМ MgCl₂, 1 ед. Таq-полимеразы и 0,3 мкМ праймеров в конечном объеме 25 мкл. Амплификацию проводили в режиме: начальная денатурация — 5 мин при 94 °С (1 цикл); денатурация — 35 с при 94 °С, отжиг праймеров — 45 с при 60 °С, элонгация — 30 с при 72 °С (35 циклов); финальная элонгация — 5 мин при 72 °С (1 цикл). Данный режим позволил получить выход целевых фрагментов при минимизации количества неспецифичных амплификатов. Результаты апробации комбинации пар праймеров, фланкирующих маркерные участки целевых генов *Pi-1* и *Pi-2* представлены на рисунке 26.

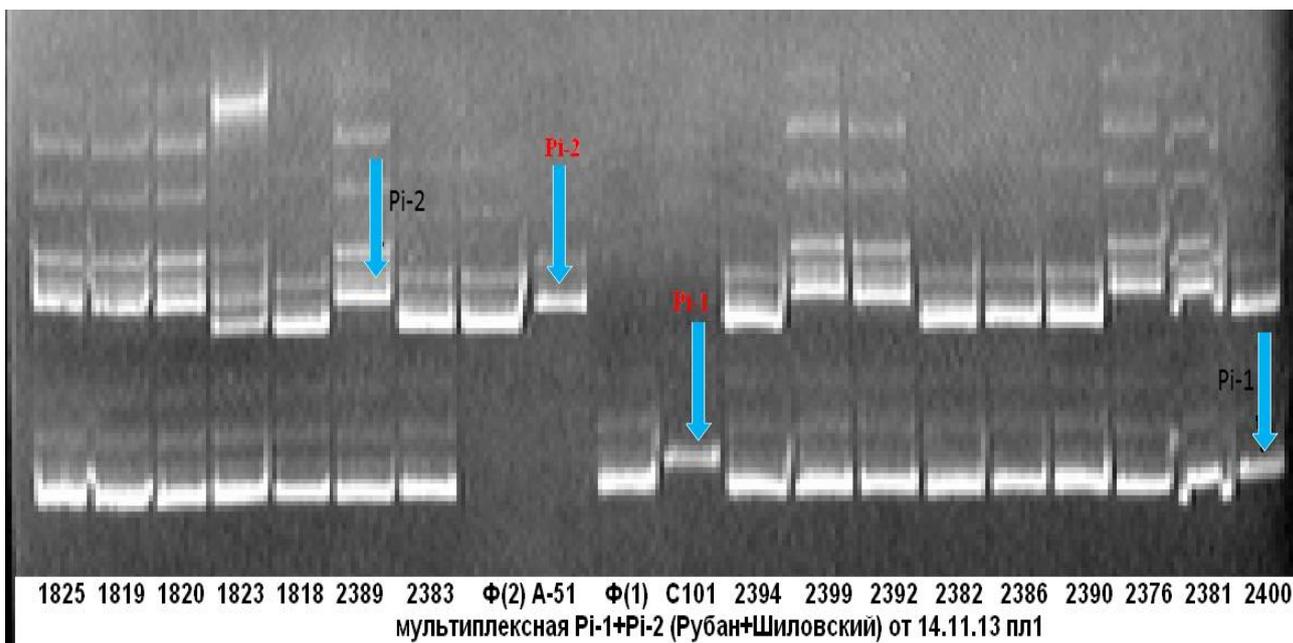


Рисунок 26 - Мультиплексная ПЦР на гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*

Примечание: 1825-2400 – гибридные растения; *C101*- линия С101Лас-донор гена *Pi-1*; *A-51*- линия С101А-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 несёт доминантную аллель гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, остальные образцы, анализируемые на ген *Pi-1* несут 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. Чёткость идентификации на электрофореграмме даёт возможность безошибочно определить наличие доминантных аллелей целевых генов.

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

Результаты мультиплексной ПЦР, проведенной для идентификации в одном генотипе одновременно двух генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-33+Pi-ta*, показаны на рисунке 27.

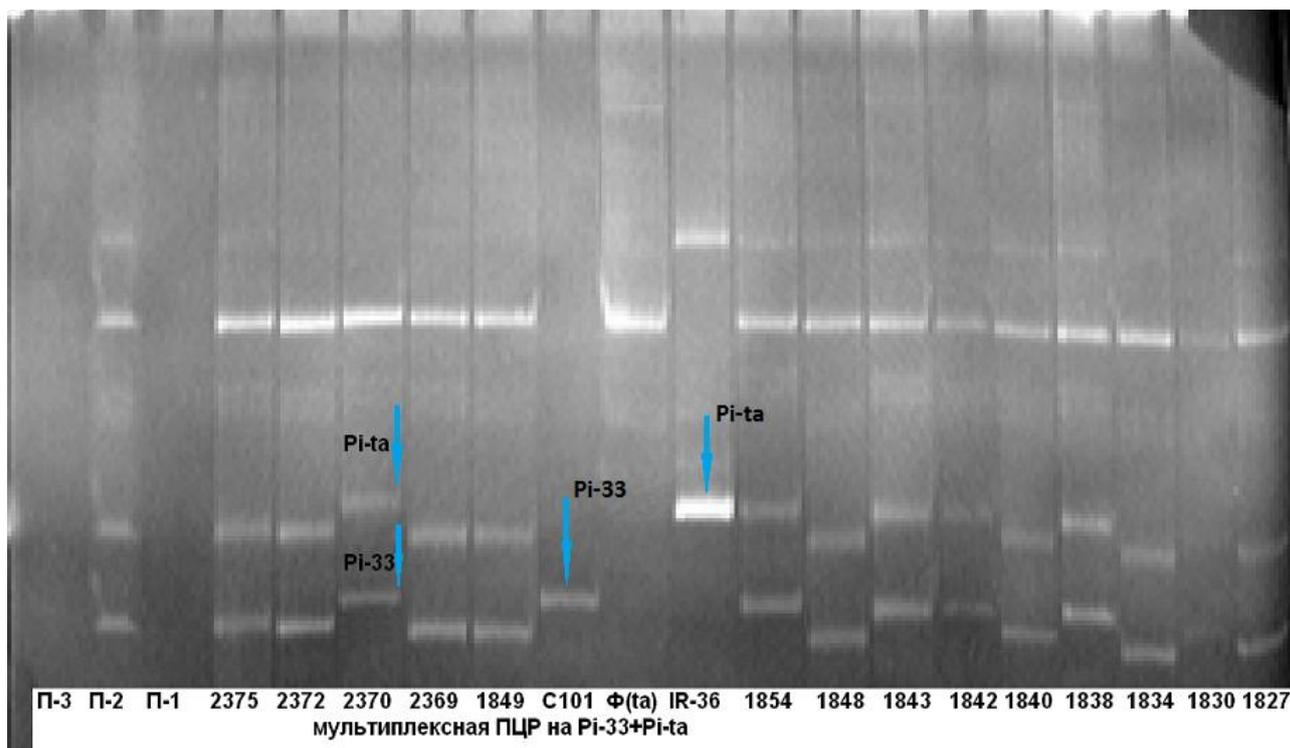


Рисунок 27 - Мультиплексная ПЦР генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi-33+Pi-ta*

Примечание: 1827.....2375 – гибридные растения; *С101*- линия *С101Лас*- 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. 28, 29)

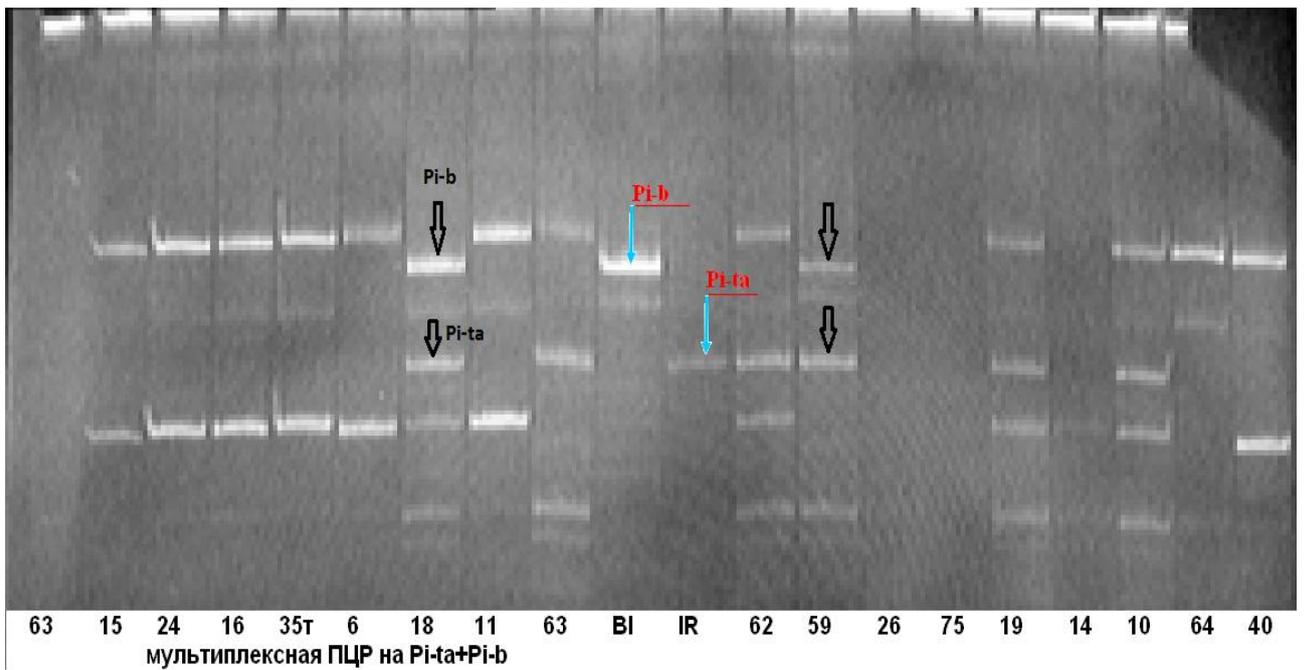


Рисунок 28 - Мультиплексная ПЦР, демонстрирующая гены устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta+Pi-b* в одном генотипе

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

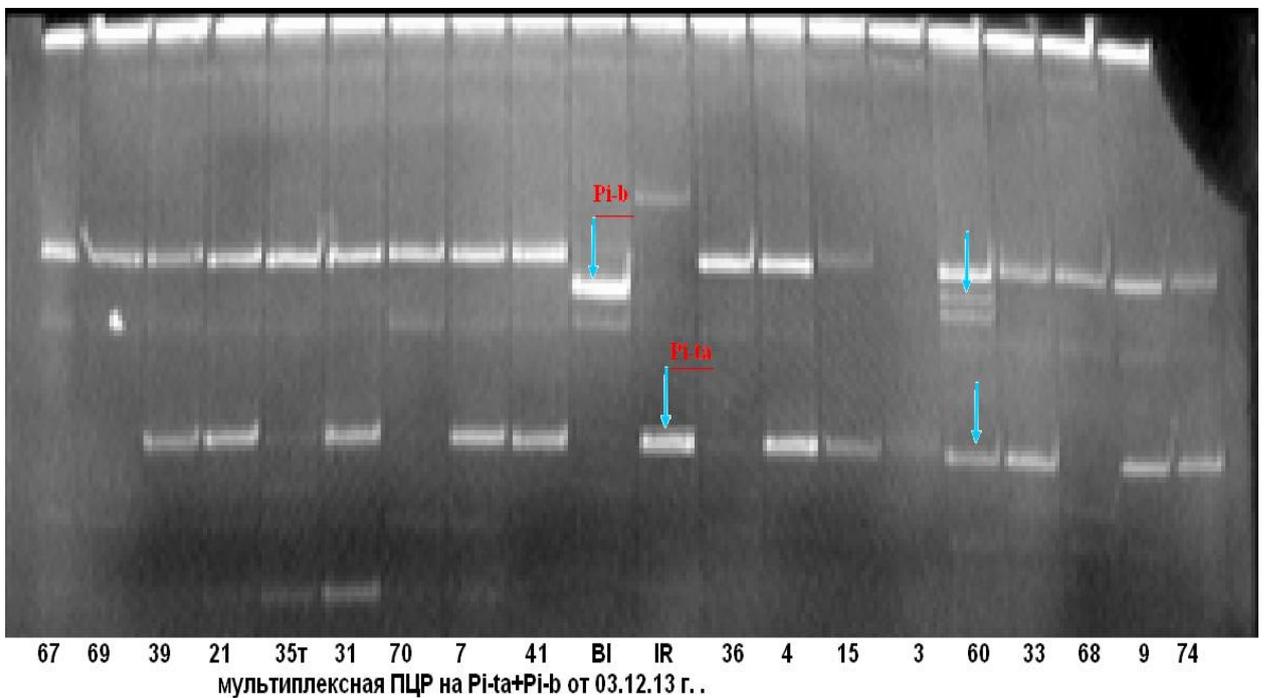


Рисунок 29 - Мультиплексная ПЦР, демонстрирующая гены устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta+Pi-b* в одном генотипе

Примечание: 67.....74 – гибридные растения; *B1*- линия B1-1- донор гена *Pi-b*; *IR*- линия IR-36-донор гена *Pi-ta*.

Из рисунков 28, 29 видно, что при постановке ПЦР в данном сочетании молекулярных маркеров амплифицируются оба фрагмента генов *Pi-ta* и *Pi-b* с одинаковой интенсивностью амплификации. Анализируемые гибридные образцы №№18, 59 и 60 несут доминантную аллель генов *Pi-ta* и *Pi-b*. Чёткость идентификации на электрофореграмме даёт возможность безошибочно определить наличие доминантных аллелей целевых генов.

Разработанная мультиплексная технология идентификации одновременно нескольких генов устойчивости к пирикулярриозу внедрена нами в систему маркерной селекции риса по созданию резистентных к патогену генресурсов риса.

В 2018 году на основе сорта Флагман размножены беккроссные самоопыленные линии риса BC₄F₈ с пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*, *Pi-b+Pi-ta*, *Pi-33+Pi-ta*. В беккроссных самоопыленных популяциях BC₅F₈, созданных на основе сорта Снежинка ПЦР-анализом с использованием разработанной нами мультипраймерной системы, идентифицированы растения с двумя генами устойчивости к пирикулярриозу *Pita+Pi-b*. Они в дальнейшем будут изучены в селекционном процессе по комплексу хозяйственно-ценных признаков.

Разработанные системы мультиплексной ПЦР по идентификации одновременно двух генов устойчивости к пирикулярриозу: *Pi-1+Pi-2*, *Pi-33+Pi-ta*, *Pi-ta+Pi-b* значительно сокращает затраты расходных материалов и время на выполнение анализа образцов с указанными пирамидированными генами резистентности к *P.oryzae*. Это позволяет повысить эффективность ДНК-маркерной селекции и 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 интрогрессированными и пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-40* получен обширный селекционный материал, который согласно схемам селекционного процесса изучался по хозяйственно-ценным признакам в ФГУЭСП «Красное» по предшественнику многолетние травы.

В селекционном питомнике ежегодно проходили оценку 160-269 образцов риса с различным сочетанием генов *Pi* (*Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-b*, *Pi-ta*, *Pi-40*), созданных на основе сортов Флагман, Снежинка, Боярин, а также крупнозёрных линий КП-163, КП-24-15, ВНИИР5242, ВНИИР 9678.

В контрольном питомнике 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 патогена *P.oryzae* Cav. Их характеристика представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Некоторые характеристики линий риса с генами *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* контрольного питомника в ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса в 2013-2015 гг.

Название линии/ происхождение	Веgetационный период, дней	Высота растения, см	Масса 1000 зёрен, г	ИРБ, %
Флагман (St)	115-117	90-95	26,7- 28, 4	54,6-70,5
Авангард (St)	115-117	105-110		0
1/ Флагман × В1-1 \ Флагман	105-110	75-80	25,4 – 26,8	20,0
2/ Флагман × ИР-36/ Флагман	110-115	80-85	27,8 – 29,3	12,6
3 /Флагман × С101-А-51	105-110	85-90	27, 3- 28,4	4,4

Продолжение таблице 9

Название линии/ происхождение	Веgetа- ционный период, дней	Высота растения, см	Масса 1000 зёрен, г	ИРБ, %
4 /Флагман х В1-1/ Флагман	105-115	75-80	24,4 – 25,2	23,3
5 /Флагман × В1-1/ Флагман	105-115	75-80	25,3 – 27,1	17,6
6 /Флагман × А-51/ Флагман	100- 105	85-90	27,5- 29,1	7,8
7 /Флагман х В1-1/ Флагман)	105-110	80-85	25,3 – 27,3	18,7
8 [Фл × ИР-36/ Фл] × [Фл × В1-1/ Ф]	112-117	85-90	27,7-29,3	16,4
9/Флагман × А-51/ Флагман	100-105	85-90	28,4-30,1	6,8
10/(Флагман х В1-1/ Флагман	105-110	80-85	25, 6 – 26, 6	17,6
11/Флагман х В1-1/ Флагман	110-115	80-85	25,5 – 26, 4	25,6
12 /Флагман × А-51/ Флагман	105-110	85-90	29,2- 30,4	12,3
13 /Флагман × С101 Лас/ Флагман	110-115	80-85	27,3-28,1	17,4
14/Флагман × С101 Лас/ Флагман	110-115	80-85	28,4-29,2	13,3
15/Флагман × С101 Лас/ Флагман	110-15	80-85	26,9-28,1	10,2
16/Флагман × С101 Лас/ Флагман	110-115	85-90	27,6-28,9	18,5
17/Флагман × С101 Лас/ Флагман	110-115	85-90	27,7-29,3	10,8
18 [(Флагман х С101Лас\ Флагман)] × [(Флагман × А-51 \ Флагман)]	115-117	80-85	26,4-27,1	7,5
19 [(Флагман х С101Лас\ Флагман)] × [(Флагман × А-51 \ Флагман)]	115-117	80-85	29,3-30,2	6,8
20 Флагман х В1-1/ Флагман	110-115	80-85	25,4 – 27,3	25,6

Продолжение таблицы 9

Название линии/ происхождение	Вегета- ционный период, дней	Высота растения, см	Масса 1000 зёрен, г	ИРБ, %
21 [(Флагман x С101Лас\ Флагман)] x [(Флагман x А-51 \ Флагман)]	115-117	80-85	27,8-29,2	5,6
22 [(Флагман x С101Лас\ Флагман)] x [(Флагман x А-51 \ Флагман)]	115-117	80-85	28,8-30,1	6,4
23 Флагман x IR-36/ Флагман	118-120	75-80	29,8-30,1	15,6
24 [(Флагман x IR- 36\ Флагман)] x [(Флагман xС101) \ Флагман]	115-117	80-85	28,6-30,1	12,3
25 [(Флагман x IR- 36\ Флагман)] x [(Флагман xС101) \ Флагман]	115-117	80-85	28,7- 30,3	11,7
26 [(Флагман x IR- 36\ Флагман)] x [(Флагман xС101) \ Флагман]	115-117	85-90	23,2- 25,4	11,5
27 [(Флагман x IR- 36\ Флагман)] x [(Флагман xС101) \ Флагман]	115-117	85-90	23,5- 25,5	10,8
28 Флагман x В1-1\ Флагман	110-115	85-90	26,6- 29,3	27,5
29 Флагман x А-51/ Флагман	115-120	85-90	28,3- 30,3	12,1
30 Флагман x IR-36\ Флагман	115-117	77,0- 80,0	30,1-30,4	15,6
31 Флагман x С101Лас/ Флагман	110-115	85-90	27,3-28,3	17,8

Анализируя данные таблицы, видно, что полученные растения изученных селекционных образцов адаптированы к условиям выращивания на юге России. Они имеют оптимальный вегетационный период (105-120

дней) с высотой растений от 75 до 95 сантиметров, устойчивы к краснодарской популяции *P. oryzae*. Некоторые формы имеют слегка пониклую компактную метёлку, а некоторые – свечеобразную, компактную. Масса 1000 зёрен от 23 до 30 и более граммов.

В конкурсном сортоиспытании первого, второго и третьего года ежегодно изучали по морфометрическим показателям и устойчивости к пирикулярриозу от 6 до 12 сортообразцов. Характеристика некоторых из них представлена в таблице 10.

Таблица 10 - Характеристика сортов и линий риса с генами устойчивости к пирикулярриозу конкурсного сортоиспытания 2016-2018 гг. в ФГУЭСИ «Красное» ВНИИ риса.

Линия/ сорт	Уро- жай- ность, т/га	Веgetа- ционн ^{ый} период, дней	Высо- та расте- ния, 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 развитие болезни; St - стандарт.

Данные таблицы показывают, что растения изученных селекционных линий и сортообразцов адаптированы к условиям выращивания на юге России. Они имеют оптимальный вегетационный период (115-120 дней), 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 (рис.30, приложения 15, 16, 17, 18). Сорта риса Ленарис (рис. 31, 32, приложение 10, 11, 12) и Капитан (рис.33, 34, приложения 13, 14) переданы на государственное сортоиспытание в 2018 году. Семенной материал данных сортов передан в коллекцию исходного материала ВНИИ риса (Акты прилагаются, приложение 12, 18).

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*.



Рисунок 30 - Сорт риса Альянс с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*



Рисунок 31 - Сорт риса Ленарис с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*



Рисунок 32 - Делянка сорта Ленарис, ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса, 2018



Рисунок 33 - Сорт риса Капитан с геном устойчивости к пирикулярнозу *Pi-ta*.



Рисунок 34 - Делянка сорта Капитан, ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса, 2018

На основе сорта Снежинка в конкурсном сортоиспытании третьего года (Зеленский Г.Л.) отобрано три линии: КПу-159-14, КПу-160-14 и КПу-161-14 с геном Pi-2, которые имеют положительные показатели по хозяйственно-ценным признакам, а также устойчивы к краснодарской популяции *Pyricularia oryzae* Cav. Лучшая из них будет передана на государственное сортоиспытание в 2019 году.

В производственном испытании в ФГУЭСР «Красное» ВНИИ риса в 2017 году сорт риса Альянс показал урожайность 9,1 т/га и высокие технологические свойства (неполегаемость, устойчивость к пирикулярриозу). При производственном испытании в 2018 году на площади 0,05 га сорта риса Ленарис показал высокую технологичность, неполегаемость и возможность прямой уборке 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. Производственные испытания также свидетельствуют о высокой технологичности сорта Капитан, неполегаемости и возможности 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 11). При этом рентабельность составила 130 %, что на 11 % выше, чем у стандартов Флагман (Краснодарский край) и Южанин (Ростовская область).

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 норму внесения.

Таблица 11 – 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 ФГУЭСП «Красное» (Краснодарский край)					
Флагман, стандарт	8,1	60000	69600	89	-
Альянс	9,1	60000	85600	142	16000
Ленарис	10,6	60000	109600	182	40000
Производственное испытание ОС «Пролетарское» (Ростовская область)					
Южанин, стандарт	7,49	60000	59840	119	-
Капитан	8,13	60000	78210	130	9000

Ежегодно с 2010 - 2015 гг. совместно с лабораторией защиты риса института в инфекционном питомнике (карта 14 чек 1) и с 2016-2018 гг. в полевых условиях по предшественнику многолетние травы на рисовой оросительной системе ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса проводился фитопатологический тест полученных линий риса с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b* (приложение 1, 2; Дубина, 2012).

В инфекционном питомнике ВНИИ риса инокуляцию растений проводили культурой гриба при искусственном заражении 10^5 конидий/мл, что соответствует 10-14 спорам в поле зрения микроскопа. В качестве восприимчивого контроля использовали сорта риса Волгоградский (рис.35) и Победу 65, а устойчивого контроля - сорт риса

Авангард. Заражали растения в фазу кущения, опрыскивая суспензией из пульверизатора, в расчете пол миллилитра на одно растение.



Рисунок 35 - Сорту риса Волгоградский- стандарт

Сорта риса Волгоградский и Победа 65 поразились на 100 % грибом *Pyricularia oryzae* Cav. На листьях отмечались типичные для заболевания пятна. Узлы стебля и метёлка были также поражены.

Инокулировали также донорные и реципиентные формы, использованные в программе насыщающих скрещиваний (рис. 36-41).

На рисунке 36 представлены результаты фитопатологического теста материнской высокопродуктивной формы риса – сорт Флагман. Заражали растения в фазу кущения, опрыскивая суспензией из пульверизатора, в расчете 0,5 мл на одно растение.



Листовая форма поражения



Метельчатая форма поражения

Рисунок 36 - Сорту риса Флагман (материнская форма)

Учёт степени поражения растений проводили на 14 день после инокуляции. На сорте Флагман отмечено поражение грибом *Pyricularia oryzae* Cav. тремя формами: 33,3 % (листовая форма), 62,8 % (метельчатая), 35,7 % (узловая).



Рисунок 37 - Линия риса С101 Лас - донор генов *Pi-1*, *Pi-33*; 2,2% (метельчатая форма), 3,3 % (листовая форма) поражения грибом *Pyricularia oryzae* Cav.



Рисунок 38 - Линия риса С101 А-51 - донор гена *Pi-2*; 0% поражения грибом *Pyricularia oryzae* Cav.

На рисунках 39-41 представлены результаты фитопатологического тестирования созданных линий риса с пирамидированными генами устойчивости к пирикуляриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*.



Рисунок 39 - Линия 5 с геном *Pi-1*. При фитопатологическом



Рисунок 40 - Линия 6 с геном *Pi-2* - 4,4 % (листовая форма)



Рисунок 41 - Линия 9 с геном *Pi-33* - 16,7% (листовая форма),

тестировании 18,9 % поражения грибом 18,9 % (метельчатая) (листовая форма), 17,8 % *Pyricularia oryzae* Cav. поражения грибом (узловая форма), 13,3 % *Pyricularia oryzae* (метельчатая форма) Cav. поражения *P. oryzae* Cav.

Таким образом, в период с 2007 года с помощью современных методов молекулярного маркирования в сочетании с традиционной селекцией в короткие сроки получены линии риса, в генотипе которых имеются интрогрессированные и пирамидированные гены устойчивости к пирикулярриозу. Они могут служить хорошими донорами устойчивости к заболеванию и выступать в качестве родительских форм.

Устойчивые к пирикулярриозу сорта риса необходимы в производстве, а также для повышения конкурентоспособности и импортозамещения. Они позволят увеличить урожайность и валовые сборы зерна риса, избежать эпифитотий развития болезни. При этом сократится применение химических средств защиты, что снизит фунгицидную нагрузку на экосистему и позволит избежать загрязнения зерновых экосистем и получать экологически чистую сельхозпродукцию.

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, получения всходов, а также при созревании зерна и его уборке (Костылев и др., 2004).

Эффект низких температур проявляется на различных стадиях роста растений риса. Низкие температуры снижают энергию роста семян, уменьшают фотосинтетическую активность, вызывая обесцвечивание

листьев, уменьшают высоту растений, вызывают дегенерацию колосков метелки, задержку выметывания, снижение продуктивности колосков метелки, неравномерность вызревания зерновок и низкое качество зерна (Скаженник и др., 2012).

В связи с этим актуальным является создание генетической плазмы риса, толерантной к пониженным температурам в период образования всходов, не снижающей полевую всхожесть и обладающей повышенной силой роста семян.

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). Применение ДНК технологий и ПЦР-анализов позволило существенно расширить возможности традиционной селекции растений риса в данном направлении (Скаженник и др., 2014). Донорный материал к данному стрессору получен в рамках Международного Консорциума по исследованиям риса в странах с умеренным климатом.

Идентификацию количественных локусов холодостойкости (QTLs): qPSST-3, qPSST-7 и qPSST-9) в изучаемых гибридных растениях проводили ПЦР-анализом с использованием микросателлитных маркеров, тесно сцепленных с целевыми локусами: RM 231; RM 24545; RM 1377; RM 569 (Suh et al., 2010).

В качестве положительного контроля использованы холодостойкие стандарты: сорта Кубань 3, Odaebuyeo и Jinbubuyeo.

Апробация вышеуказанных молекулярных маркеров показала, что наиболее эффективными являются RM24545, RM569, местоположение которых определено на коротком плече 9 и 3 хромосом, соответственно. С их помощью получены четкие электрофоретические профили для каждого исследуемого образца риса (Скаженник и др, 2016, 2017).

Пример, полученных профилей с использованием данных SSR-маркеров, представлен на рисунке 42, 43. При сравнении их ДНК-профилей

выявлен полиморфизм микросателлитных последовательностей ДНК исследованных образцов риса.

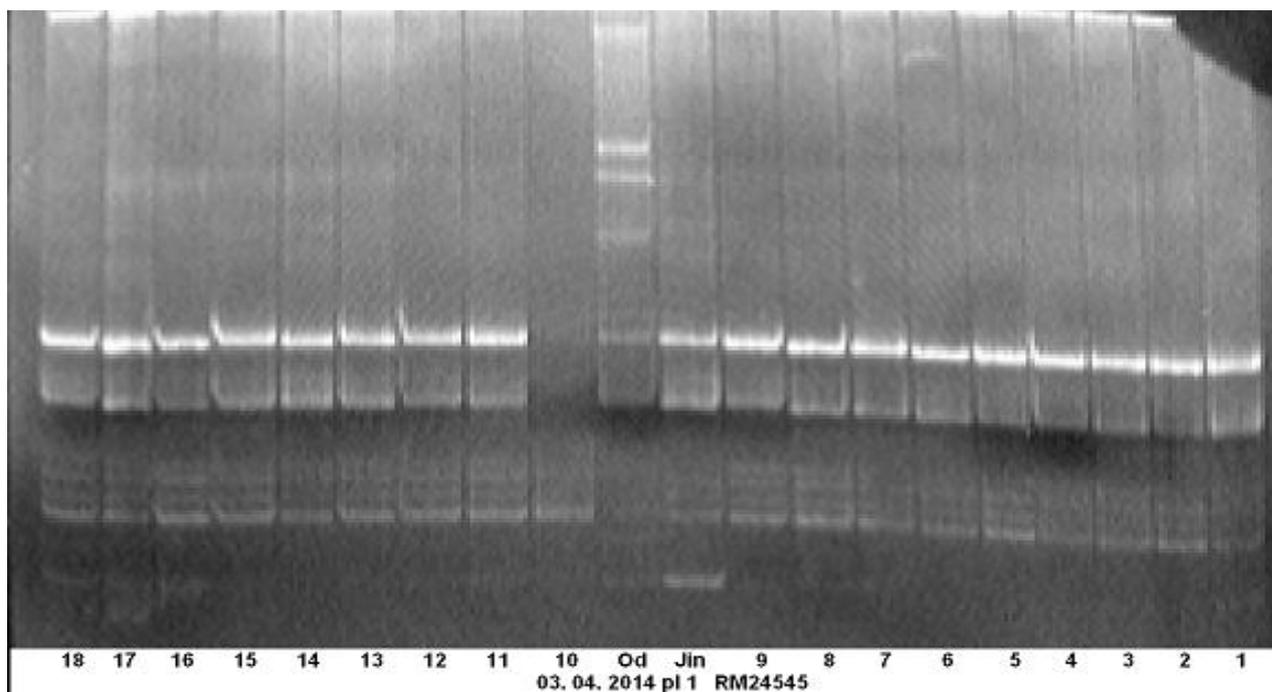


Рисунок 42 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM24545

Примечание: 1-18 дигаплоидные растения риса; Od - Odaebueo сорт-донор на холодостойкость, Jin- Jinbubueo сорт-донор на холодостойкость.

Из рисунка видно, что у гибридных растений под номерами 16, 17 и 18 присутствует специфичный ПЦР-продукт гена холодостойкости как у сорта-донора Jinbubueo.

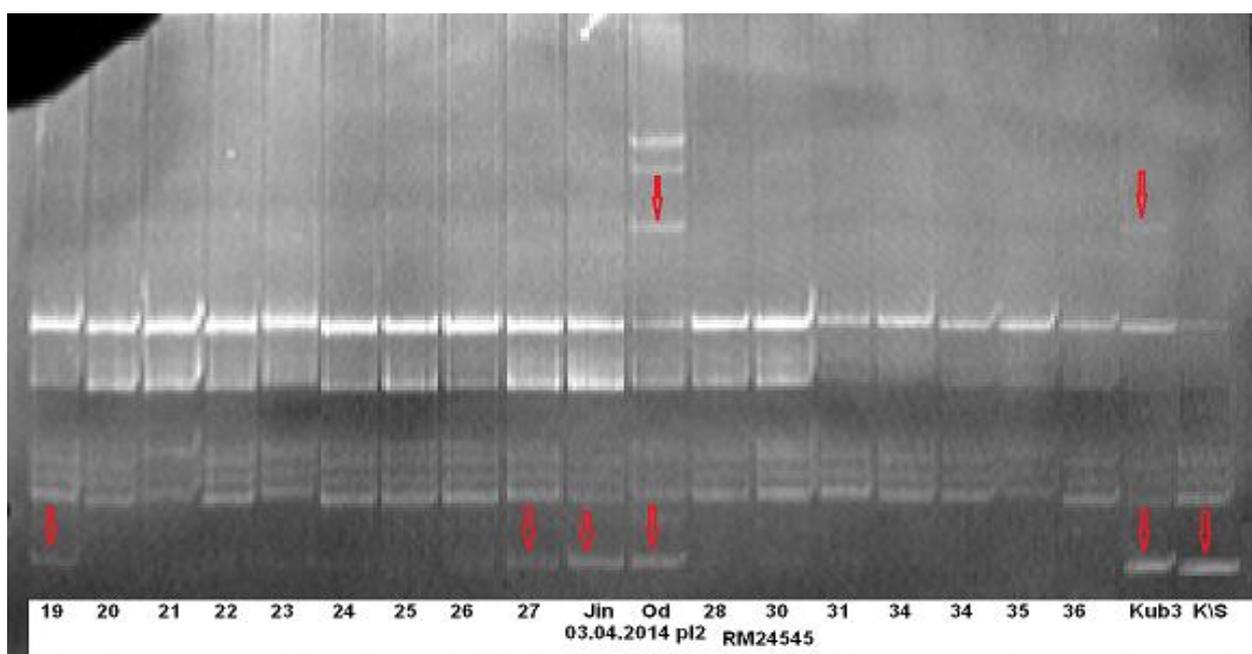


Рисунок 43 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 24545

Примечание: 19-36 дигиплоидные растения риса; Od – Odaebueo сорт - донор, Jin- Jimbubueo 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 Jimbubueo, а российский сорт Кубань 3 в генотипе имеет аналогичные аллели устойчивости к холоду как у сорта-стандарта Odaebueo.

На рисунке 44 представлены результаты ПЦР-анализа BC_1F_1 гибридов риса, полученные нами в рамках программы Консорциума стран с умеренным климатом.

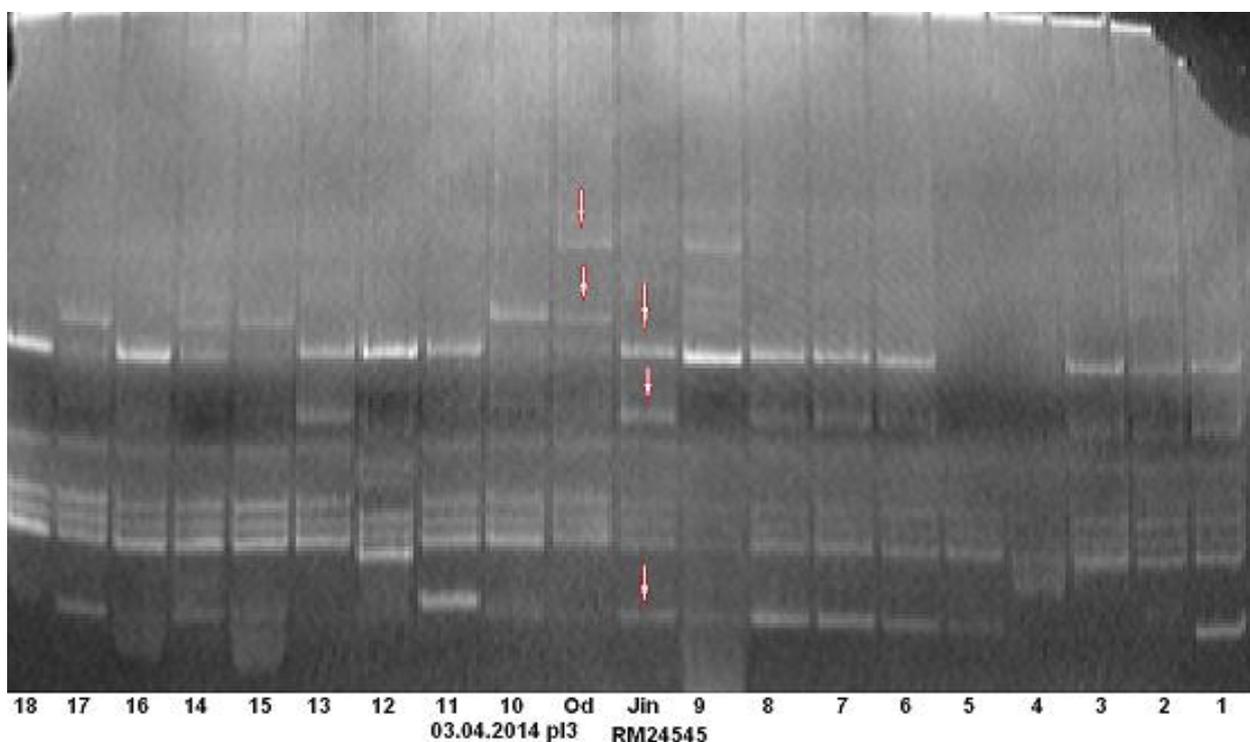


Рисунок 44 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 24545

Примечание: 1-18 гибридные растения риса BC_1F_1 популяции; Od – Odaebueo сорт - донор, Jin- Jimbubueo сорт-донор, Kub3 – отечественный сорт риса Кубань 3, K/S- гибридная комбинация Кубань 3/Северный.

Из рисунка видно, что гибридное растение BC_1F_1 популяции под номером 2 (Odaebueo / Jimbubueo // Jimbubueo) имеет доминантную аллель целевого гена как у сорта-стандарта Odaebueo, а гибридные растения 6 (Новатор/ Jimbubueo // Новатор), 7 (Новатор / Jimbubueo // Jimbubueo), 8

(Jinbubyeo / Новатор // Новатор) и 11 (Сerpантин / Jinbubyeo // Jinbubyeo) как у сорта –стандарта Jinbubyeo.

На рисунке 45 представлены результаты апробации SSR-маркера RM569.

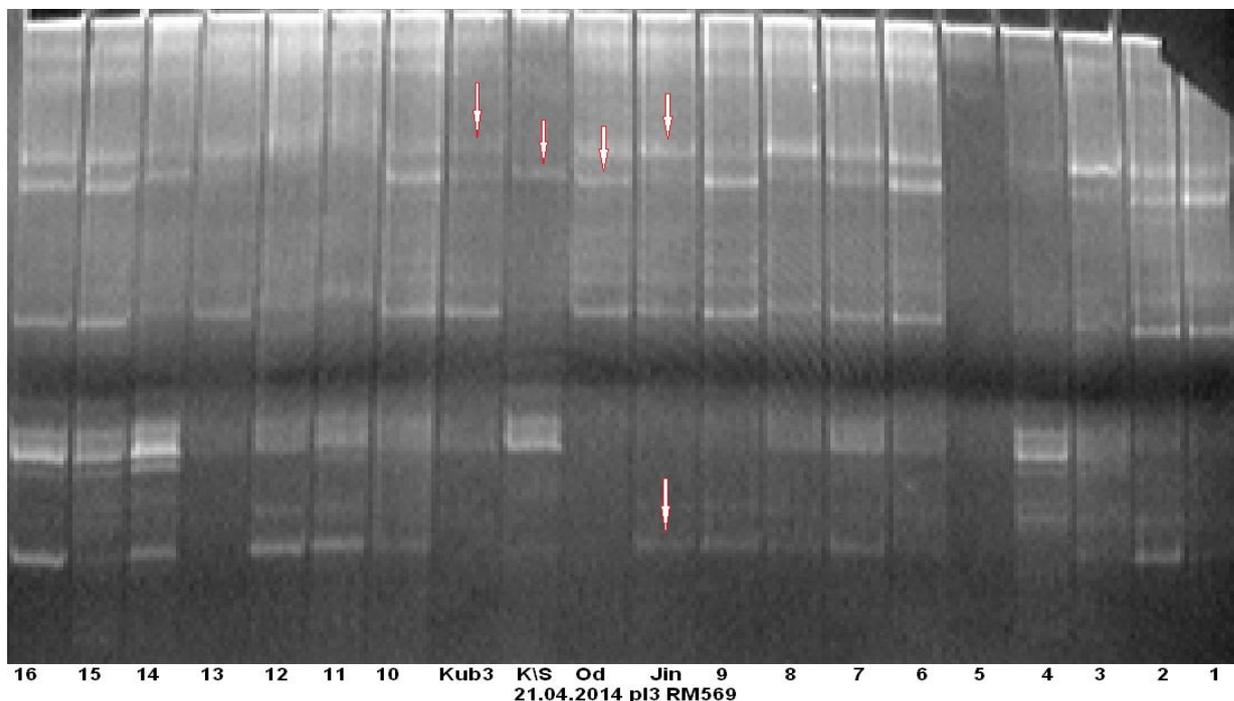


Рисунок 45 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 569

Note: 1- 16 – гибридные растения; Od - Odaebueo (st), Jin- Jinbubyeo (st), Kub3 – сорт риса Кубань 3, K/S- гибридная комбинация Кубань 3/Северный.

Из электрофореграммы видно, что гибридные растения под номерами 1,13 (Jinbubyeo / Serпантин // Serпантин; Кубань 3/Северный) и сорт Кубань 3 имеют генотип как у холодостойкого сорта – донора Odaebueo, а гибридные растения № 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 18 – как у сорта-донора Jinbubyeo; остальные гибридные растения (6,15,16) имеют смешанный спектр, который получился в результате серий скрещиваний отечественных сортов с сортами-донорами Odaebueo, Jinbubyeo, а также с российскими сортами Кубань 3 и Северный. Не обнаружено донорных аллелей генов холодостойкости у гибридных растений 4 и 5.

На рисунках 46 – 50 представлены результаты микросателлитного анализа ДНК гибридных растений BC_1F_2 – популяции.

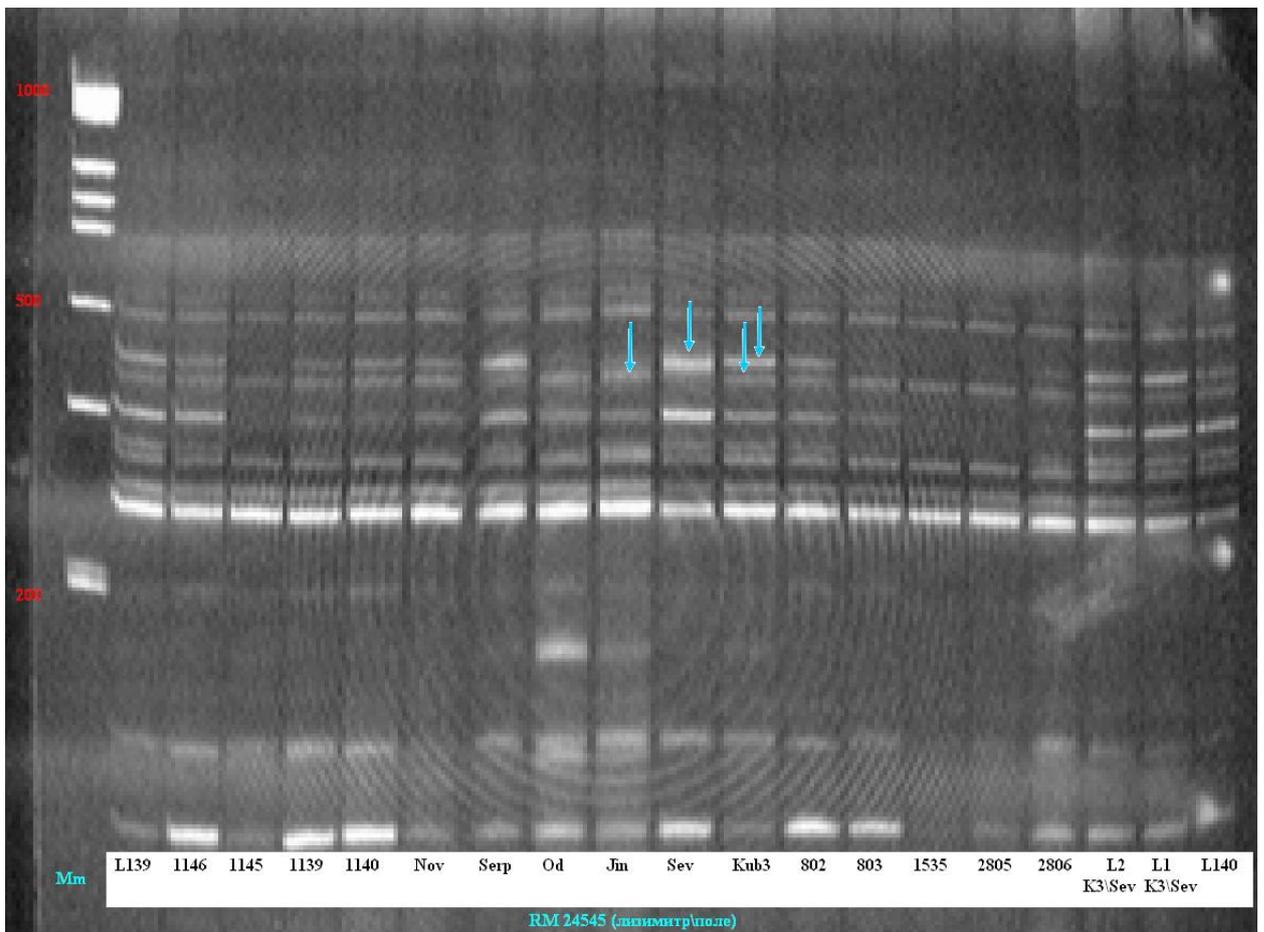


Рисунок 46 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 24545

Образец № 803 имеют микросателлитный профиль как у сорта – стандарта Jinbubyeo и Odaebuyeo, образцы №№ L1, L2, L140, L139, 1146 имеют микросателлитный профиль как у сорта – стандарта Кубань 3. Образцы №№ Северный, Новатор несут аллель холодостойкости как у сорта риса Кубань 3.

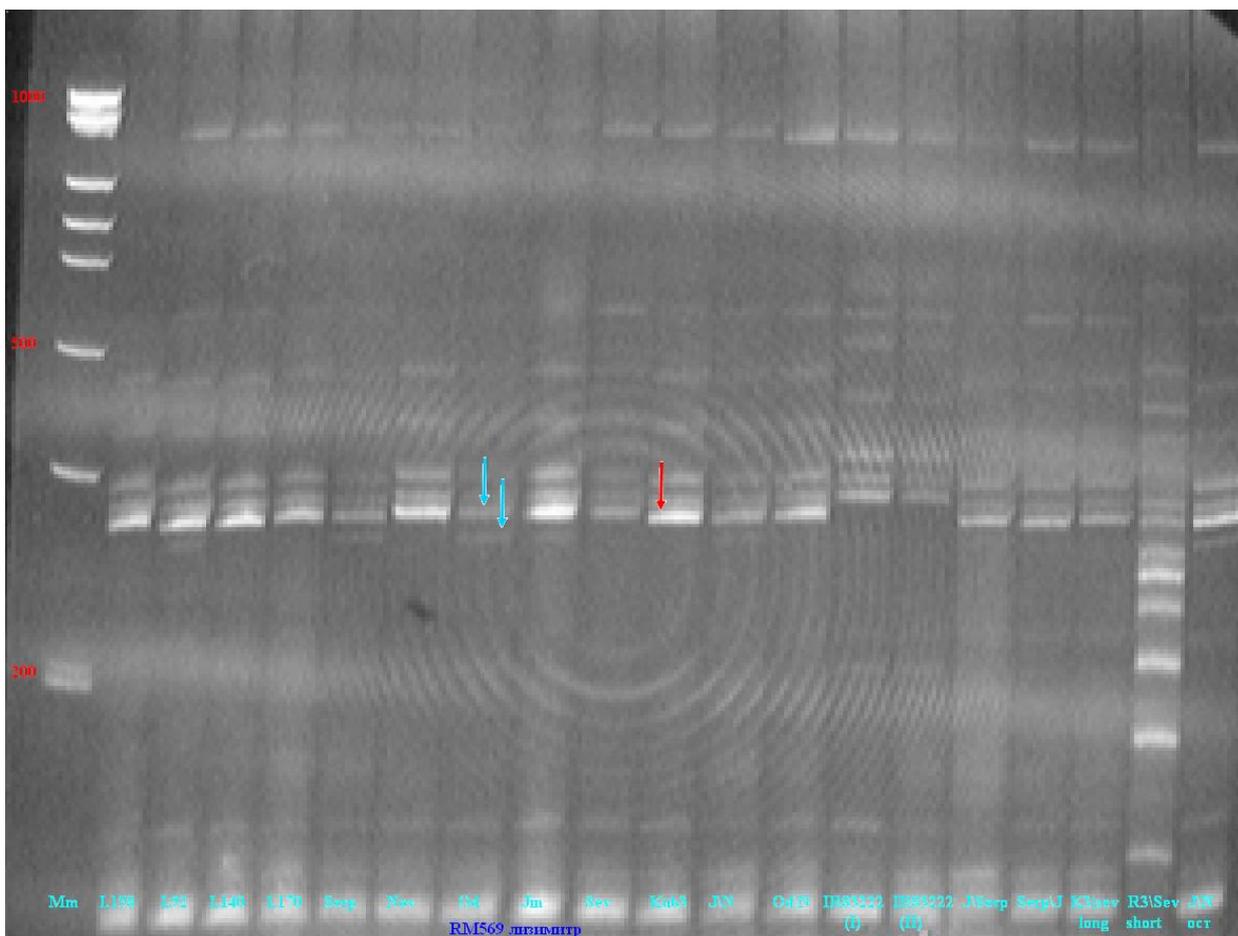


Рисунок 47 - Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 569

Образцы L92, Новатор, Odaebueo /Новатор имеют аллель сорта-донора Odaebueo. Образцы L158, L170, Кубань3, Jinbubueo/Серпантин имеют одинаковый микросателлитный ДНК-профиль с сортом –донором Jinbubueo. Образцы IR 83222 отличаются от микросателлитных профилей стандартов и не несут аллели холодостойкости.

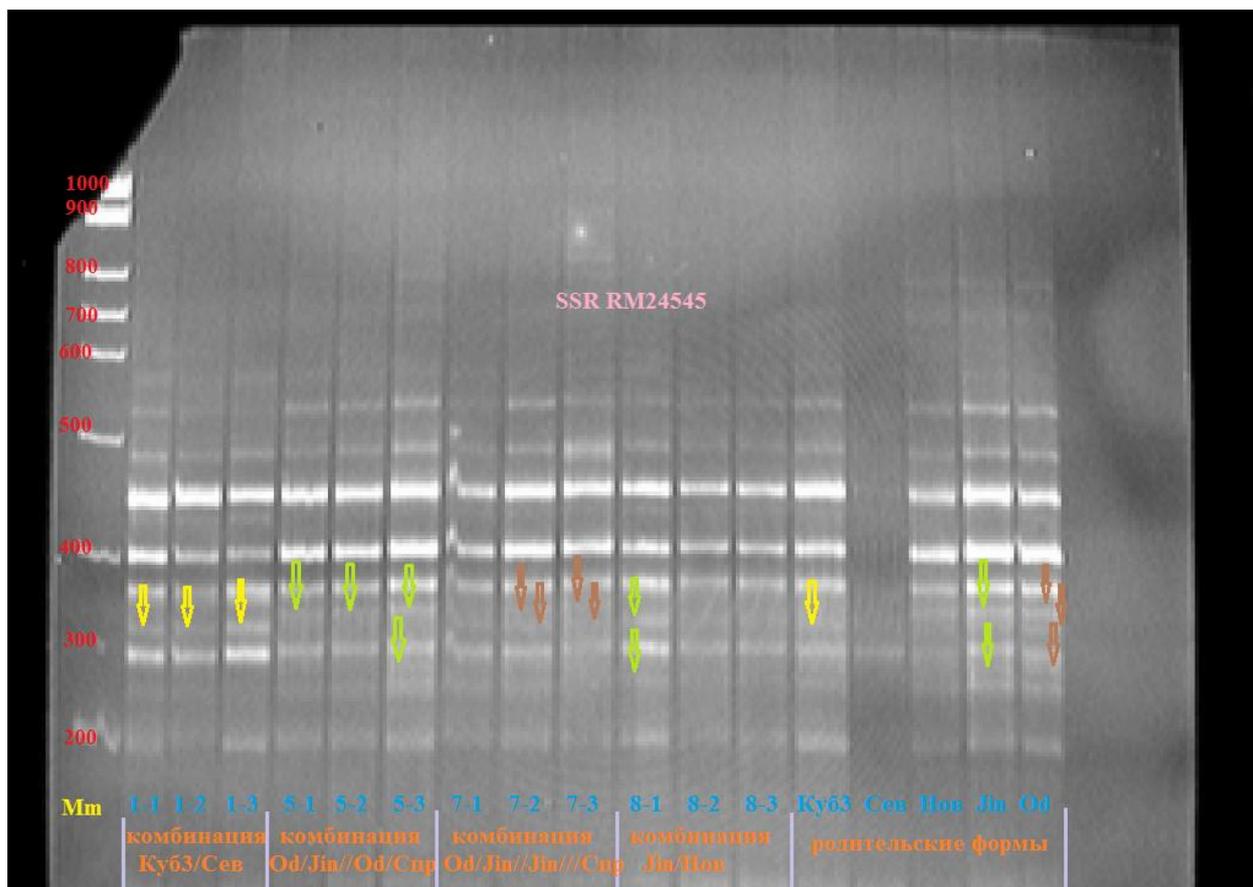


Рисунок 48 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24545.

В комбинации Кубань3/Северный – все три образца имеют ДНК-профиль сорта Кубань3. В комбинации Od\Jin\Od\Спринт – образец 5-3 имеет ДНК-профиль Odaebueo, образцы 5-1- и 5-2 – ДНК профиль Jinbubueo. В комбинации Od\Jin\ Jin \Спринт – образцы 7-2 и 7-3 имеют ДНК-профиль Odaebueo , образец 7-1 – ДНК профиль Jinbubueo. В комбинации Od\Jin\ Jin \Спринт – образцы 7-2 и 7-3 имеют ДНК-профиль Odaebueo , образец 7-1 – ДНК профиль Jinbubueo. В комбинации Jin\ Новатор – образец 8-1 имеет ДНК-профиль Jinbubueo, остальные можно выбраковать.

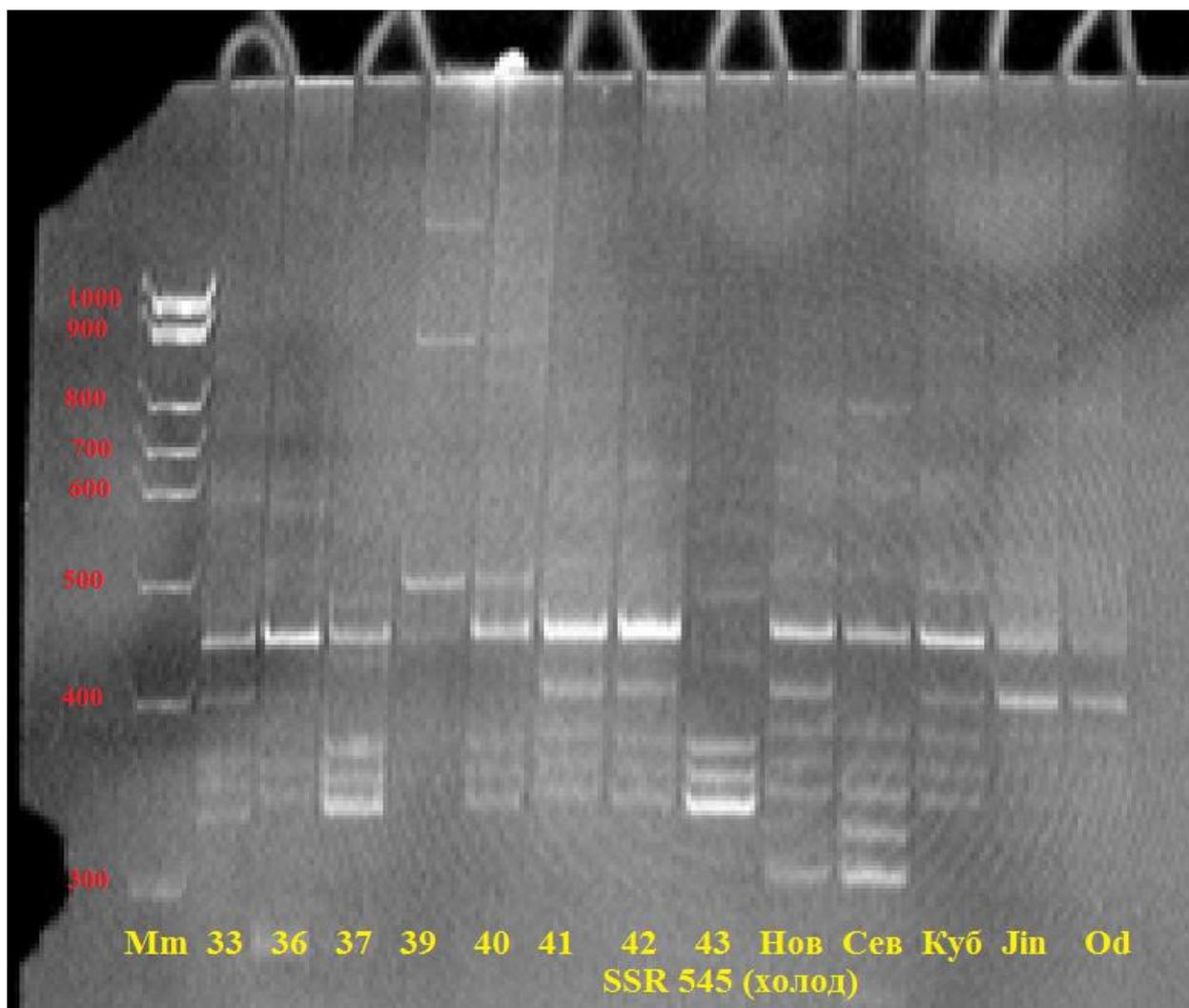


Рисунок 49 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24545.

Образцы №№ 33, 41, 42 имеют ДНК-профиль как у сортов-доноров Jinbubyeo, Odaebuyeo и Кубань 3. №№ 36, 37, 40 – имеют ДНК профиль сорта отечественной селекции – Северный. Остальные образцы подлежали браковке.

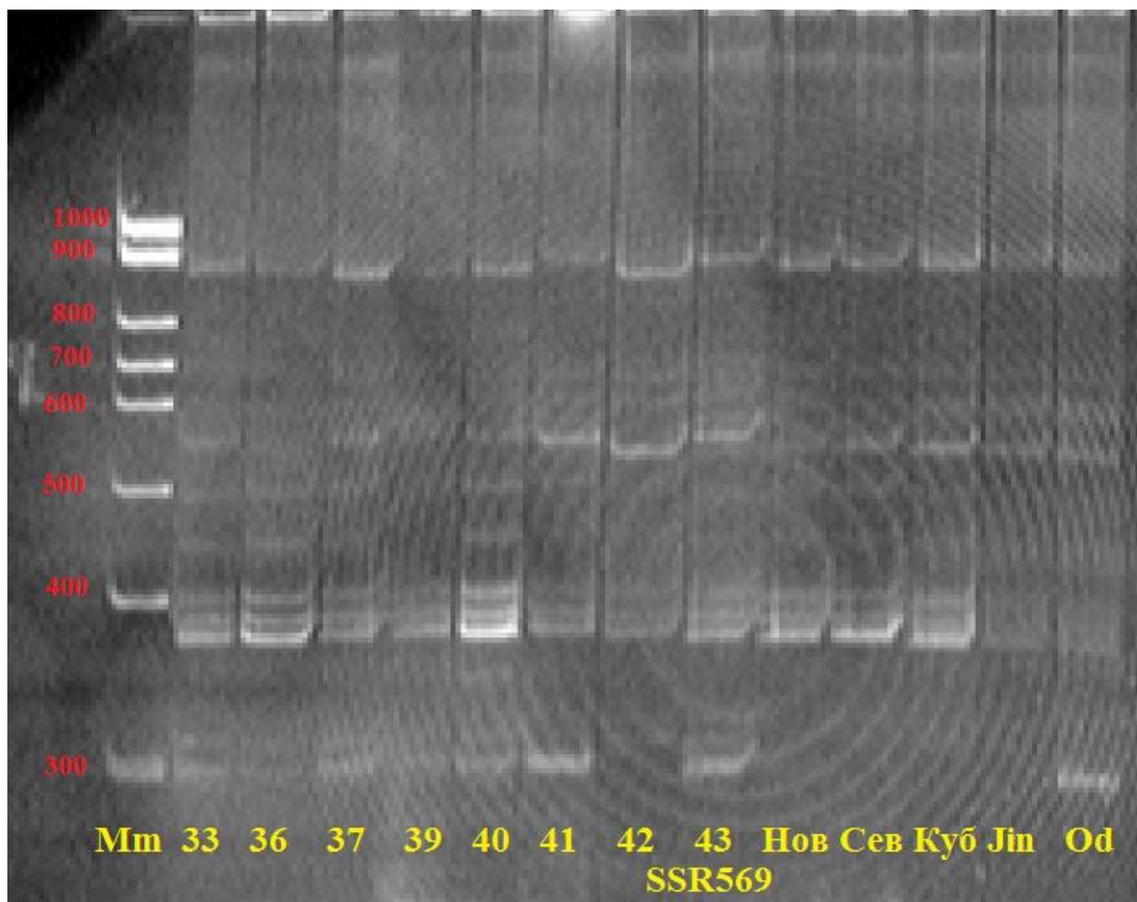


Рисунок 50 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 569.

Образцы №№ 33, 37, 41, 43 имеют ДНК-профиль как у сорта –донора Odaebueo. Образцы 36, 39, 40 - имеют ДНК-профиль как у сорта –донора Jinbueo. Остальные гибридные растения были выбракованы.

Для повышения технических условий и ускорения получения данных анализа ДНК экспериментальных растений риса нами был апробирован метод визуализации продуктов ПЦР в 2%-ном агарозном геле.

При сравнении SSR-профилей в агарозном геле полиморфизм микросателлитных последовательностей ДНК выявлен также у праймерных пар RM 24545 и RM569. Результаты апробации представлены на рисунках в приложениях 24-36.

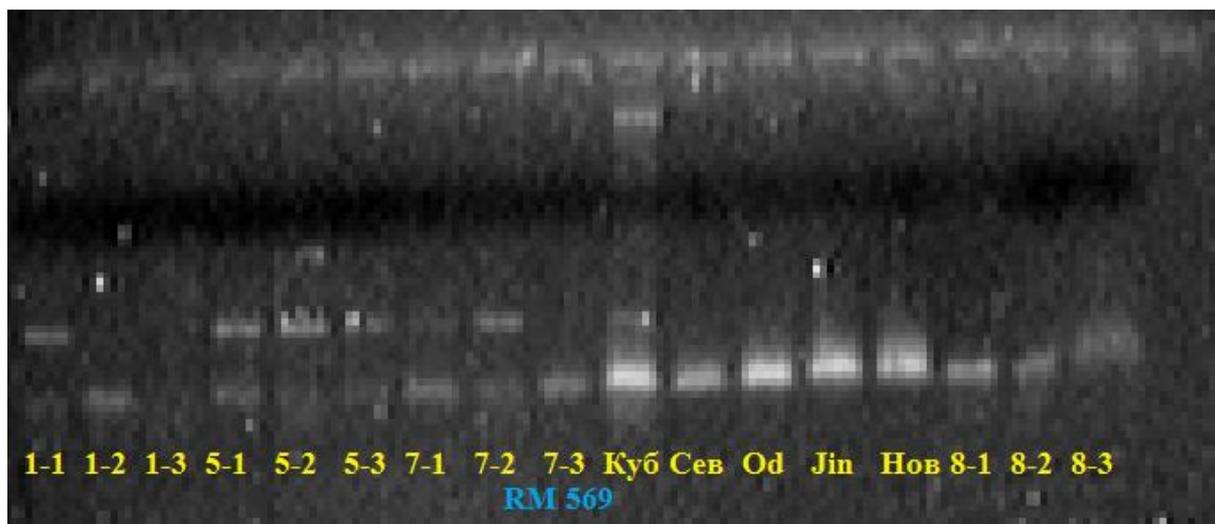


Рисунок 51 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24569

В комбинации Кубань3/Северный –образец 1-1 имеет ДНК-профиль сорта Кубань3, 1-2 и 1-3 -ДНК-профиль родительской линии Северный.

В комбинации Od\Jin\Od\Спринт – все три образца гетерозиготы по локусу RM 24569. В комбинации Od\Jin\ Jin \Спринт – образцы 7-1 и 7-2 – гетерозиготы, а 7-3 - имеет ДНК-профиль Odaebueo в гомозиготном состоянии. В комбинации Jin\ Новатор – образцы 8-1 и 8-2 гомозиготы и имеют ДНК-профиль Jinbubueo, а образец 8-3 был выбракован.

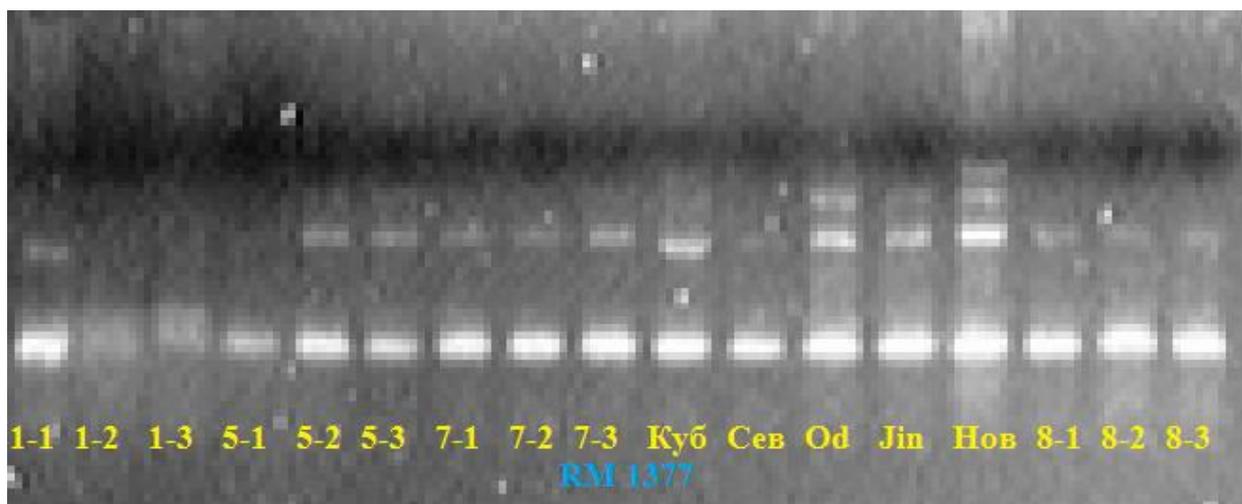


Рисунок 52 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 1377

В комбинации Кубань3/Северный –образец 1-1имеет ДНК-профиль родительской формы Кубань 3, а образцы 1-2 и 1-3 имеют ДНК-профиль сорта Северного. В комбинации Od\Jin\Od\Спринт – образцы 5-2 и 5-3 несут донорную аллель, а образец 5-1 – гетерозиготы по данному локусу. В комбинации Od\Jin\ Jin \Спринт – все три образца были гомозиготы по анализируемому локусу и перданы в селекционный процесс.

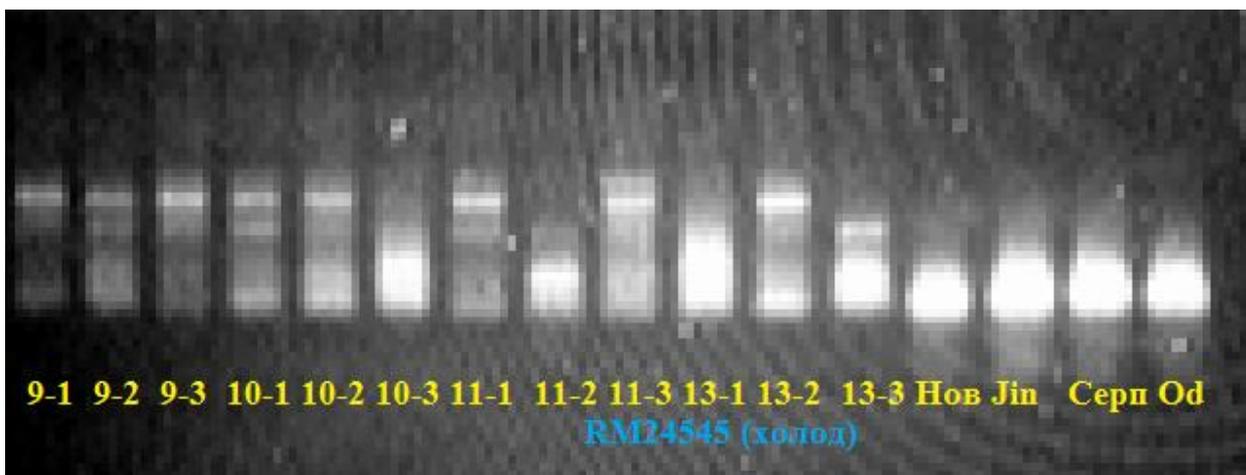


Рисунок 53 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24545

В комбинации Jin\Серпантин – образец 11-2 и в комбинации Od\Новатор – образец 13-1несут донорную аллель, остальные анализируемые гибридные образцы были выбракованы.

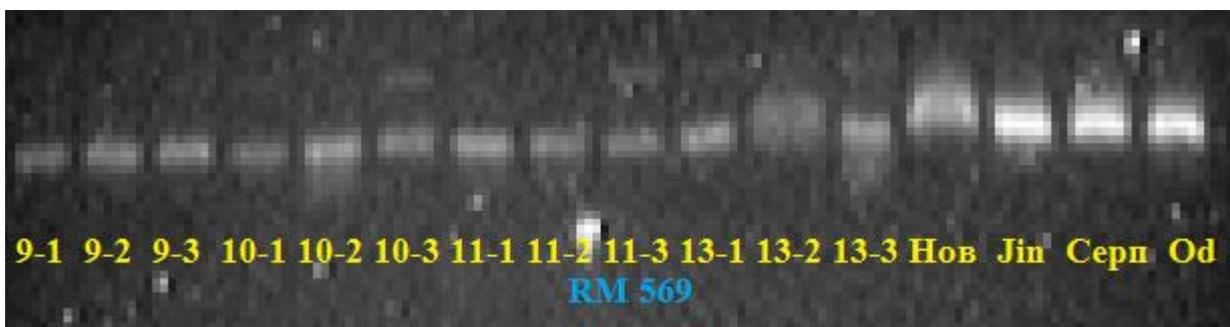


Рисунок 54 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24569

В комбинации Серпантин/Jin короткий – все три образца имели в генотипе донорную аллель. В комбинации Серпантин/Jin высокорослый – образец 10-3 и в комбинации Jin\Серпантин – образец 11-3 были выбракованы. В комбинации Od\Новатор по результатам ПЦР-анализа был отобран образец 13-2, остальные - выбракованы.

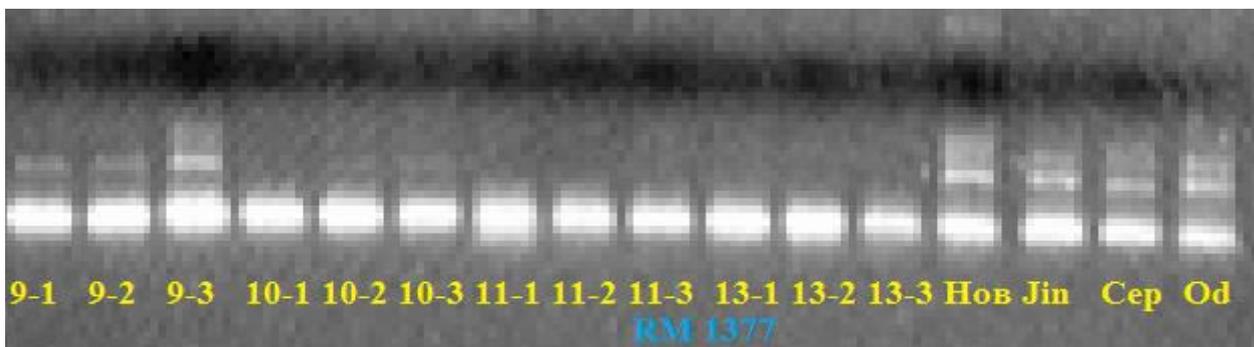


Рисунок 55 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 1377

В комбинации Серпантин/Jin короткий – по результатам анализа ДНК гибридных растений был выбракован образец 9-3. В комбинации Серпантин/Jin высокорослый – все три образца переданы в селекционный процесс для дальнейшего изучения по хозяйственно-ценным признакам. В комбинации Jin\Серпантин – образец 11-3 был выбракован.

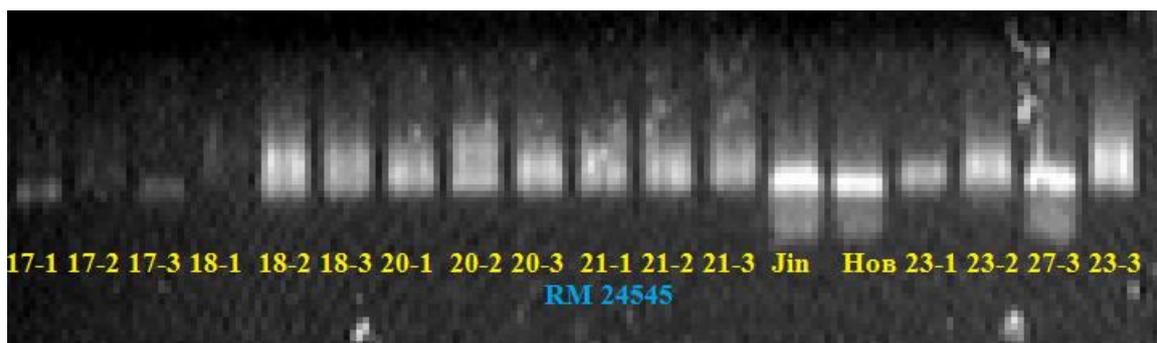


Рисунок 56 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24545

В комбинации Jin/Новатор L170 результаты анализа ДНК анализируемых гибридных растений показали, что в их генотипе отсутствует донорный аллель и они были выбракованы. В комбинации Jin/Новатор L176

короткий (удвоенные гаплоидные линии) все образцы были отобраны для дальнейшего изучения. В комбинации Новатор / Jin L139 образец 20-2 был выбракован. В комбинации Новатор/ Jin L140 – все образцы отобраны для изучения по хозяйственно-ценным признакам.

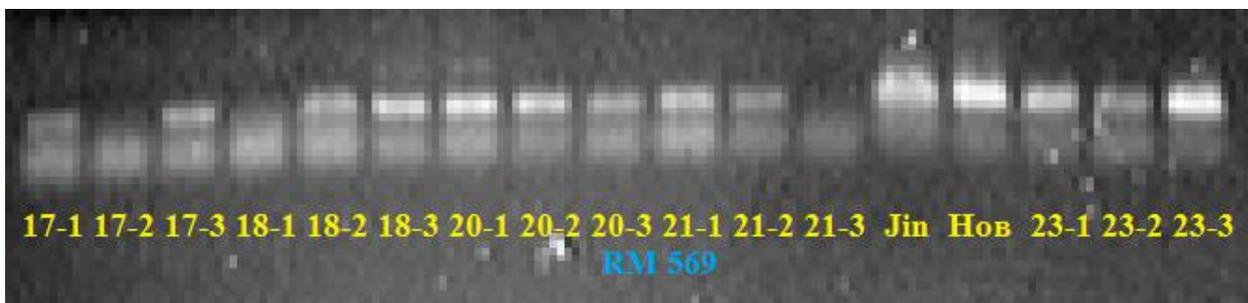


Рисунок 57 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24569

В комбинации Jin/Новатор L170 по результатам анализа ДНК гибридных растений риса был выбракован образец 17-2. В комбинации Jin/Новатор L176 короткий для дальнейшего изучения были отобраны все растения, кроме образца 18-1. В комбинации Новатор / Jin L139 также были отобраны все растения. В комбинации Новатор/ Jin L140 – был выбракован образец 21-3.

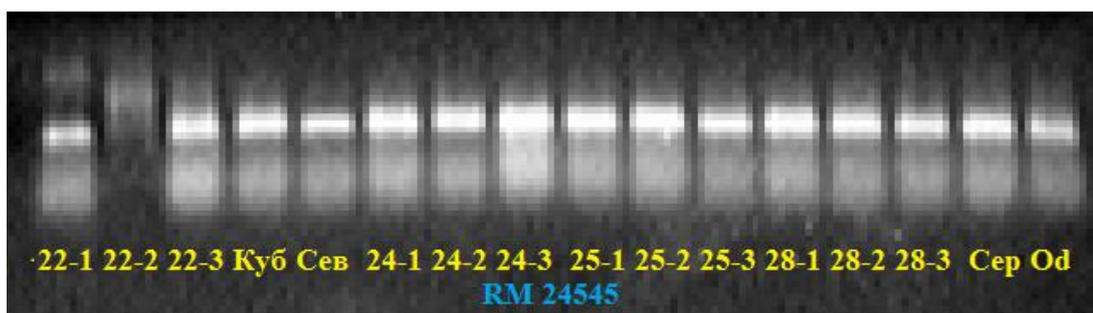


Рисунок 58 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24545

В комбинации Кубань 3/Северный L7 – из всех проанализированных гибридных растений образец 22-2 был выбракован. В комбинации Новатор / Jin/ Новатор короткий 1145 – были отобраны все растения.

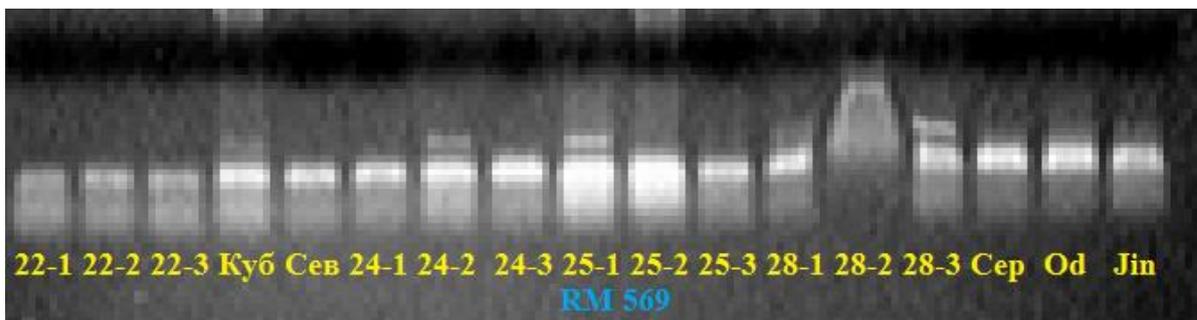


Рисунок 59 - Результат ДНК-анализа гибридных растений на устойчивость к пониженным положительным температурам в фазу прорастания по локусу RM 24545

В комбинации Кубань 3/Северный L7 по результатам анализа ДНК гибридных растений были отобраны все растения для дальнейшего изучения. Образец 25-1 имеет донорный аллель Кубань 3, а образцы 25-2 и 25-3 – донорный аллель сорта риса Odaebyeo. В комбинации Новатор / Jin/ Новатор короткий 1145 все образцы были выбракованы.

Данные ДНК-анализа согласуются с данными по фенотипу (лабораторные тесты на холодостойкость, проводимые в лаборатории физиологии).

Таким образом, в результате апробации 4-х SSR-маркеров, тесно сцепленных с признаком толерантности к низким положительным температурам, высокий уровень полиморфизма микросателлитных последовательностей выявлена у двух: RM24545, RM569. Это позволило провести четкое генотипическое маркирование проанализированных гибридных растений риса на данный признак и отобрать линии с доминантными аллелями генов холодостойкости, которые переданы в селекционный процесс для изучения по хозяйственно-ценным признакам.

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.

3.3. Введение гена устойчивости к длительному затоплению *Sub1* в отечественную генплазму риса как фактор борьбы с сорными растениями

В производстве риса наиболее экологически чистой считается технология получения всходов из-под слоя воды, при которой погибают злостные сорняки рисовых полей – виды *Echinochloa*. Однако ее использование вызывает ряд проблем, связанных, в первую очередь, с высокой гибелью проростков риса из-за недостатка кислорода, вызванного повышением уровня воды для борьбы с сорно-полевой растительностью. Эффективным способом защиты риса без гербицидов является выращивание сортов, устойчивых к анаэробному прорастанию и длительному затоплению (Дубина и др. 2017 а, б).

Ген *Sub1A* усиливает у растений риса толерантность к длительному затоплению. Это можно использовать в качестве экологически безвредного фактора для борьбы с сорными растениями рисовых полей.

Целью данного раздела являлось создание селекционных форм риса с геном *Sub1A*, определяющим толерантность к длительному затоплению водой, на генетической основе российских сортов с использованием ДНК-маркеров и ПЦР-анализа.

Необходимость создания генетических источников сельскохозяйственных растений, предлагаемых для возделывания по природосберегающим технологиям увеличивается.

Донорами для введения гена *Sub1A* в российскую генплазму риса стал сорт зарубежной селекции Khan Dan (Вьетнам) подвида *indica* с периодом вегетации 156–160 дней (Dubina et al., 2018 с; Азарин и др. 2016).

В качестве материнской формы для гибридизации был подобран скороспелый сорт Новатор (селекции «ВНИИ риса») с периодом вегетации 105–110 дней и крупнозерные скороспелые линии ВНИИР-9678, КП-25-14, а также созданные нами во ВНИИ риса линии риса с генами устойчивости к

пирикулярнозу КП-171 (*Pi-ta*), КП-62 (*Pi-2*), что позволит получить генплазму риса с комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды.

На первом этапе работы был проведен поиск информации и сделана выборка молекулярных (микросателлитных) маркеров в базе данных www.ncbi.nih.gov, для проведения идентификации, а также контролирования аллельного состояния гена *Sub1A* методом ПЦР в российских сортах риса и сортах-донорах.

Для постановки ПЦР были подобраны оптимальные условия и составлен протокол, при котором выход амплифицированного продукта наряду с минимальным количеством синтезированных неспецифичных фрагментов ДНК был высоким: начальная денатурация – 5 минут при 94 °С – 1 цикл. Следующие 35 циклов: денатурация – 35 сек при 94°С; отжиг праймеров – 45 сек при 60°С; синтез – 30 сек при 72°С. Синтез – 5 мин при 72°С – 1 цикл. Для идентификации гена *Sub1A* использовали 76 фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров, взятых из литературных источников (Дубина и др., 2016 а, 2017 б; Bailey-Serres et al. 2010, Xu et al. 2006, Yu et al. 2002, McCouch et al. 2001). Их сиквенс представлен в базе данных генетических ресурсов NCBI (www.ncbi.nih.gov).

Из 76 апробированных SSR-маркеров на наличие гена *Sub1A* в генотипе донорной и материнской форм риса полиморфизм между контрастными по изученному признаку формами выявлен у трёх микросателлитов: *Sub1Aq*, *Sub1C173*, *Sub1A203*. На рисунке 46 представлены результаты их апробации. *Sub1B* не показал различий с рецессивными аллелями.

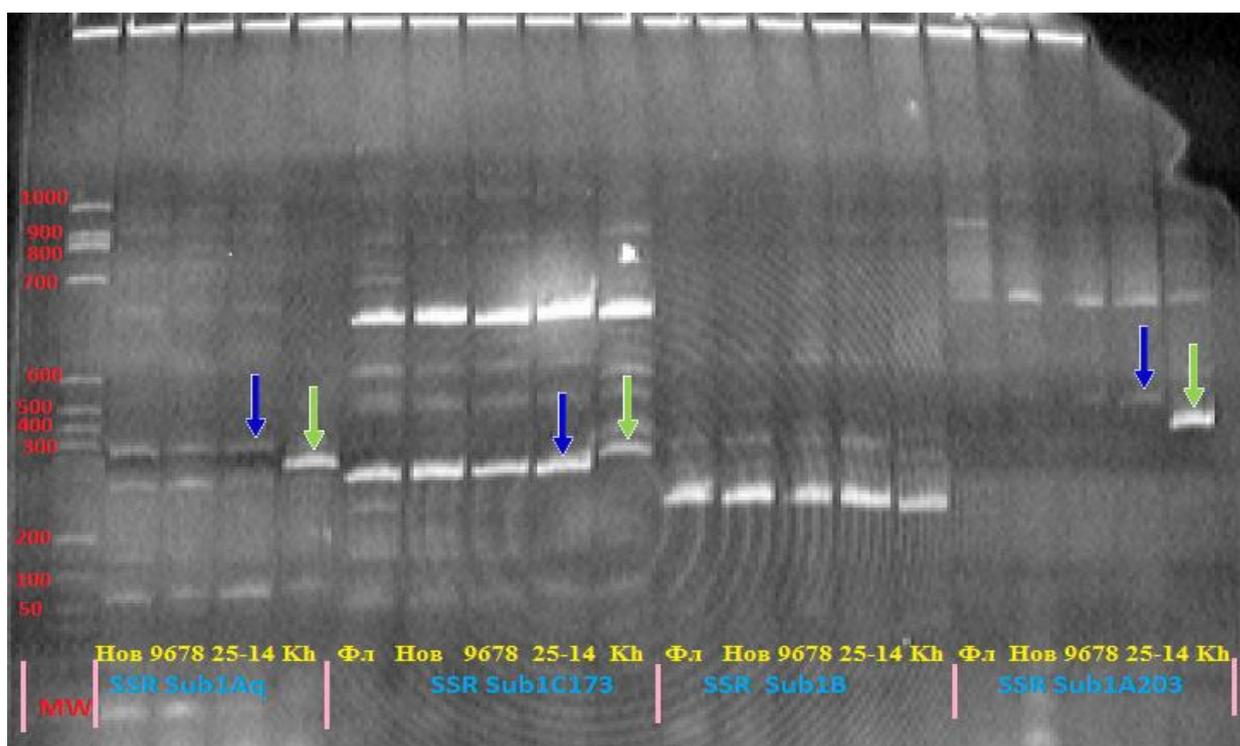


Рисунок 46 - Визуализация продуктов амплификации в SSR-локусах Sub1Aq, Sub1C173, Sub1B, Sub1A203

Примечание к рисунку 46: MW – маркер молекулярной массы) pBR322/BsuR I (поставщик – комп. Хеликон, Россия); Нов – раннеспелый сорт риса Новатор (материнская форма), ВНИИР 9678 – крупнозерная линия риса (материнская форма), КП-25-14 – крупнозерная раннеспелая линия риса (материнская форма), Kh – сорт Khan Dan донор гена *Sub1*; *Sub1Aq*, Sub1C173, Sub1B, Sub1A203 – микросателлитные маркеры на локус Sub1.

Отобранные SSR-маркеры вовлечены в программу по созданию толерантных к данному стрессору сортов риса для идентификации и визуализации аллельного состояния гена *Sub1A* в полученных гибридных растениях риса методом ПЦР.

В процессе работы в 2015 году были получены гибриды от скрещивания скороспелого российского сорта Новатор с донором гена *Sub1A*. Первое поколение характеризовалось высокой степенью стерильности (90–95%) и бурой окраской цветковых чешуй при созревании, что свидетельствует о значительных генетических различиях между родительскими формами (рис.47).

Во втором поколении в 2016 году наблюдали широкий спектр расщепления по вегетационному периоду, высоте растений, длине и форме метелки, количеству колосков, остистости (рис.47).



НОВАТОР



KHAN DAN



СЕМЕНА F2

Рисунок 47 - Семена родительских форм и гибридных растений риса

Среди гибридов F_2 с помощью ДНК маркирования 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 проведения анализа (рис. 48).

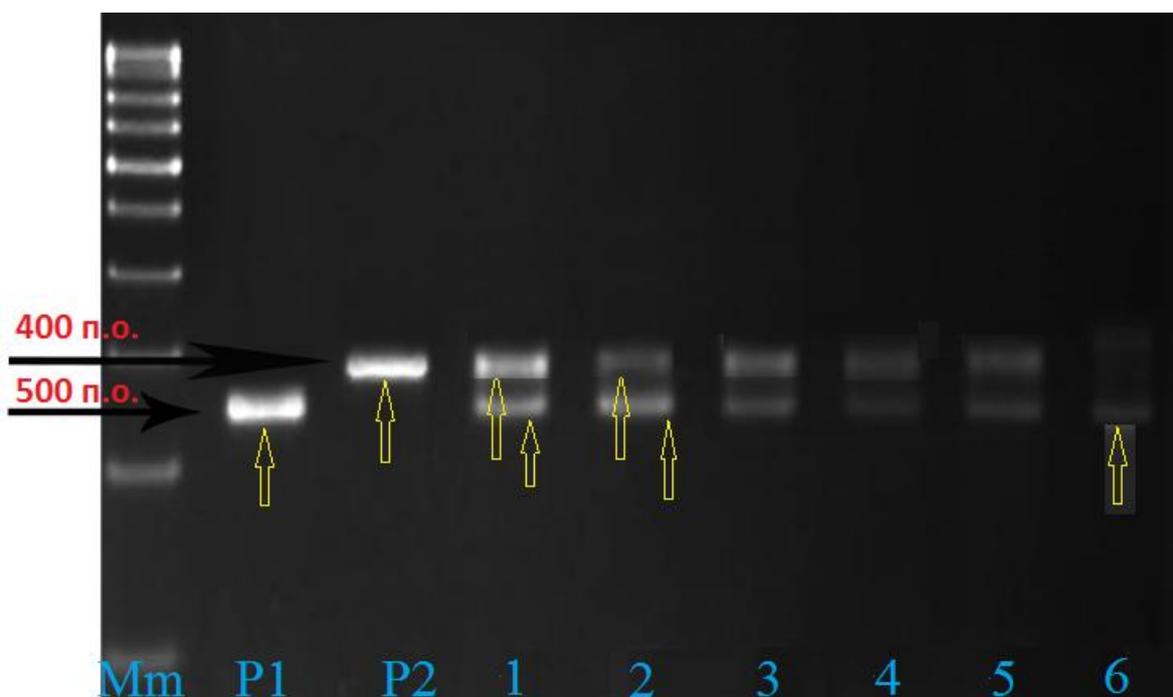


Рисунок 48 - ПЦР-анализ растений риса F_2 – поколения по локусу *Sub1A203*

Примечание: Mm- маркер молекулярного веса 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 F_2 .

На электрофореграмме видно, что гибридное растение G6 по локусу *Sub1A203* имеет донорную 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 F_2 - поколения (184 растения) получено следующее соотношение: 39 растений несут доминантную 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. С целью уничтожения грибковой микрофлоры их обрабатывали 12%-ной перекисью водорода в течение 15 минут. Для одинаковой

В результате проведения эксперимента было отмечено, что растения материнских крупнозёрных линий КП-25-14 и ВНИИР 9678 из-за недостатка кислорода имели летальный исход, а 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).

Такое явление было отмечено и для некоторых гибридных растений, полученных нами в комбинации скрещивания сорта-донора Khan Dun с отечественными сортами Новатор и линией КП-163 (рис. 49 д).

У растений риса сорта-донора Khan Dun с геном *Sub1* наблюдалась остановка в росте, т.е. они впали в состояние покоя. После 15 дней в режиме полного затопления воду из пробирок сливали, и в течение 2-3- суток растения выходили из стрессового состояния. Затем они восстанавливали свои жизненные функции, производя больше новых листьев. В анализируемых гибридных растениях были выделены формы (рис. 49 в, г), которые показали повышенную выживаемость в условиях длительного затопления по сравнению с растениями отечественных сортов. По результатам ДНК-анализа в этих растениях был идентифицирован ген *Sub1A*. Этим подтверждается кодоминантность SSR-маркера *Sub1A203*, отобранного после апробации и его ко-наследование с геном *Sub1A*.

Из 184 растений гибридной комбинации Новатор x Khan Dun выделили 143 растений 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, имеющие эффективный ген толерантности к длительному затоплению *Sub1A*, а также с периодом вегетации не более 125 дней. Получено BC₁F₂ -поколение (рис. 50).

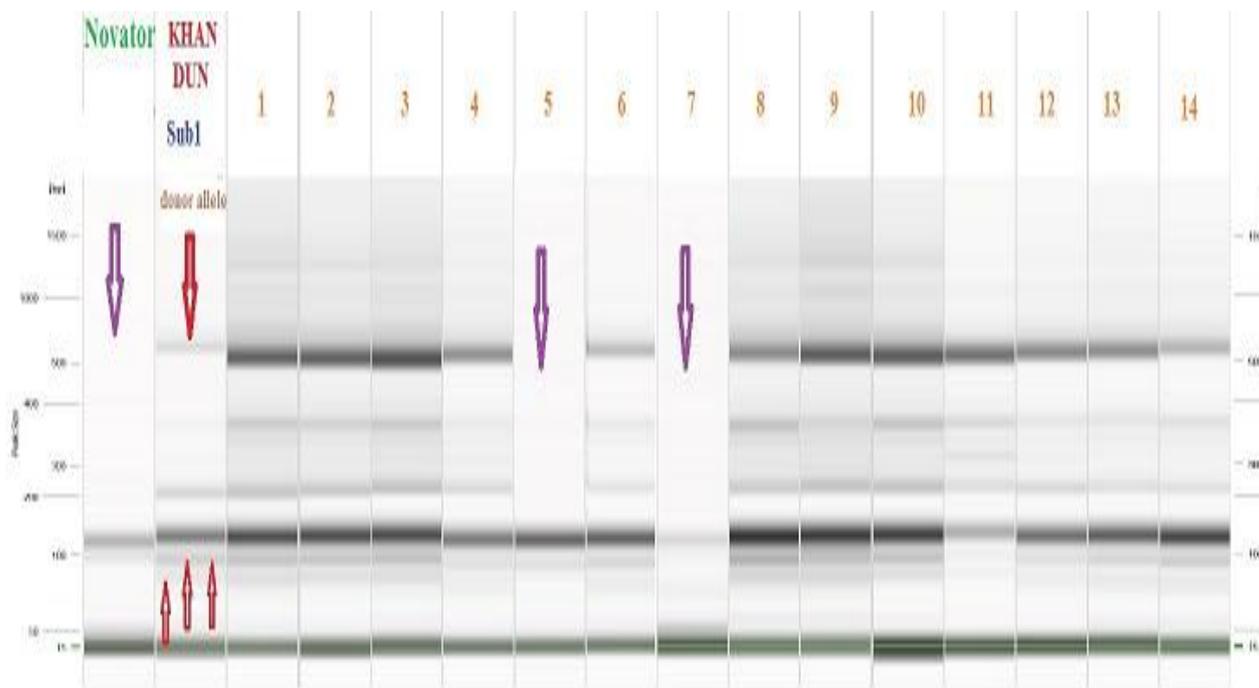


Рисунок 50 - Результаты ПЦР-анализа по локусу Sub1A203

Из рисунка видно, что гибридные растения под № 5 и 7 имеют ДНК-профиль и несут аллель материнской формы Новатор; растение № 11 имеет специфичный аллель гена *Sub1A* в гомозиготном состоянии. Молекулярная масса маркера *Sub1A* - 203 бп. Все остальные изучаемые гибридные растения по данному локусу являются гетерозиготами. Растения, не имеющие по данным ПЦР-анализа в генотипе целевого гена, выбраковывались.

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 (карта 14, чек 6) было выращено и размножено 15 семей BC₁F₄ - поколения.

Таким образом, по данному разделу проведен поиск информации и сделана выборка информативных молекулярных (микросателлитных) маркеров в базе данных www.ncbi.nih.gov, для проведения идентификации гена *Sub1A* методом ПЦР в полученных гибридных растениях риса,

проведена апробация отобранных SSR-маркеров, и выявлен их уровень полиморфизма на контрастных образцах риса. Отобраны три SSR с высоким уровнем полиморфизма по признаку «толерантность к длительному затоплению», проведено скрещивание сортов–доноров гена *Sub1A* с российскими высокопродуктивными сортами и линиями риса (скороспелым сортом Новатор, крупнозерными скороспелыми линиями ВНИИР-9678, КП-163, а также с линиями КП-171 и КП-62 с генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* и *Pi-2*, соответственно, получено F₁-F₄ и BC₂F₁-поколение, проведен ДНК-анализ полученных гибридных растений по идентификации гена *Sub1A*, отобраны растения, имеющие в генотипе целевой ген в гетеро- и гомозиготном состоянии. Проведена идентификация SSR-аллели гена *Sub1A*, сцепленного с признаком «толерантности к длительному затоплению», на основе ПЦР анализа. 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 агрономически ценных признаков.

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

Знание природы устойчивости растений, а также биологии самого патогена и его генетического разнообразия является основным критерием успеха в борьбе с заболеванием. Несмотря на наличие эффективных фунгицидов и правильно выполненных агротехнических приёмов одним из результативных способов борьбы с пирикулярриозом является выращивание устойчивых сортов (Наскидашвили Ж.Г. и др., 1987; Ляховкин А.Г., 2005). Однако при выборе данной стратегии существуют некоторые сложности. В первую очередь, это способность патогена мутировать, в результате чего могут появиться новые расы или патотипы. Кроме того, при благоприятных климатических условиях патоген

может стремительно развиваться в рисовых агрофитоценозах, что зачастую приводит к появлению эпифитотий. В результате чего в течение 2-3 лет возделывания сорта, резистентного к заболеванию, где уже в ареале его произрастания имеется некоторый фон заболевания, сорт, в следствии, смены рас возбудителя теряет устойчивость.

Поэтому для успешного выполнения селекционных программ по созданию сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, необходима информация о биоразнообразии и патотипе местной популяции патогена, а также эффективных генов резистентности для местной зоны возделывания культуры риса. Эти исследования крайне необходимы для понимания, что собой представляет патоген *P. oryzae* на современном этапе. Только на основании всех этих сведений может быть выработан правильный подход к выбору типов устойчивости и наиболее эффективный метод по созданию резистентных генетических ресурсов к заболеванию.

Ранее были проведены исследования по изучению структуры популяции гриба *P. Oryzae*. В европейской части России в популяциях гриба идентифицировано шесть генов вирулентности: Av-ks+, Av-a+, Av-i+, Av-k+, Av-m+, Av-ta+, а в популяции Краснодарского края – четыре: Av-ks+, Av-a+, Av-i+, Av-k+. Наиболее эффективными против рас этих популяций являются гены устойчивости Pi-z, Pi-zt, Pi-ta2, Pi-b (Коломиец Т.М., 1990). Однако эти данные несколько устарели, так как в последние десятилетия в мире произошли значительные изменения в составе вредоносных грибных болезней (Дорофеева Л.Л. и др., 2006), и необходимо исследование современных популяций патогена и выявление эффективных генов устойчивости на сегодняшний день.

Для повышения эффективности изучения генетического разнообразия фитопатогенных грибов перспективно использование современных биотехнологических подходов (молекулярное маркирование).

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 пирикуляриозу на юге России. Такие знания позволят заложить основы для дальнейшего развития научного направления по созданию устойчивых к пирикуляриозу генисточников риса.

В данном разделе представлены результаты исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ в 2016 – 2018 гг. На основе молекулярно-генетических методов нами проведено изучение биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. на юге России. В течение четырёх вегетационных периодов растений риса 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 из этих территорий. Из пораженных листьев, узлов стебля, метелок растений риса выделено 62 штамма *Pyricularia oryzae* Cav. с различной спорулирующей способностью. В таблице 12 приведено их происхождение и описание по морфолого-культуральным признакам (характер роста колонии, окраска верхнего мицелия и спор, окраска нижнего мицелия).

Изученные по морфолого-культуральным признакам штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. можно разделить на следующие морфотипы (группы, табл. 12): к первому морфотипу отнесены штаммы, выделенные из гербарного материала с признаками поражения пирикуляриозом, собранного в Темрюкском и Красноармейском районах. Ко второй группе отнесен штамм, имеющий уникальный морфотип из Пролетарского района Ростовской области. В третью группу вошли штаммы, выделенные из листьев и узла растений риса из Красноармейского и Калининского районов Краснодарского края. В четвертую и пятую группы вошли различающиеся

по характеру роста и цвету колонии штаммы, выделенные из листьев и узла, пораженных пирикулярриозом растений риса, из Крымского района Краснодарского края. К шестому морфотипу – штаммы из близлежащих Красноармейского и Калининского районов Краснодарского края. Штаммы, отнесённые в седьмую группу и имеющие войлочный характер роста колонии темно-серого цвета, были выделены из гербарного материала, собранного в Красноармейском районе. Штаммы, вошедшие в восьмую, девятую и десятую группы, были выделены на листьях растений риса из Калининского района. Одиннадцатая, двенадцатая и тринадцатая группы представлены разнообразием морфотипов патогена, выделенных из пораженных частей растений риса из Абинского района. В Славянском районе по морфолого-культуральным признакам выявлено 5 морфотипов, относящихся к 8, 15, 25, 29 и 30 группам. В Северском районе выделено и описано по морфолого-культуральным признакам 3 морфотипа, относящиеся к 21, 23, 29 группам. Штаммы патогена, выделенные из ножки метёлки растений риса, выращенных в Республике Адыгея, имеют сходный морфотип со штаммами, выделенными из частей растений, собранных на рисовых полях г. Краснодара, Крымского, Красноармейского районов Краснодарского края.

Все описанные по морфолого-культуральным признакам штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. с их географическим местом сбора и указанием части растений, с которой они выделены, а также сортом, который поражен пирикулярриозом, внесены в базу данных «База данных штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России», разработанную нами совместно с отделом геоинформационных технологий ФГБУ ЦАС «Краснодарский» в рамках гранта РФФИ р_а №16-44-230178 (приложение 23, 24).

Таблица 12 - Происхождение и морфолого-культуральные признаки штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. 2016 -2018 гг.

№ штамма	Район	Дата отбора	Сорт	Часть растения	Характер роста колонии	Цвет колонии (верхний мицелий, конидии)	Цвет субстрата (нижний мицелий)
2	Темрюкский район	27.06.2016	Хазар	лист	неоднородный низкий плотный и слегка пушистый	от светло-серого до серого	черный
8	Ростовская область Пролетарский район	30.06.2016	Привольный-4	лист	войлочный	от светло-серого до оливкового	от светло-серого до черного
7-16	Крымский район	15.07.2016	Флагман	лист	неоднородный низкий клочковатый и войлочный	от светло-серого до бежево-серого	темно-коричневый
11	Крымский район	30.07.2016	Гарант	лист	неоднородный сектора войлочным, клочковатым низким порошистым ростом	От серого до коричневого, с белыми зонами	от обесцвеченного до интенсивно черного
12	Крымский район	30.07.2016	Рапан	лист	низкий плотный	серый	черный
21	Красноармейский район	13.08.2016	Виктория	узел	неоднородный порошистый с высокой и низкими войлочными зонами	от светло-серого до темно-серого и оливкового	от темно-коричневого до черного
31	Красноармейский район	14.07.2016	Рапан	лист	войлочный	темно-серый	черный
4.1	Красноармейский район	27.06.2016	Изумруд	лист	низкий войлочный	серый (мышинный)	буро-черный
37	Калининский район	16.07.2016	Рапан	лист	неоднородный- сектора войлочным и клочковатым низким ростом	от светло-серого до темно-серого и оливкового	от коричневого до черного
39	Калининский район	16.07.2016	Флагман	лист	низкий порошистый («лучистый»)	от темно-серого до бурого	черный
50	Калининский район	18.07.2016	Рапан	лист	неоднородный - порошистый и низкий клочковатый	светло-серый	коричневый
5	Абинский район	15.07.2016	Титан	лист	низкий войлочный	от светло-оливкового до серого	черный
38	Абинский район	30.07.2016	Флагман	метелка	низкий порошистый	от темно-серого до бурого	черный

6	Абинский район	15.07.2016	Степняк	лист	неоднородный войлочный и порошистый	от серого до серо-коричневого	черный
3-17	Славянский	27.07.2017	Гамма	лист	низкий войлочный	от светло-серого до серого	от обесцвеченного до темно-коричневого
4-17	Славянский	27.07.2017	Рапан	лист	низкий войлочный	от светло-серого до серого	от обесцвеченного до коричневого
5-17	Славянский	27.07.2017	Злата	лист	низкий порошистый, концентрический	серый	светло-коричневый
6-17	Славянский	27.07.2017	Аполлон	лист	низкий войлочный	от светло-серого до темно-серого	от светло-коричневого до коричневого
7-17	Славянский	27.07.2017	Азовский	лист	низкий плотный	от светло-серого до оливкового	от обесцвеченного до интенсивно черного
8-17	Славянский	27.07.2017	Рапан	лист	низкий войлочный	от светло-серого до серого	темно-коричневый
9-17	Славянский	27.07.2017	Азовский	лист	низкий войлочный	от светло-серого до серо-оливкового	от светло-коричневого до темно-коричневого
14-17	Красноармейский	10.08.2017	23 линия	лист	неоднородный - сектора с войлочным клочковатым и низким порошистым ростом	от светло-серого до темно-серого и оливкового	от обесцвеченного до черного
17-17	Красноармейский	10.08.2017	Шарм	узел	низкий плотный и слегка пушистый	от светло-серого до серого	от коричневого до черного
19-17	Красноармейский	10.08.2017	Акустик	узел	низкий войлочный и слегка пушистый	светло-серый	от темно-коричневого до черного
20-17	Красноармейский	10.08.2017	Юбилейны й-85	лист	неоднородный низкий плотный с белыми зонами	от белого до серого	черный
21-17	Красноармейский	10.08.2017	Флагман	лист	низкий плотный и слегка пушистый	серый	черный

22-17	Красноармейский	10.08.2017	Новатор	узел	неоднородный-сектора с войлочным клочковатым и низким порошистым ростом	от светло-серого до оливкового	от светло-коричневого до черного
23-17	Красноармейский	10.08.2017	Станичный	лист	неоднородный-рыхлый клочковатый и низкий войлочный	от светло-серого до темно серого	от обесцвеченного до интенсивно черного
26-17	Красноармейский	10.08.2017	Водопад	узел	неоднородный-низкий плотный и слегка пушистый	от светло-серого до серого	от обесцвеченного до коричнево-черный
27-17	Краснодар, Белозерный	15.08.2017	Визит	лист	неоднородный-низкий войлочный и слегка пушистый	от светло-серого до серо-оливкового	от обесцвеченного до интенсивно-черного
33-17	Красноармейский	16.08.2017	Фаворит	узел	неоднородный-порошистый и войлочный	от светло-оливкового до темно-серого	от обесцвеченного до интенсивно черного
34-17	Красноармейский	16.08.2017	Привольный 4	узел	неоднородный-высокий рыхлый и низкий войлочный	от светло-серого до темно-серого и оливкового	интенсивно черный
37-17	Калининский	25.08.2017	Диамант	лист	неоднородный-клочковатый и низкий порошистый	от светло-серого до бурого	от светло-черного до черного
38-17	Калининский	25.08.2017	Диамант	ножка мет.	неоднородный-рыхлый клочковатый и низкий порошистый	от светло-серого до серого	от обесцвеченного до темно-коричневого
39-17	Северский	25.08.2017	Рапан	ножка мет.	неоднородный-сектора с войлочным клочковатым и низким порошистым ростом	от серого до темно-оливкового	от обесцвеченного до интенсивно черного
40-17	Северский	25.08.2017	Рапан	ножка мет.	высокий рыхлый клочковатый "лучистый"	от белого до коричневатого-оливкового	от обесцвеченного до интенсивно черного
55-17	Крымский	30.08.2017	Диамант	ножка мет.	неоднородный-рыхлый клочковатый и низкий войлочный	от светло-серого до серого с коричневыми зонами	от обесцвеченного до темно-коричневого
56-17	Краснодар, Белозерный	4.09.2017	Визит	ножка мет	низкий порошистый "лучистый" концентрический	серый	черный

58-17	Адыгея	19.09.2017	Фишт	ножка мет	неоднородный рыхлый клочковатый и низкий войлочный	от белого до коричневато-серого	от светло-черного до интенсивно черного
1.8	Красноармейский	22.06.2018	Партнер	лист	низкий войлочный	от светло-серого до темно-серого	от светло- коричневого до темно-коричневого
3.8	Красноармейский	22.06.2018	Рапан	лист	низкий войлочный и рыхлый пушистый	от белого до серого (мышинный)	от светло- коричневого до коричневого
4.8	Краснодар	2.07.2018	Партнер	лист	неоднородный- рыхлый и низкий войлочный	от белого до серого и светло-оливкового	от обесцвеченного до темно- коричневого
5.8	Красноармейский	5.07.2018	Полевик	лист	неоднородный -сектора с низким войлочным и слегка пушистым ростом	от белого до серого	от обесцвеченного до темно- коричневого
6.8	Красноармейский	5.07.2018	Полевик	лист	низкий войлочный	темно-серый концентрический	от светло- коричневого до черного
9.8	Красноармейский	5.07.2018	Полевик	лист	неоднородный -сектора с низким войлочным и клочковатым ростом	от светло-белого до серого (мышинный)	от обесцвеченного до коричнево- черного
10.8	Красноармейский	9.07.2018	Полевик	лист	неоднородный -низкий порошистый с войлочными и клочковатыми зонами	от белого до светло- серого и оливкового	от обесцвеченного до темно- коричневого
11.8	Красноармейский	9.07.2018	Полевик	лист	неоднородный -сектора с войлочным клочковатым и низким порошистым ростом	от светло-серого до серого	от светло- коричневого до коричнево-черного
12.8	Красноармейский	9.07.2018	Партнер	лист	низкий войлочный	от светло-серого до оливкового	от темно- коричневого до черного
14.8	Красноармейский	9.07.2018	Партнер	лист	неоднородный -рыхлый клочковатый с низкими плотными и слегка пушистыми зонами	от светло-серого до темно-серого	от светло- коричневого до темно-коричневого
15.8	Красноармейский	9.07.2018	Партнер	лист	низкий плотный и слегка	от светло-серого до	от обесцвеченного

					пушистый	серого с темными зонами	до темно-коричневого
18.8	Северский	24.07.2018	Кумир	метелка	неоднородный -сектора с войлочным клочковатым и низким порошистым ростом с белыми зонами	от белого до серо-оливкового	от светло-коричневого до интенсивно-черного
20.8	Абинский	24.07.2018	Олимп	лист	низкий плотный	от светло-серого до темно-оливкового	от коричневого до темно-коричневого
21.8	Абинский	24.07.2018	Кумир	лист	низкий войлочный и низкий порошистый	от белого до темно-серого	от темно-коричневого до черного
24.8	Славянский	26.07.2018	Рапан	метелка	неоднородный - клочковатый и низкий порошистый	от светло-серого до серо-оливкового	от светло-коричневого до темно-коричневого
25.8	Славянский	26.07.2018	Виктория	метелка	неоднородный - порошистый с высоко и низко-войлочными зонами "лучистый"	от светло-серого до темно-серого и оливкового	от светло-коричневого до черного
26.8	Славянский	1.08.2018	Партнер	метелка	низкий войлочный "концентрический"	от темно-серого до оливкового	от обесцвеченного до интенсивно-черного
28.8	Краснодар	17.08.2018	Партнер	ножка метелки	неоднородный -рыхлый клочковатый и низкий порошистый	от серого до темно-серого	от обесцвеченного до черного
29.8	Калининский	30.08.2018	Партнер	узел	рыхлый пушистый с войлочными зонами	от темно-серого до оливкового	от светло-черного до интенсивно-черного

На рисунке 51 представлены фотографии некоторых морфотипов *Pyricularia oryzae* Cav., выделенных из гербарного материала в 2016-2018 гг.

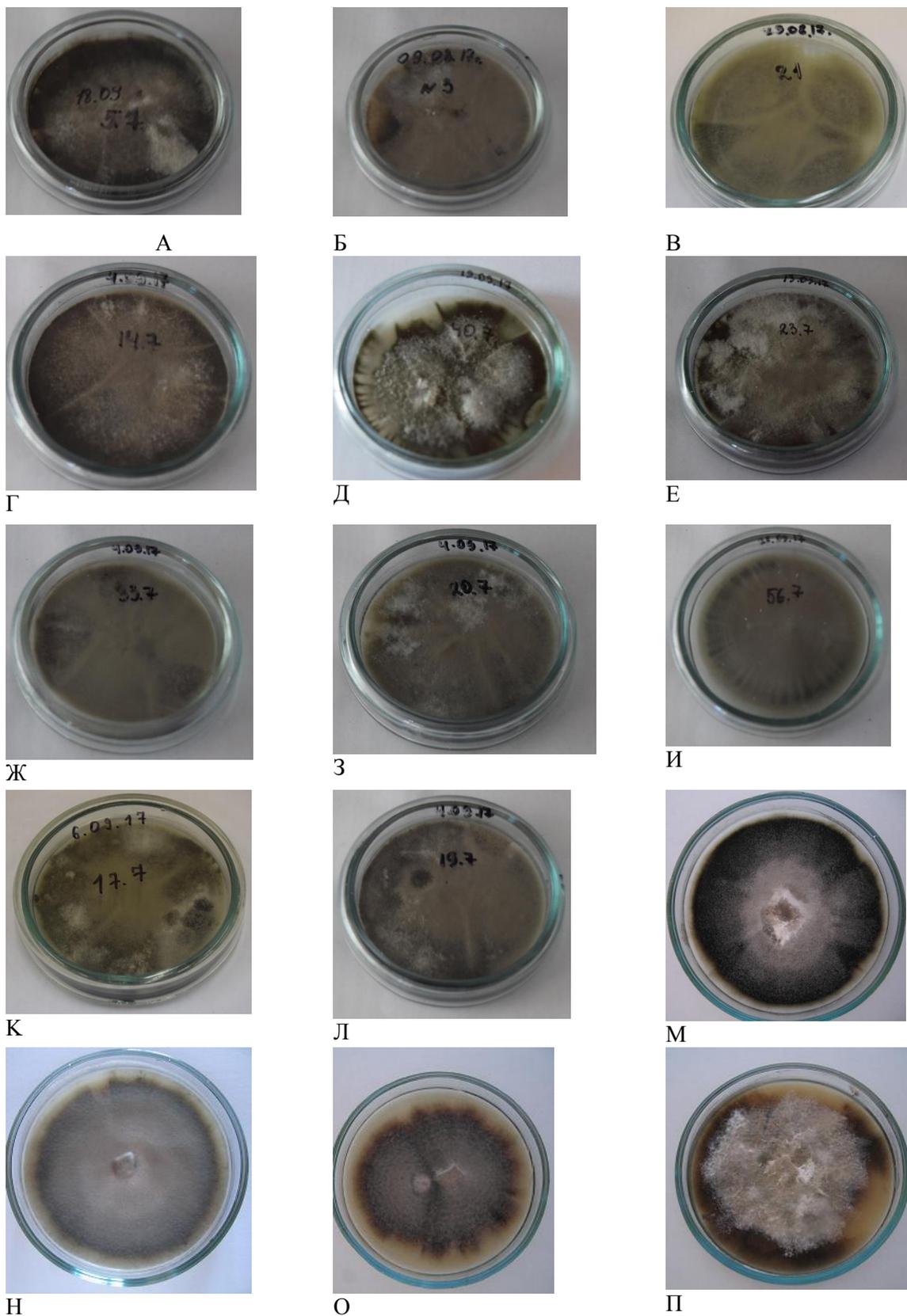


Рисунок 51 - Штаммы возбудителя пирикуляриоза *Pyricularia oryzae* Cav.

Примечание к рисунку 51: 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, штамм, имеющий высокий рыхлый клочковатый «лучистый» характер роста колонии от белого до коричнево-оливкового цвета; Е – штамм №23-17, имеющий неоднородные секторы с рыхлым клочковатым и низким войлочным ростом колонии от светло-серого до темно-серого и оливкового цвета; Ж- штамм № 33-17, имеющий неоднородные секторы с порошистым и войлочным ростом колонии от светло-оливкового до темно-серого цвета; З - штамм № 20-17, имеющие неоднородную низко- плотную с белыми зонами структуру колонии от белого до серого цвета; И - штамм №56-17 – имеющий низкий порошистый "лучистый" концентрический характер роста колонии серого цвета; К – штамм №17-7 – с низкой плотной и слегка пушистой структурой светло-серого и серого цвета колонии; Л- штамм № 19-7, имеющий низкий войлочный и слегка пушистый характер роста колонии от светло-серого до серо – оливкового цвета колонии; М- штамм №21, имеющий порошистый характер роста и цвет колонии от светло до темно-серого; Н - штамм № 5, имеющий войлочный и низко-войлочный характер роста и цвет колонии от светло-серого или светло-оливкового до серого или оливкового; О - штамм № 31, имеющий порошисто-лучистый характер роста колонии от темно-серого до бурого цвета; П - штамм №11, имеющий порошистую и клочковатую структуру от светло-серого до коричневого цвета; Р - штамм № 12, имеющий низкую плотную и плотную структуру и цвет колонии от светло-серой до серой; С - штамм №6, имеющий неоднородные секторы с войлочным, клочковатым и низким порошистым ростом.

При выборе метода для молекулярно-генетического анализа штаммов патогена мы, прежде всего, исходили из того, что структура и организация генома возбудителя пирикулярриоза мало изучены и, следовательно, необходимо опираться на те методы, которые не требуют предварительного знания о последовательности анализируемой ДНК. Также необходимыми условиями при выборе метода для нас были: простота использования, скорость проведения анализа и низкая стоимость.

Из литературных источников (Мухина и др., 2007; Khush et al., 2001) известно, что микросателлитные маркеры давали лучшую генетическую характеристику для *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* и *Fusarium circinatum*.

В связи с этим в нашей работе для генетической классификации штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. использовался полиморфизм SSR-маркеров (Дубина и др., 2017 в, 2018 б, в, с).

Микросателлитный анализ ДНК 62 штаммов патогена, выделенных из гербарного материала с признаками поражения болезнью, собранного на территории Краснодарского края, Ростовской области и Республике Адыгея проведен на основе разработанной совместно с ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) мультипраймерной системы, состоящей из шести SSR-локусов (табл. 13).

Такой подход позволяет проанализировать каждый образец ДНК одновременно по всем шести микросателлитным локусам. Амплификация каждого микросателлитного локуса осуществляется со специфичными праймерами, один из которых мечен определенным флуоресцентным красителем (FAM, R6G или ROX), что позволяет анализировать ПЦР-фрагменты отдельно по соответствующему каналу детекции (Дубина и др., 2018 б).

Таблица 13 - Мультипраймерная ПЦР-система для генетического анализа штаммов возбудителя пирикуляриоза *Pyricularia oryzae* Cav. из разных экологических зон рисосеяния Краснодарского края, Ростовской области и Республики Адыгея.

№ пп	Праймеры	Обозначение	Флюоресцентный 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	Pyrms 07-08	A	R6G	130	138	130	124
2	Pyrms 47-48	B	ROX	176	174	176	172
3	Pyrms 83-83	C	FAM	179	182	179	187
4	Pyrms 43-44	D	FAM	222	205	222	212
5	Pyrms 99-100	E	R6G	220	214	223	200
6	Pyrms 427-428	F	ROX	224	222	224	208

Примечание к таблице 13: 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 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 (таблица 14).

На её основе в результате проведенного ДНК-анализа для каждого штамма патогена были получены индивидуальные генетические профили и выявлено 33 генотипа среди изученных штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. В качестве примера приведены генетические профили некоторых штаммов (рис. 52, 55, 57, табл. 14, 15, 16).

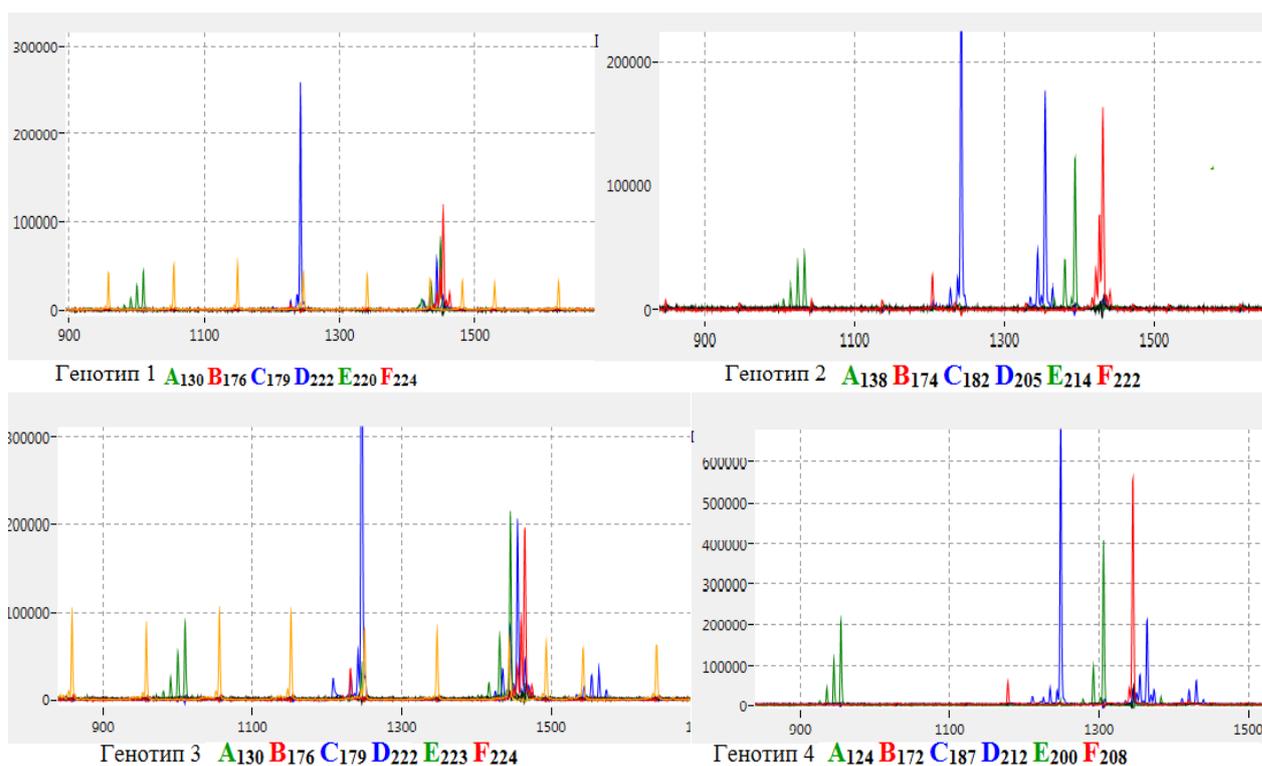


Рисунок 52 - Генетический профиль некоторых изученных в 2016 году изолятов *Pyricularia oryzae Cav.*, полученный в результате ДНК-анализа

В 2016 году из 16 исследуемых штаммов патогена нами выявлено 4 генотипа, имеющих уникальный генетический профиль (рис. 52a) и 6 морфотипов. Составлены «ДНК-паспорта» выделенных штаммов *Pyricularia oryzae Cav.* для каждого генотипа (рис. 52, табл. 14).

Таблица 14 - Классификация штаммов возбудителя пирикулярриоза *Pyricularia oryzae Cav.* на основе полученных генетических профилей в 2016 г.

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
4	A ₁₂₄ B ₁₇₂ C ₁₈₇ D ₂₁₂ E ₂₀₀ F ₂₀₈	4

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).

Данный метод предназначен для решения задач классификации. В его основе лежит процедура вычисления расстояний между сравниваемыми объектами, характеризующимися по комплексу признаков. Сходные объекты отличаются наименьшим, несходные – наибольшим расстоянием. Из возможного списка расстояний мы использовали так называемый процент несовпадений, который наилучшим образом подходит для исследования качественных альтернативных признаков.

Основным результатом анализа является – рисунок, называемый иерархический кластерный дендрит. На нём по оси абсцисс откладываются номера или имена объектов в порядке их сходства; по оси ординат – линии, отражающие расстояния между объектами или группами объектов. Разрезание дендрита по выбранному уровню сходства (расстоянию) приводит к выделению групп объектов, обладающих наибольшим сходством друг с другом. Результаты кластеризации представлены на рисунке 53.

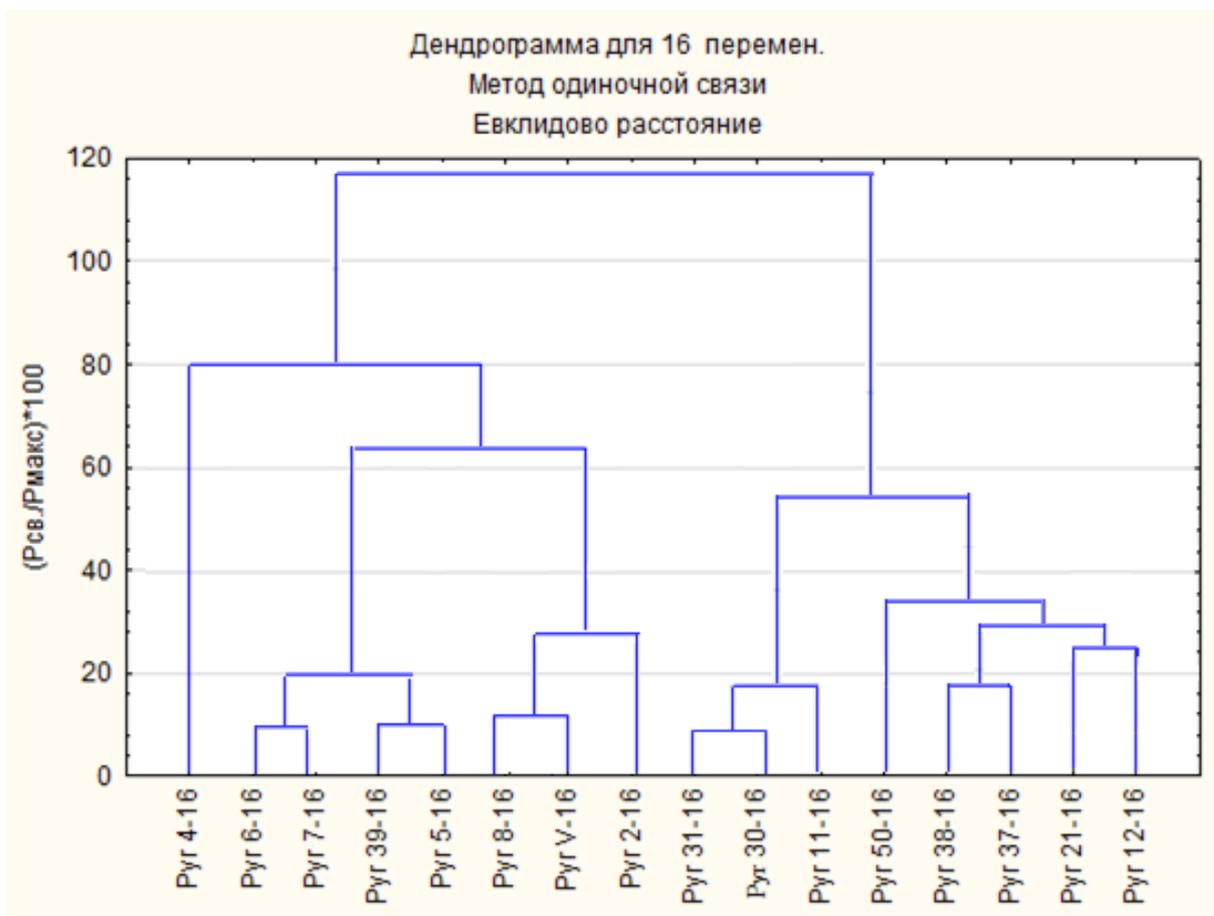


Рисунок 53 - Кластерный анализ штаммов *Pyricularia oryzae Cav.* по данным микросателлитного анализа в 2016 года

При разрезания иерархического кластерного дендрита по величине 60 условных единиц срезки изученных в 2016 году штаммов патогена выделено 4 кластера. К первому кластеру отнесены штаммы из Крымского, Абинского и Калининского районов: 4 -16, 5-16, 6-16, 7-16, 39-16, имеющие низкий войлочный и слегка порошистый характер роста колоннии. В состав второго кластера вошли штаммы: 2-16, V-16 и 8-16 из Темрюкского района Краснодарского края и Пролетарского района Ростовской области. Третий кластер представлен следующими штаммами: 11-16, 30-16 и 31-16. Четвертый кластер включает: 12-16, 21-16, 37-16, 38-16, 50-16 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 54 представлено распределение кластеров в пространстве дискриминантных функций.

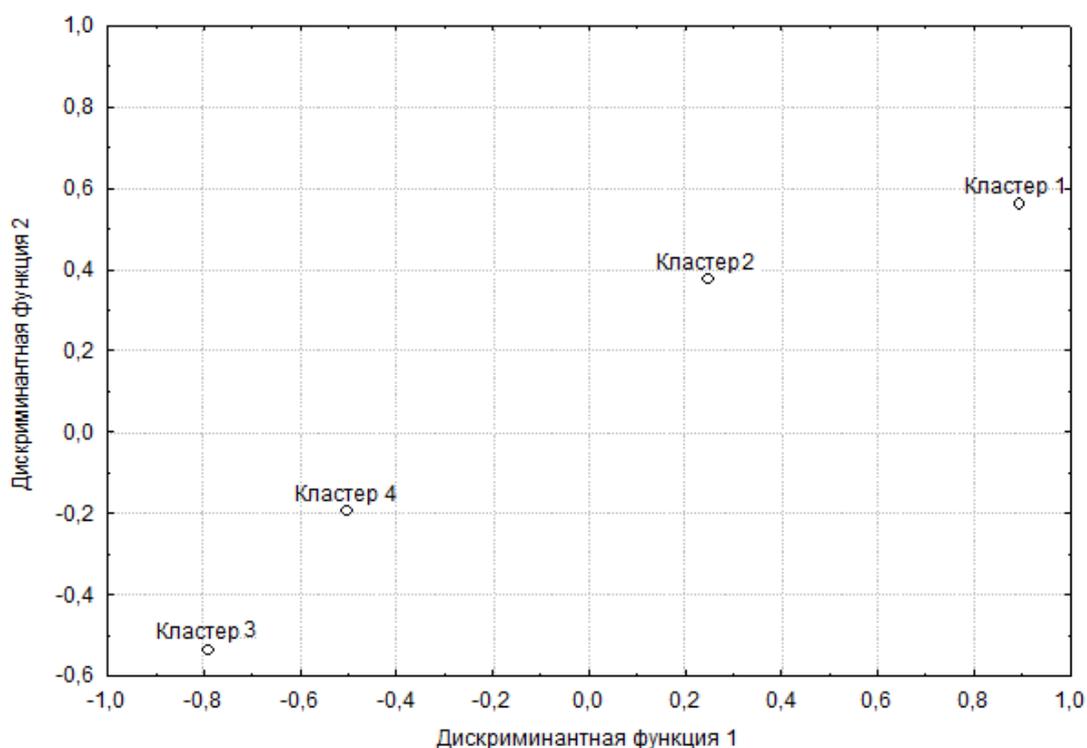


Рисунок 54 - Ординация центров кластеров в пространстве дискриминантных функций

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

Различия в числовом соотношении по морфо- и генотипам изученных штаммов патогена связаны с тем, что при описании по морфолого-культуральным признакам некоторые из них характеризовались неоднородностью колонии (секторами). Несмотря на то, что ДНК-анализ является более точным методом идентификации штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., 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 при изучении биоразнообразия возбудителя заболевания.

В 2017 году из пораженных листьев, узлов стебля, метёлок растений риса выделено 25 штамма (популяций) *Pyricularia oryzae* Cav. При их

описании по морфолого-культуральным признакам выявлено 11 морфотипов. В результате молекулярно-генетических исследований выявлено 20 генотипов патогена. Составлены их «ДНК-паспорта» (рис. 55, табл.15).

Штамм №33-17 (Красноармейский район) – генотип: **A**₁₃₈ **B**₁₇₃ **C**₁₇₈ **D**₂₀₆ **E**₁₈₈ **F**₂₂₁

Штамм №39-17 (Северский район) – генотип: **A**₁₄₀ **B**₁₇₃ **C**₁₈₀ **D**₂₀₈ **E**₂₁₄ **F**₂₂₁

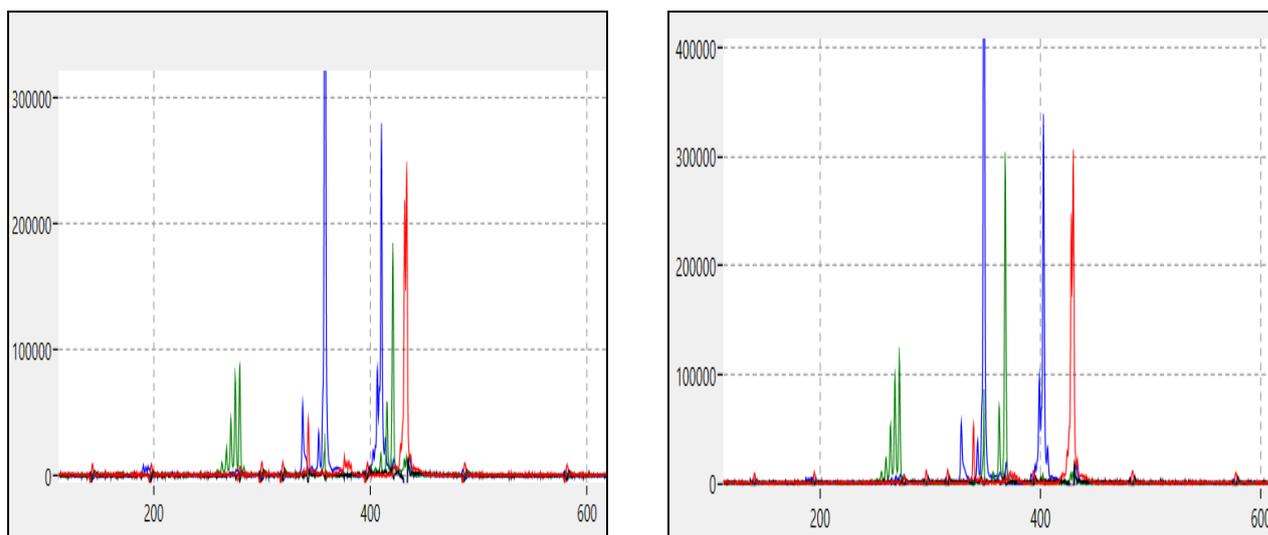


Рисунок 55 - Генетические профили изученных изолятов *Pyricularia oryzae* Cav., выявленные в результате ДНК-анализа

Таблица 15 - Классификация штаммов возбудителя пирикуляриоза *Pyricularia oryzae* Cav. на основе полученных генетических профилей и их «ДНК-паспорта» в 2017 г.

Генотип	A 07-08	B 47-48	C 83-84	D 43-44	E 99-100	F 427-428	№ Штамма
1	124	171	186	210	199	206	К4-16
2	128	175	178	223	223	223	37-17
3	130	175	178	219	223	223	5-17
4	130	175	178	221	220	223	К1-16
5	132	175	178	221	223	223	55-17
6	134	175	178	223	223	223	18-16
7	138	173	180	204	211	219	48-16
8	138	173	180	204	214	221	3-17, 4-17, 14-17, 34-17
9	138	175	180	204	214	221	27-17
10	138	173	180	204	226	221	40-17

Продолжение таблицы 15							
Генотип	A 07-08	B 47-48	C 83-84	D 43-44	E 99-100	F 427-428	№ Штамма
11	138	173	178	206	188	221	39-17
12	138	173	180	206	214	221	19-17
13	138	173	180	206	214	223	56-17
14	138	173	180	208	214	221	26-17
15	140	173	180	204	214	221	17-17, 21-17
16	140	173	180	208	214	221	33-17
17	140	173	180	225	220	221	20
18	146	179	180	214	211	223	7-16

На основании комплекса данных о микросателлитном полиморфизме изученных штаммов за 2017 год также проведена оценка степени их генетического сходства с использованием кластерного анализа. Результаты его представлены на рисунке 56.

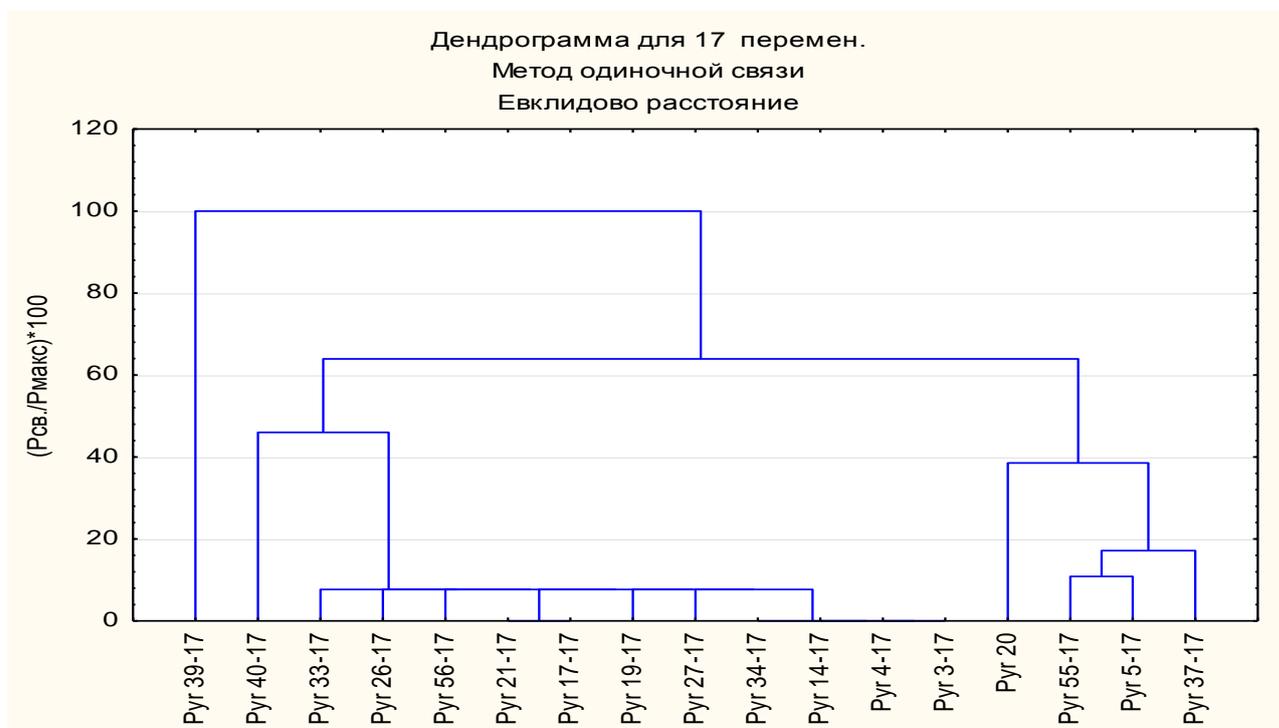


Рисунок 56. Кластерный анализ изученных в 2017 году штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. по данным микросателлитного анализа.

Анализ полученного в результате кластеризации иерархического дендрита позволяет выделить в выборке исследованных образцов *P.oryzae* две основные группы и 5 подгрупп, имеющих уникальный генетический профиль, не схожий с другими генотипами патогена (кластера). В первый кластер вошли штаммы *P.oryzae* №№ 39-17 - 26-17 (см. рис.), а во второй №№20 - 37.

В 2018 году из пораженных листьев, узлов стебля, метелок растений риса выделено 20 штаммов (популяций) *Pyricularia oryzae* Cav. При их описании по морфолого-культуральным признакам выявлено 9 морфотипов. В результате молекулярно-генетических исследований выявлено также 9 вариантов генотипов патогена (рис. 57, табл. 16).

Генотип : A₁₃₈ B₁₇₃ C₁₈₂ D₂₀₄ E₂₁₄ F₂₂₁

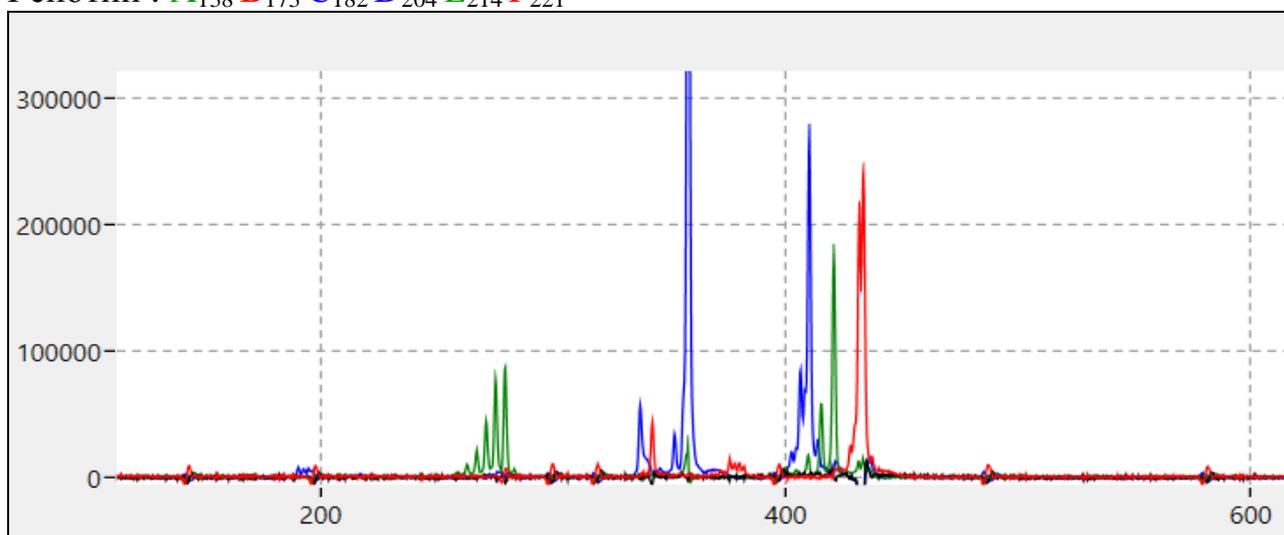


Рисунок 57 - Генетический профиль некоторых изученных в 2018 году изолятов *Pyricularia oryzae* Cav., полученный в результате ДНК-анализа

В качестве референсных образцов использовали штаммы ДНК *P.oryzae*, с известными генетическими профилями, принадлежащими к 4-м разным генотипам: К1 – штамм №12, К2 – штамм №5, К3 – штамм №8 и К4 – штамм №4. При повторном анализе этих образцов были получены воспроизводимые результаты (табл. 16, №№ генотипов 1, 2, 4 и 9).

Таблица 16 - Классификация штаммов возбудителя пирикулярриоза *Pyricularia oryzae* Cav. на основе полученных генетических профилей

№ генотипа	A 07-08	B 47-48	C 83-84	D 43-44	E 99-100	F 427-428	Штамм
1	140	173	182	204	214	221	1.8, 6.8, 12.8, 26.8
2	138	173	182	204	214	221	3.8, 5.8, 21.8, K2
3	138	173	182	206	214	223	4.8
4	130	175	180	223	223	223	24.8, 28.8, 10.8, 11.8, K3
5	0	173	182	206	214	219	18.8
6	138	173	182	206	214	221	26.8
7	138	173	182	208	214	221	29.8, 30.8
8	142	173	182	204	214	221	25.8
9	142	173	190	204	214	221	20.8, 14.8, 15.8
10	130	175	178	221	220	223	K1
11	124	171	186	212	199	207	K4

Примечание: K1, K2, K3, K4 – референсные образцы, с известными генетическими профилями.

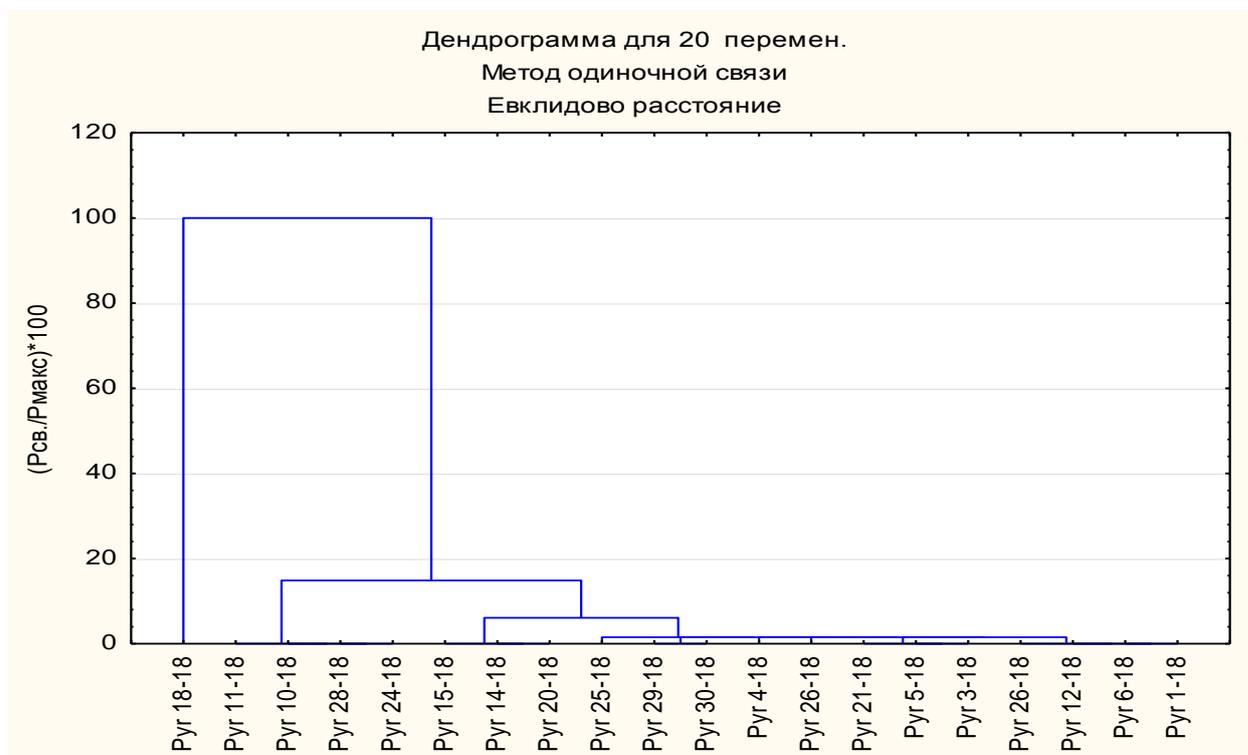


Рисунок 58 - Кластерный анализ штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. по данным микросателлитного анализа 2018 года

Примечание: На рисунке по горизонтальной оси системы координат указаны названия штаммов в порядке их генетического сходства, а по вертикальной оси – «расстояние», выраженное в условных единицах, между штаммами или их группами.

Анализ полученного в результате кластеризации иерархического дендрита позволяет выделить в исследованных штаммах девять групп, имеющих различия в генотипе на основе анализа их ДНК.

К первому генотипу отнесены штаммы 1.8, 6.8, 12.8, 26.8, которые по морфолого-культуральным признакам имеют одинаковый характер роста и цвет колонии. Штаммы 3.8, 5.8 и 21.8 имеют одинаковый ДНК профиль с известным вторым генотипом- К2 и сходный по морфотипу. В третью группу вошел штамм 4.8, имеющий уникальный генетический профиль и морфотип. У штаммов 24.8, 10.8 и 11.8 выявлен генотип положительного контроля К3. Эти штаммы имеют одинаковые морфолого-культуральные признаки. Штаммы 18.8, 26.8 и 25.8 имеют уникальный генетический профиль и включены в 5,6 и 8 группу генотипов, соответственно. Штаммы 29.8 и 30.8, отнесённые в седьмую группу, штаммы 14.8, 15.8, 20.8 из Абинского и Красноармейского районов - в девятую группу.

Таким образом, полученные и изученные за период 2015-2018 гг. штаммы *Pyricularia oryzae* Cav., при описании по морфолого-культуральным признакам разделены на 33 морфотипа и по результатам ДНК-анализа выявлено 33 генотипа патогена. При сопоставлении результатов с первым годом проведения исследований в 2017 году было выявлено 4 новых морфотипа патогена (штаммы №№17-17, 19-17, 20-17, 40-17), три из которых из Красноармейского район и один из Северского (A₁₄₀ B₁₇₃ C₁₈₀ D₂₀₄ E₂₁₄ F₂₂₁, A₁₃₈ B₁₇₃ C₁₈₀ D₂₀₆ E₂₁₄ F₂₂₁, A₁₄₀ B₁₇₃ C₁₈₀ D₂₂₅ E₂₂₀ F₂₂₁, A₁₃₈ B₁₇₃ C₁₈₀ D₂₀₄ E₂₂₆ F₂₂₁, соответственно). В 2018 году выявлено 7 новых генотипов (A₀ B₁₇₃ C₁₈₂ D₂₀₆ E₂₁₄ F₂₁₉ – Северский район; A₁₃₈ B₁₇₃ C₁₈₂ D₂₀₆ E₂₁₄ F₂₂₁, A₁₃₈ B₁₇₃ C₁₈₂ D₂₀₈ E₂₁₄ F₂₂₁ и A₁₄₀ B₁₇₃ C₁₈₂ D₂₀₄ E₂₁₄ F₂₂₁ – Красноармейский район;

A₁₃₈B₁₇₃C₁₈₂D₂₀₆E₂₁₄F₂₂₃ и A₁₄₂B₁₇₃C₁₉₀D₂₀₄E₂₁₄F₂₂₁ – Абинский район;;
A₁₄₂B₁₇₃C₁₈₂D₂₀₄E₂₁₄F₂₂₁ – Славянский район).

Проведенное генотипирование штаммов патогена *P.oryzae* Cav. позволило создать их генетические «ДНК-паспорта», на основе этого была составлена база данных «Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России» (приложение 21, 22). Она представляет совокупность данных, отражающих информацию о биоразнообразии фитопатогенного гриба и образцов штаммов *Pyricularia oryzae* Cav., выделенных из гербарного материала с признаками поражения болезнью, собранного в рисовых агрофитоценозах рисосеющих зон юга России.

Это позволит в дальнейшем проводить сравнительную характеристику микросателлитного профиля вновь выделенного полевого штамма патогена *P.oryzae* с имеющимися в базе данных, оценивая, тем самым, степень их генетического родства.

Полученные данные были систематизированы при помощи программного комплекса Microsoft Office Excel 2007.

База данных состоит из шести взаимосвязанных таблиц, каждая из которых содержит закодированную информацию, отражающуюся в других таблицах в виде числового кода, об отдельном признаке или свойстве. Тип взаимосвязи между таблицами – «один ко многим». Это позволяет избежать путаницы в объемных данных, а также ошибок или повторяющихся значений.

Структура таблиц и их взаимосвязь показана на рисунке 59.

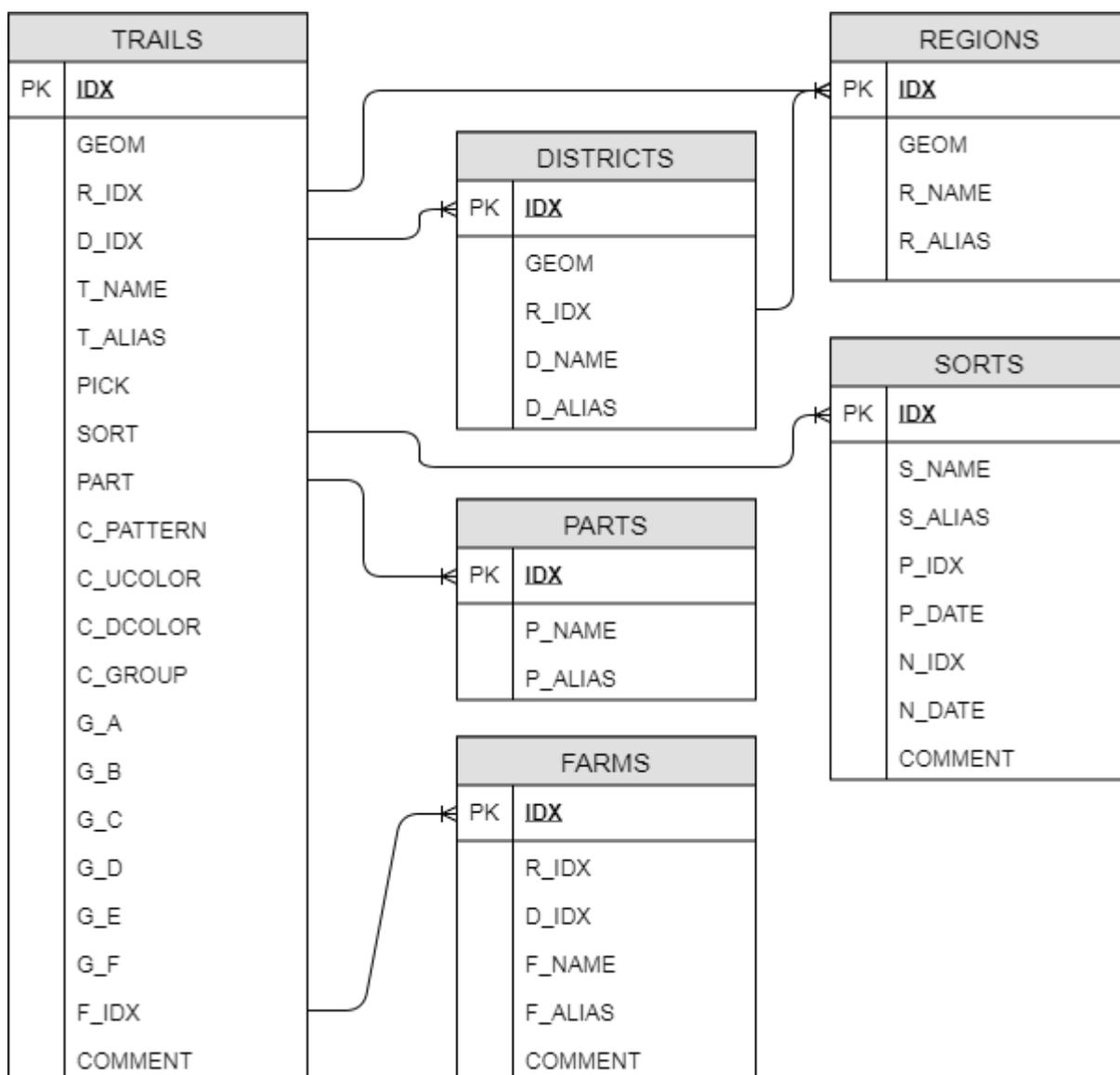


Рисунок 59 - Структура таблиц и их взаимосвязь

В таблице «TRAILS» представлена коллекция выделенных штаммов *P.oryzae* с атрибутивной информацией, определяющей: административное положение места отбора образца (R_IDX, D_IDX); читаемое наименование и псевдоним (T_NAME, T_ALIAS); дату отбора (PICK); сорт и часть растения (SORT, PART), с которого взят образец; морфологические особенности колонии штамма (C_PATTERN, C_UCOLOR, C_DCOLOR, C_GROUP); его генотип (G_A, G_B, G_C, G_D, G_F, G_E); хозяйствующий субъект (F_IDX).

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
		R_IDX		D_IDX	T_NAME	T_ALIAS	PICK		SORT		PART	C_PATTERN	C_UCOLOR	C_DCOI
2	1	Краснодарский край	3	Абинский	5-13	5-13	15.07.13	10	Рапан	1	Лист	низкий войлок	от светло-о	черный
3	1	Краснодарский край	3	Абинский	6-13	6-13	15.07.13	2	Степняк	1	Лист	неоднородн	от серого до	черный
4	1	Краснодарский край	3	Абинский	13-13	13-13	01.08.13	3	Диамант	3	Ножка метел	низкий войлок	серый	светло-с
5	1	Краснодарский край	3	Абинский	14-13	14-13	02.08.13	4	Флагман	3	Ножка метел	низкий войлок	темно-серый	серо-кор
6	1	Краснодарский край	8	Красноармейский	4-13	4-13	27.06.13	5	Изумруд	1	Лист	низкий войлок	серый (мыш)	буро-чер
7	1	Краснодарский край	8	Красноармейский	10-13	10-13	30.07.13	6	Хазар	1	Лист	низкий войлок	темно-серый	от темно
8	1	Краснодарский край	8	Красноармейский	15-13	15-13	05.08.13	3	Диамант	2	узел	низкий войлок	оливково-се	коричне
9	1	Краснодарский край	8	Красноармейский	20-13	20-13	13.08.13	4	Флагман	2	узел	низкий войлок	однородный	светло-с
10	1	Краснодарский край	8	Красноармейский	21-13	21-13	13.08.13	8	Виктория	2	узел	неоднородн	от светло-се	от темно
11	1	Краснодарский край	42	г. Краснодар	3-13	3-13	11.07.13	4	Флагман	1	Лист	низкий войлок	темно-серый	серо-кор
12	1	Краснодарский край	42	г. Краснодар	9-13	9-13	25.07.13	4	Флагман	1	Лист	неоднородн	от светло-се	от корич
13	1	Краснодарский край	9	Крымский	7-13	7-13	15.07.13	4	Флагман	1	Лист	неоднородн	от светло-се	темно-ко
14	1	Краснодарский край	9	Крымский	11-13	11-13	30.07.13	9	Гарант	1	лист	неоднородн	от серого до	от общес
15	1	Краснодарский край	9	Крымский	12-13	12-13	30.07.13	10	Рапан	1	лист	низкий войлок	серый	черный
16	3	Ростовская область	0		8-13	8-13	18.07.13	11	Ивушка	1	лист	войлочный	от светло-се	от светл
17	1	Краснодарский край	12	Славянский	16-13	16-13	12.08.13	10	Рапан	3	ножка метел	неоднородн	от серого до	от темно
18	1	Краснодарский край	12	Славянский	17-13	17-13	13.08.13	12	Янтарь	4	метелка	ключковатый	светло-серый	черный
19	1	Краснодарский край	12	Славянский	18-13	18-13	13.08.13	10	Рапан	1	лист	неоднородн	от белого до	от светл
20	1	Краснодарский край	12	Славянский	19-13	19-13	13.08.13	6	Хазар	2	узел	высокий рыж	от светло-се	черный
21	1	Краснодарский край	13	Темрюкский	1-13	1-13	23.06.13	10	Рапан	1	лист	низкий войлок	серый	буро-кор
22	1	Краснодарский край	13	Темрюкский	2-13	2-13	27.06.13	6	Хазар	1	лист	неоднородн	от светло-се	черный
23	1	Краснодарский край	3	Абинский	60-13	60-13	30.07.14	4	Флагман	4	метелка	низкий войлок	темно-серый	черный
24	1	Краснодарский край	6	Калининский	37-14	37-14	16.07.14	10	Рапан	1	лист	неоднородн	от светло-се	от корич
25	1	Краснодарский край	6	Калининский	39-14	39-14	16.07.14	4	Флагман	1	лист	низкий войлок	темно-сер	черный

Система мониторинга штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav.

Каталог образцов

[Каталог / 2013 / Краснодарский край / Абинский район](#)

Наименование	Дата отбора	Сорт	Часть растения	Генотип					
				A	B	C	D	E	F
Образец 5-13	2013-07-15	Рапан	Лист	548	656	232	844	247	420
Образец 6-13	2013-07-15	Степняк	Лист	825	505	163	815	180	407
Образец 13-13	2013-08-01	Диамант	Ножка метелки	264	434	19	893	20	372
Образец 14-13	2013-08-02	Флагман	Ножка метелки	559	807	399	222	519	491

Рисунок 60 - Каталог штаммов *Pyricularia oryzae* Cav.

На рисунке 61 - «REGIONS» (Список регионов) представлен список регионов административного расположения места отбора образцов.

	A	B
1	R_NAME	IDX
2	Краснодарский край	1
3	Республика Адыгея	2
4	Ростовская область	3

Рисунок 61 - Список регионов

На рисунке 62 представлен список районов административного расположения.

	A	B
1	D_NAME	IDX
2	Тихорецкий	2
3	Абинский	3
4	Брюховецкий	4
5	Динской	5
6	Калининский	6
7	Кореновский	7
8	Красноармейский	8
9	Крымский	9
10	Приморско-Ахтарский	10
11	Северский	11
12	Славянский	12
13	Темрюкский	13

Рисунок 62 - Список районов административного расположения

На рисунке 63 представлен список всех районированных сортов риса и возделываемых в рисосеющих хозяйствах РФ.

	A	B
1	S_NAME	IDX
2	Титан	1
3	Степняк	2
4	Флагман	4
5	Изумруд	5
6	Хазар	6
7	Флагман	7
8	Виктория	8
9	Гарант	9
10	Рапан	10
11	И	11

Рисунок 63 - Список сортов

На рисунке 64 представлен список частей растения, с которых был выделен штамм патогена *Pyricularia oryzae* Cav.

	A	B
1	P_NAME	IDX
2	Лист	1
3	Узел	2
4	Ножка метелки	3
5	Метелка	4

Рисунок 64 - Список частей растения риса, с которых выделен штамм *Pyricularia oryzae* Cav.

Рисунок 65 формирует список хозяйствующих субъектов и географию отбора образца.

	A	B
1	F_NAME	IDX
2	ООО «Анастасиевское»	1
3	ОСХ «Красное»	2
4	ООО «Красное Знамя»	3

Рисунок 65 - Список рисосеющих хозяйств, в которых отбирался гербарный материал

База данных выполнена в форме файла Microsoft Excel (.xls) и позволяет не только хранить и систематизировать информацию, но и быстро оперировать ею – создавать любые запросы, формировать отчеты в удобном виде и при этом избегать ввода повторяющихся значений (рисунок 66).

На рисунке 66 представлены основные характеристики штамма, где указывается название штамма, регион, район, где был собран гербарный материал, сорт, который поразила болезнью, часть растения, с которого был выделен штамм, его морфолого-культуральные признаки и «ДНК-паспорт».

Система мониторинга штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav.

Образец 28.8

Каталог / 2018 / Краснодарский край / Краснодар / Образец 28.8

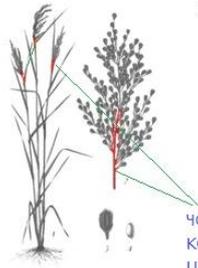
Регион Краснодарский край	Район г. Краснодар	Часть растения Ножка метелки	Дата отбора 2018-08-01		
			Сорт Партнёр		
Морфологические признаки колонии		часть растения, с которой выделен штамм			
Характер роста рыхлый клочковатый и низкий порошистый	Верхний мицелий серый	Нижний мицелий светло-серый			
Генотип					
A	B	C	D	E	F
130	175	182	206	214	219

Рисунок 66 - Основные сведения о штамме *Pyricularia oryzae* Cav.

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 пирикуляриозу, а также для контроля за изменчивость гриба. В настоящее время коллекционные штаммы пересеяны на свежую питательную среду и заложены на хранение в холодильник при температуре + 4.С.

Представленная база данных может быть использована фитопатологами и селекционерами при создании и территориальном размещении устойчивых к патогену сортов риса, научно-исследовательскими учреждениями, занимающимися изучением структуры популяций возбудителя пирикуляриоза, преподавателями учебных ВУЗов, читающими курс лекций по популяционной биологии грибов.

3.5 Определение генов (а)вирулентности высоковарибельного грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav.

В рамках наших исследований одной из целей было определение эффективных генов устойчивости к пирикуляриозу, а также генов (а)вирулентности патогена *Pyricularia oryzae* Cav. Для её достижения нами с использованием Международного набора сортов-дифференциаторов рас пирикулярии, полученного из Международного института риса (IRRI, Филиппины) и Института сельскохозяйственной генетики (Ханой, Вьетнам), выявлены эффективные для юга России гены резистентности гриба *Pyricularia oryzae* Cav. (табл. 13): Pi-i, Pi-ta, Pi -z¹, Pi -k-m, Pi -sh, Pi -ta², Pi -z⁵, Pi -9, Pi -3, Pi -kh, Pi -t, Pi -19.

Такое количество генов связано, прежде всего, с тем, что до сих пор нет четкой символики определения генов. Например, при изучении ряда литературных источников работа, проведенная Inukai T. (1994), показала, что *Pi-2* является аллелью гена *Pi-z* (Inukai et al., 1994). Это подтвердили

и последующие исследования молекулярных генетиков. Так, в более поздних научных работах обозначение гена $Pi-z^5$ встречается как идентичное $Pi-2$. Большая путаница наблюдалась при записи для таких генов устойчивости, как, например, $Pi-k-h$, $Pi-kh$, $Pi-kh$, $Pi-k^h$ и $Pi-k^h$. Или один и тот же символ гена был присвоен различным генам (Ballini et al., 2008). Поэтому сообщество исследователей пирикулярриоза риса должно нести ответственность за символику новых генов, чтобы избежать запутанной ситуации.

Главными критериями определения генов (а)вирулентности служило наличие реакции у растений сортов-дифференциаторов риса на заражение краснодарской популяцией патогена *Pyricularia oryzae Cav* и тип реакции. В результате изучения генов вирулентности из 45 сортов-дифференциаторов наличие реакций на заражение изолятами *P.oryzae Cav*. наблюдалось у 14. В таблице 17 приведены результаты фитопатологического тестирования на устойчивость к краснодарской популяции патогена при искусственном заражении сортов - дифференциаторов риса.

Таблица 17 - Устойчивость к пирикулярриозу сортов-дифференциаторов риса с генами резистентности при искусственном заражении на вегетационной площадке ФГБНУ «ВНИИ риса» (2015 г.)

№ п/п	Регистрационный номер	Название сорта	Ген устойчивости	Реакция сорта	Ген вирулентности
1	11366	Sha-tiao-tsao	$Pi-k^s$	R	
2	11367	Ishikari-shiroke	$Pi-i$	S	$Av-i^+$
3	11370	Usen	$Pi-a$	R	
4	11373	Yaschiro-mochi	$Pi-ta$	S	$Av-ta^+$
5	11375	Toride-1	$Pi-z^t$	S	$Av-z^{t+}$
6	11377	Minehikari	$Pi-m$	R	
7	11382	CO39	No R gene	S	
8	11385	IRBIK-KU [CO]	$Pi-k$	R	

Продолжение таблицы 17					
№ п/п	Регистрационный номер	Название сорта	Ген устойчивости	Реакция сорта	Ген вирулентности
9	11388	IRB1Km-TS [CO]	Pi-k-m	S	Av-k-m ⁺
10	11389	IRB1Kp-K60 [CO]	Pi-k-p	MS	
11	11390	IRB11 -La [CO]	Pi-1	R	
12	11391	IRB17-M [CO]	Pi-7(t)	R	
13	11392	IRB1 sh-Ku [CO]	Pi-sh	S	Av-sh ⁺
14	11395	IRB1 ta – Ja [CO]	Pi-ta	R	
15	11396	IRB1 ta – ME [CO]	Pi-ta	MS	
16	11399	IRB1 ta ² – IR64 [CO]	Pi-ta ²	S	Av-ta ²⁺
17	11400		Pi-z ⁵	S	Av-z ⁵⁺
18	11405	IRB19 – W [LT]	Pi-9	S	Av-9 ⁺
19	11406	IRB13 – CP 4 [LT]	Pi-3	S	Av-3 ⁺
20	11409	IRB1 K3 [LT]	Pi-kh	S	Av-kh ⁺
21	11431	IRB1 -Fu	Pi-z	R	
22	11433	IRB1 zt-T	Pi-z ^t	S	Av-z ^{t+}
23	11436	IRBL b-B	Pi-b	R	
24	11437	IRB1t- K59	Pi-t	S	Av-t ⁺
25	11445	IRB112 - M	Pi-12(t)	R	
26	11446	IRB119 - A	Pi-19	S	Av-19 ⁺
27	11451	IRB111-Zh	Pi-11 (t)	R	
28	St	Новатор		S	
29	-	Сонет		R	

Таблица 18 - Полевой тест на устойчивость к краснодарской популяции пирикуляриоза сортов-дифференциаторов риса на рисовой оросительной системе ФГУЭСИ «Красное» ВНИИ риса по предшественнику многолетние травы (2016 г.)

№ п/п	Название сорта	Ген устойчивости	Реакция сорта	Ген вирулен-ти
1	Bl-1	Pi-b	MS (25, 6%)	
2	IR-36	Pi-ta	MS (25, 6%)	
3	C101	Pi-33	R (18, 9%)	
4	C101	Pi-1	R (18, 9%)	
5	Toride-1	Pi-z ^t	S (41, 1%)	Av-z ^{t+}
6	CO39	No R gene	S (46,7)	Av-a ⁺
7	Aichi-Asahi	Pi-a	R (16,7%)	
8	C104PKT	Pi-k	R (12, 2 %)	
9	Dular	Pi-	R (2,2%)	
10	Pi-n ^o 4	Pi-ta ²	MS (37,0%)	
11	Moroberecan	Pi-5	MS (43,3%)	
12	75-11-127	Pi-9	MS (45,6%)	
13	K 60	Pi-k-p	MS (27,8%)	
14	K 3	Pi-k-h	R (24,4 %)	
15	Zenith	Pi-z, Pi-a	MS (31,1%)	

Выявленные гены устойчивости к пирикуляриозу к краснодарской популяции патогена *P. oryzae* Cav. рекомендованы для использования в селекционных программах по созданию резистентных к заболеванию сортов риса в рисосеющих зонах юга России.

Нами составлена и зарегистрирована база данных «Анализ популяций возбудителя пирикуляриоза риса (*Pyricularia oryzae* Cav.) на юге России по признаку вирулентности» (приложение 23, 24). База данных содержит фактический материал о генах (а)вирулентности. Полученные данные были систематизированы в программе Microsoft office Access 2007. База данных состоит из четырёх взаимосвязанных таблиц, каждая из которых содержит

закодированную информацию об отдельном признаке или свойстве, отражающуюся в других таблицах в виде числового кода. Тип взаимосвязи между таблицами – «один ко многим». Это позволяет избежать путаницы в объемных данных, а также ошибок или повторяющихся значений. Структура таблиц и их взаимосвязь показана на рисунке 67.

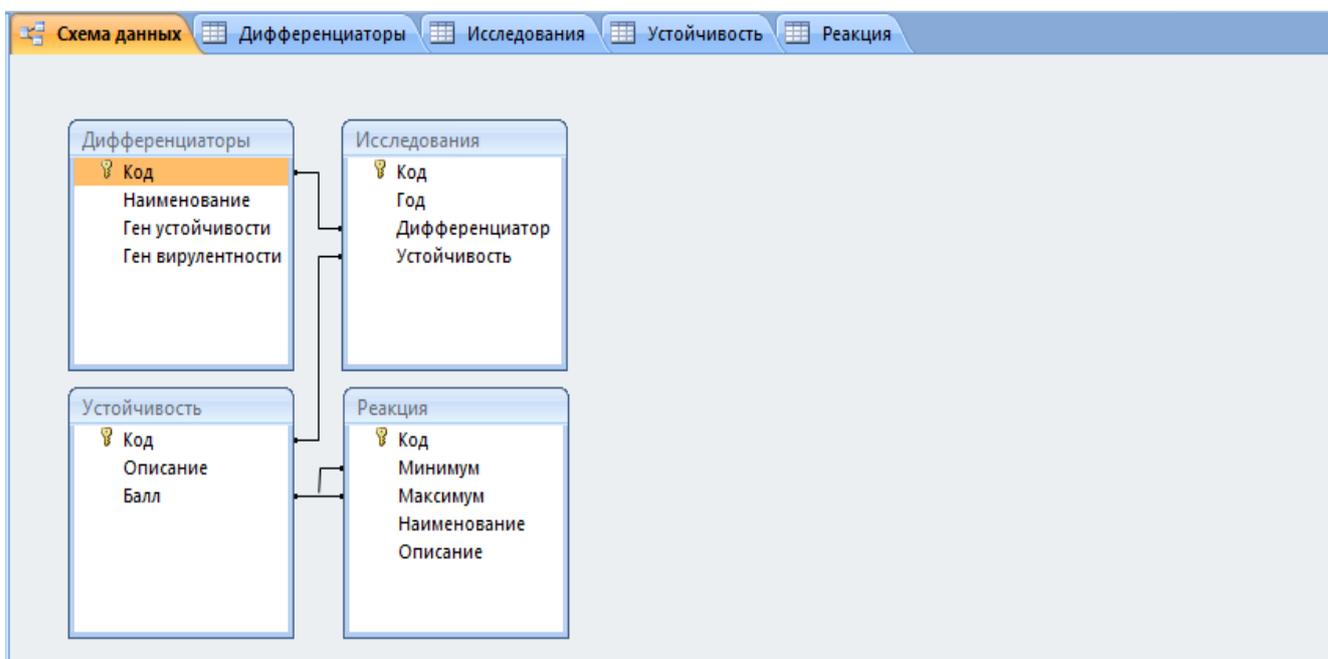


Рисунок 67- Структура таблиц и их взаимосвязь

Главными критериями определения генов вирулентности служило наличие альтернативной реакции у растений сортов-дифференциаторов риса на заражение краснодарской популяцией патогена *Pyricularia oryzae Cav* и тип реакции. В результате изучения генов вирулентности из 25 сортов-дифференциаторов наличие альтернативных реакций на заражение изолятами *P.oryzae Cav*. наблюдалось у 11 (таблица 14).

На рисунке 68 представлена таблица базы данных, в которой представлены сорта-дифференциаторы и данные по собственным им генам устойчивости и воздействующим на них генам вирулентности.

Код	Наименование	Ген устойчивости	Ген вирулентности	Добавить поле
1	Sha-tiao-tsao	Pi-k(s)		
2	Ishikari-shiroke	Pi-l	Av-i(+)	
3	Usen	Pi-a		
4	Toride-1	Pi-z	Av-z(t+)	
5	Minehikari	Pi-m		
6	IRBIK-KU [CO]	Pi-k		
7	IRBIK-m-TS [CO]	Pi-k-m	Av-k-m(+)	
8	IRBIK-p-K60 [CO]	Pi-k-p		
9	IRBI1-La [CO]	Pi-1		
10	IRBI7-M [CO]	Pi-7(t)		
11	IRBI sh-KU [CO]	Pi-sh	Av-sh(+)	
12	IRBI ta-Ja [CO]	Pi-ta		
13	IRBI ta2-IR64 [CO]	Pi-ta(2)	Av-ta(2+)	
14		Pi-z5	Av-z5+	
15	IRBI9-W [LT]	Pi-9	Av-9+	

Рисунок 67 - «Сорта-дифференциаторы риса»

На рисунке 68 представлена таблица «Исследования», в которой отмечены параметры и результаты исследований по устойчивости сортов-дифференциаторов к заражению патогеном. Каждый объект исследований связан с дифференциатором и типом устойчивости посредством соответствующих идентификаторов.

Код	Год	Дифференциатор	Устойчивость	Добавить поле
1	2016	Sha-tiao-tsao	1	
2	2016	Ishikari-shiroke	5	
3	2016	Usen	0	
4	2016	Toride-1	6	
5	2016	Minehikari	1	
6	2016	IRBIK-KU [CO]	2	
7	2016	IRBIK-m-TS [CO]	6	
8	2016	IRBIK-p-K60 [CO]	4	
9	2016	IRBI1-La [CO]	1	
10	2016	IRBI7-M [CO]	0	
11	2016	IRBI sh-KU [CO]	5	
12	2016	IRBI ta-Ja [CO]	1	
13	2016	IRBI ta2-IR64 [CO]	5	
14	2016		5	
15	2016	IRBI9-W [LT]	6	
16	2016	IRBI9-W [LT]	5	

Рисунок 68 – Таблица базы данных «Исследования»

Таблица 16 - «Устойчивость» определяет балльную оценку устойчивости дифференциатора к патогену в рамках одного исследования и позволяет логически определить реакцию дифференциатора к воздействию патогена посредством градации по максимальному и минимальному значению баллов оценки.

Таблица «Устойчивость», представленная на рисунке 69 определяет бальную оценку устойчивости дифференциатора к патогену в рамках одного исследования и позволяет логически определить реакцию дифференциатора к воздействию патогена посредством градации по максимальному и минимальному значению баллов оценки.

Код	Описание	Балл	Добавить поле
1	Поражения отсутствуют	0	
2	Единичные коричневые точки	1	
3	Многочисленные мелкие точки	2	
4	Маленькие округлые пятна около 2 мм в диаметре с серым центром	3	
5	Типичные пятна перекуляриоза, эллиптические, 1-2 см, поражено 2%	4	
6	Типичные пятна, поражено до 10% площади листа	5	
7	Типичные пятна, поражено до 25% площади листа	6	
8	Типичные пятна, поражено до 50% площади листа	7	
9	Типичные пятна, поражено до 75% площади листа	8	
10	Типичные пятна, поражено до 100% площади листа	9	
*	(№)		

Рисунок 69 – Таблица «Устойчивость» базы данных

Таблица 17 - «Реакция» определяет градацию бальной оценки устойчивости дифференциатора к воздействию патогена в рамках исследований.

Таблица «Реакция» определяет градацию бальной оценки устойчивости дифференциатора к воздействию патогена в рамках исследований (рис. 70).

Код	Минимум	Максимум	Наименова	Описание	Добавить поле
1	0	2	R	Устойчивый	
2	3	4	M	Промежуточный	
3	5	6	S	Восприимчивый	
4	7	9	SS	Сильновосприимчивый	
*	(№)				

Рисунок 70 – Таблица «Реакция» базы данных

База данных, расположенная в программе Microsoft Access, позволяет не просто хранить информацию, но и быстро оперировать ею – создавать любые запросы, формировать отчеты в удобном виде и при этом избегать ввода повторяющихся значений.

Представленная база данных может быть использована селекционерами при создании устойчивых к патогену сортов, научно-исследовательскими учреждениями, занимающимися изучением структуры популяций возбудителя пирикулярриоза, преподавателями учебных ВУЗов, читающими курс лекций по популяционной биологии грибов.

3.6 Оценка уровня гибридности гибридов F_1 *Brassica oleracea* L. с использованием SSR-маркеров

В последние годы в связи с тенденцией увеличения количества новых гибридов F_1 капусты белокочанной в современном отечественном семеноводстве назрела необходимость разработки новой, более совершенной схемы контроля уровня гибридности, а также сортовой чистоты семян F_1 .

Для «гетерозисных» культур (капуста, подсолнечник и т.д.) определение гибридности особенно важно. Это связано, прежде всего, с тем, что семенной материал реализуемых партий данных культур должен отвечать требованиям Закона РФ «О семеноводстве и процент гибридных зенок не должен быть ниже 98% . В существующей системе семеноводства на сегодняшний день этот процент определяют традиционными методами апробации посевов или грунт-контролем (Закон РФ «О семеноводстве»). Такую ситуацию нельзя признать удовлетворительной, так как существуют гибриды, не отличимые по морфологическим признакам.

Наличие надежного экспресс-метода оценки генетической однородности реализуемых семян гибридов капусты белокочанной чрезвычайно важно для качественного семеноводства (Артемьева и др., 2009).

Современные биотехнологические методы (генотипирование микросателлитных локусов ДНК) позволяют решить эту проблему с высокой точностью (Louarn S et al., 2007). Как отмечалось ранее, микросателлиты представляют собой простые, наиболее доступные, удобные и относительно недорогие маркеры, пригодные, прежде всего, для идентификации генотипов. Они стабильны в соматических клетках, локуспецифичны, их наследование, как правило, носит кодоминантный характер, что позволяет отличать гомозиготное состояние исследуемого локуса ДНК от гетерозиготного.

Целью данного раздела исследований являлась разработка методической системы оценки генетической чистоты 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 на сайте [www. VegMarks](http://www.VegMarks).

Проведена оптимизация параметров постановки ПЦР (основные компоненты реакционной смеси и параметры циклов амплификации) для вновь отобранных микросателлитных маркеров. Составлен протокол реакции амплификации, при котором ДНК-продукты четко визуализируются (табл.18).

Амплификацию проводили на амплификаторе компании «Bio-Rad», а также «Терцик», Россия. Протокол проведения ПЦР представлен в таблице 20.

Таблица 20 - Параметры проведения реакции амплификации.

Шаг реакции	Температура, °С	Продолжительность, минут	Число циклов
I. Начальная денатурация	95	15	1
II. Денатурация	94	2	1

Продолжение таблицы 20			
Шаг реакции	Температура, °С	Продолжительность, минут	Число циклов
III. Денатурация	94	1	1
Отжиг праймеров	65	30 сек.	1
Синтез	72	45 сек.	1
Затем каждый второй цикл температуру отжига снижаем на 1 °С до достижения температуры 55°С			
IV. Денатурация	94	1	20
Отжиг праймеров	55	30 сек	20
Синтез	72	45 сек	20
Завершающий синтез	72	1	1

При проведении SSR-анализа в данных условиях продукты амплификации с использованием вышеуказанных молекулярных маркеров чётко визуализировались.

Результаты оценки уровня полиморфизма использованных в работе SSR-маркеров между родительскими формами капусты белокочанной представлены на рисунках 62- 65.

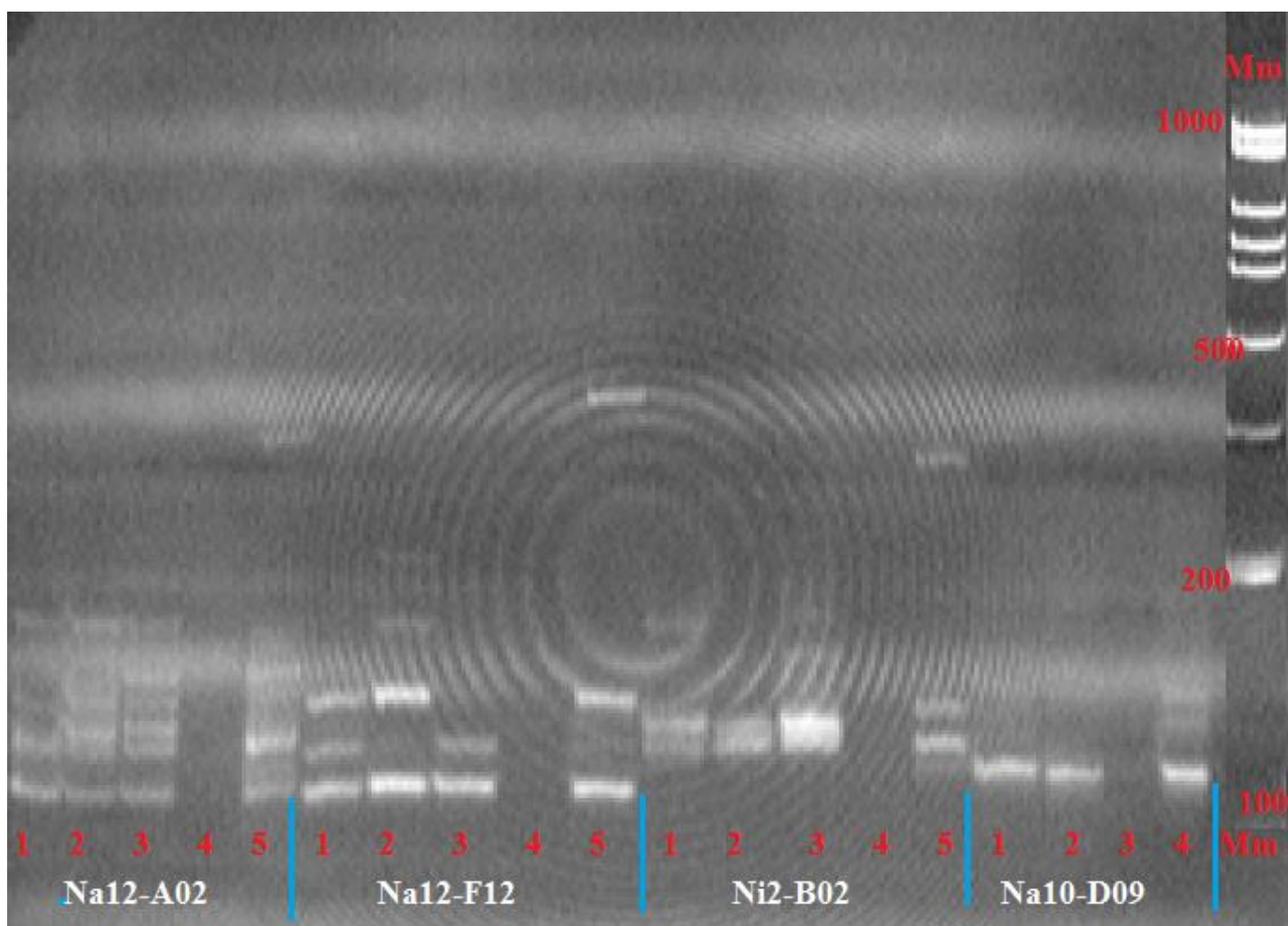


Рисунок 62 - Визуализация продуктов амплификации в SSR - локусах Na12-A02, Na12-F12, Ni2-B02, Na10-D09 у линий *Brassica oleracea* L.

Примечание: дорожка №1- линия капусты белокочанной Кт1; дорожка № 2 - линия Бс1ф дорожка № 3 - линия Пи 714, дорожка № 4 - линия Хн1ф 144-2; дорожка № 5 - линия 270-488.

Рисунок 62 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 овощекртофелеводства ФГБНУ «ВНИИ риса», наблюдается по локусам Na12-F12 и Na12-A02.

На рисунке 63 также представлен полиморфизм, выявленный в четырёх SSR-локусах.

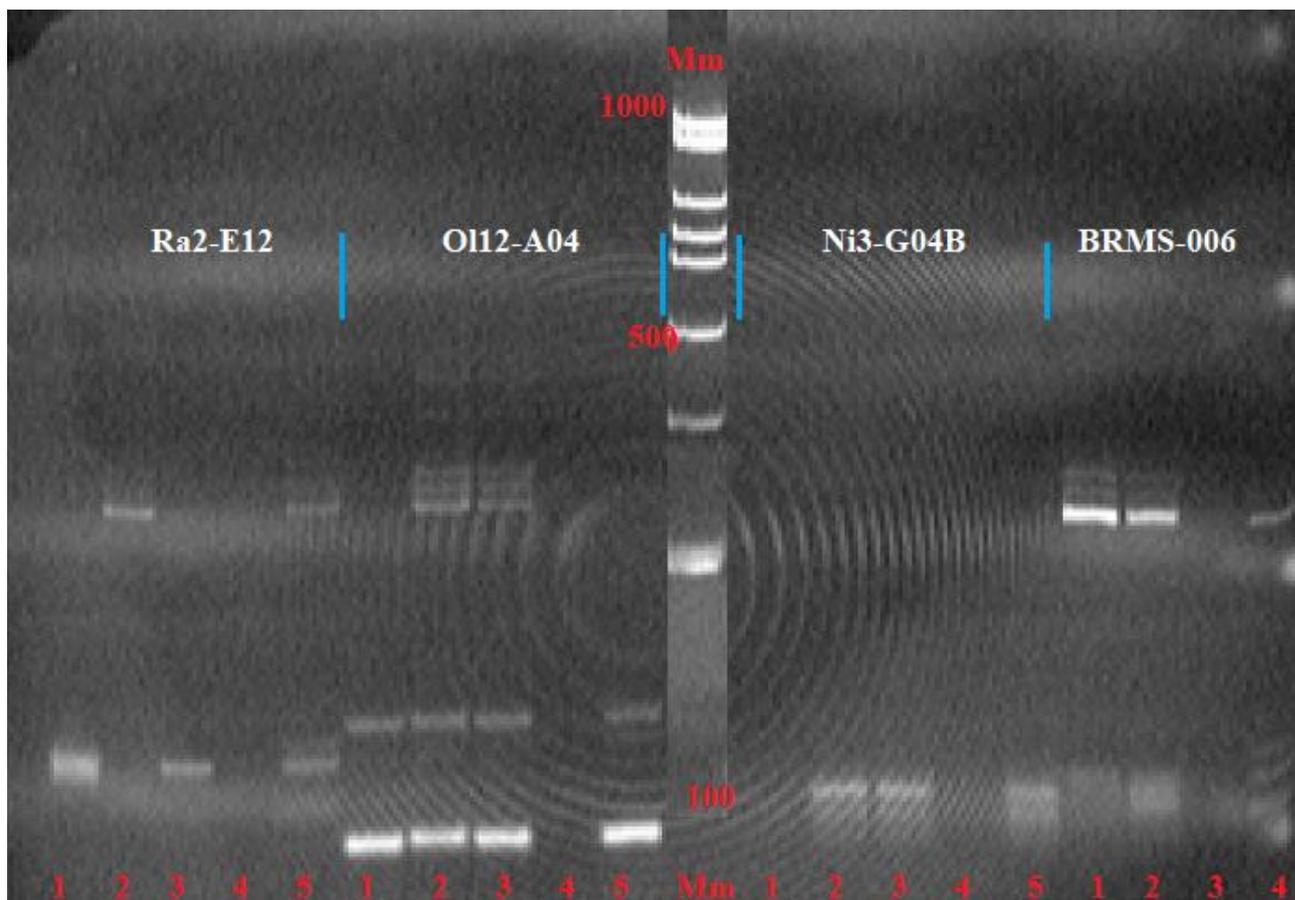


Рисунок 63 - Визуализация продуктов амплификации в локусах Ra2-E12, OI12-A04, Ni3-G04B, BRMS-006 у линий *Brassica oleracea L.*

Примечание: дорожка №1- линия капусты белокочанной Кт1; дорожка № 2 - линия Бс1ф; дорожка № 3 - линия Пи 714; дорожка № 4 - линия Хн1ф 144-2; дорожка № 5 - линия 270-488.

Электрофореграмма на рисунке 66 показывает, что заметные отличия по отдельным аллелям между родительскими формами капусты белокочанной отмечены только по локусу Ra2-E12. Все остальные изученные SSR-маркеры различий по ДНК-профилю между родительскими линиями *Brassica oleracea L.* не показали.

На рисунках 64, 65 представлено аллельное разнообразие по результатам ПЦР-анализа, используемых в работе SSR-маркеров между родительскими линиями *Brassica oleracea L.*

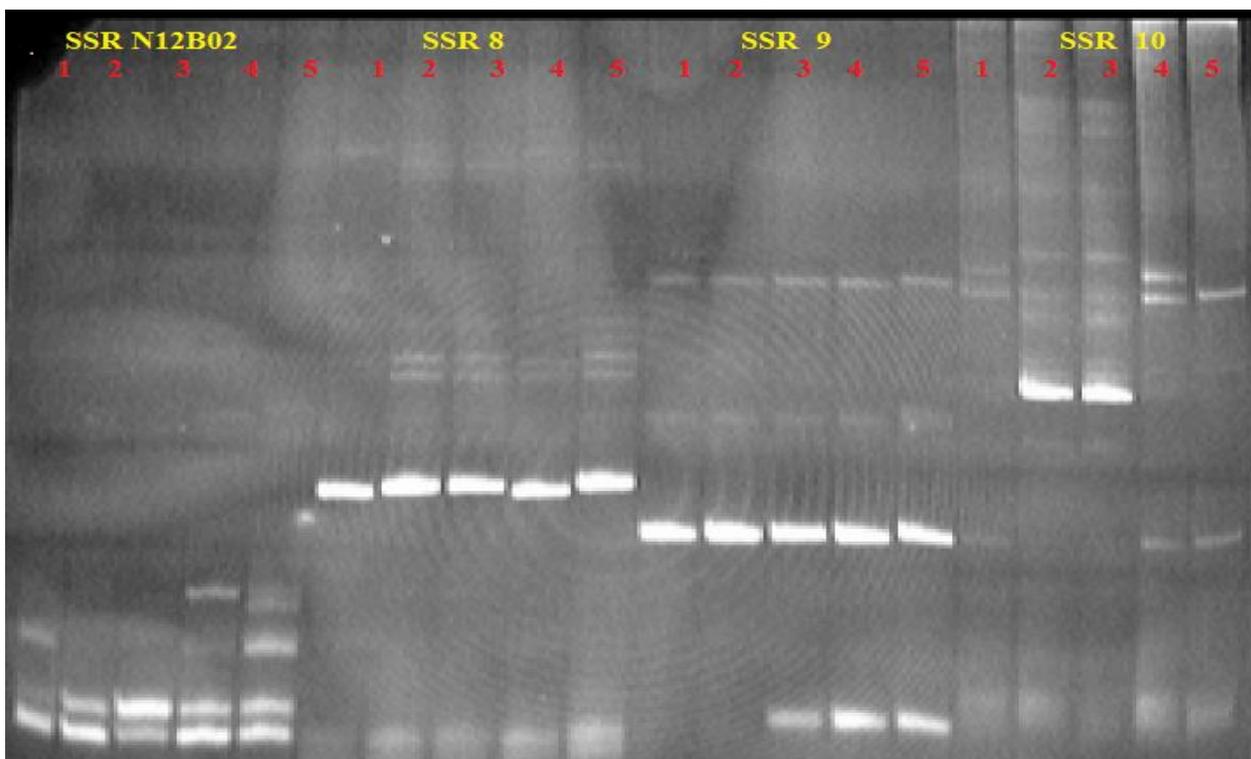


Рисунок 64 - Визуализация продуктов амплификации по маркерам Ni2-B02, SSR 8 – локус CC969459, SSR 9 – локус CC969497, SSR 10 – локус CC969507 у линий *Brassica oleracea L.*

Примечание: 1 – линия Тен 133-3; 2 – линия 272-510; 3 – линия 272 - 576; 4 – линия Бр129-10; линия 279 – 488.

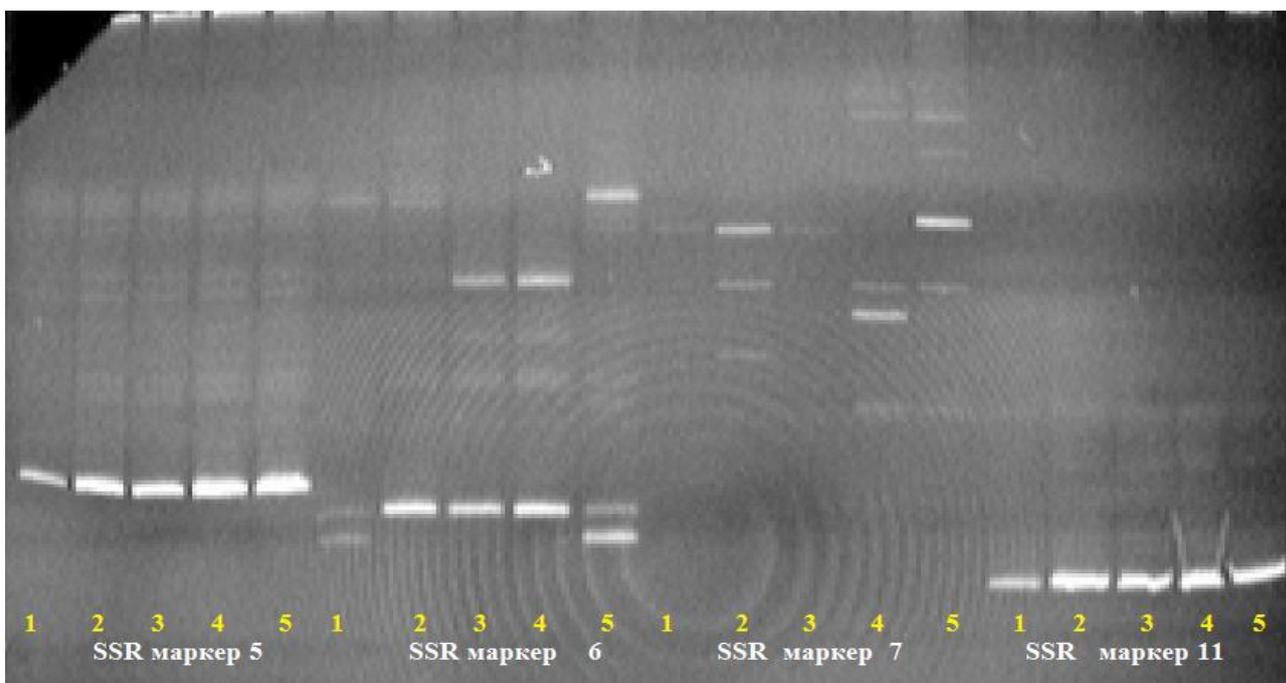


Рисунок 65 - Визуализация продуктов амплификации по маркерам 5, 6, 7, 11 у линий *Brassica oleracea L.*

Примечание: 1 – линия Тен 133-3; 2 – линия 272-510; 3 – линия 272 -576; 4 – линия Бр129-10; линия 279 – 488; маркерам 5 – локус СС956628, маркер 6 - локус СС956699, маркер 7 - локус СС969431, маркер 11 – локус Х94979.

Рисунки 64, 65 демонстрируют, что отличия по отдельным аллелям между родительскими формами капусты белокочанной отмечены по локусам Ni2B02, SSR 10, 6 и 7. Все остальные изученные SSR-маркеры различий по ДНК-профилю между родительскими линиями *Brassica oleracea* L. не показали.

Все изученные образцы показали между собой заметные отличия по отдельным аллельным состояниям. Идентификация изученных линий выполнялась на основании данных об аллельных состояниях использованных маркеров у каждого отдельно взятого генотипа с использованием программы Gel-Pro Analyzer 3.1.

На рисунке 66 представлена общая гистограмма для всех аллелей, отражающая общее количество и состав выявленных состояний для каждого локуса у изучаемых генотипов (рис. 66).

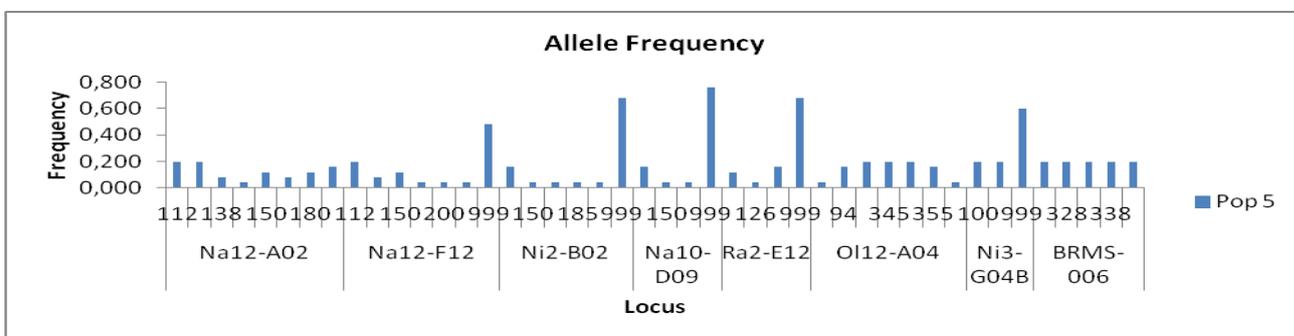


Рисунок 66 - Общая гистограмма по всем аллелям

Представленная гистограмма для всех аллелей отражает общее количество и состав выявленных состояний для каждого локуса в общей выборке генотипов. На ней указана частота встречаемости всех аллелей вместе. Названия аллелей зашифрованы как цифры, далее ниже - названия локуса. Шкала слева указывает частоту встречаемости, в которой 1 – это 100 %. Шкала снизу указывает количество пар нуклеотидов в ДНК изученных генотипов. Гистограмма показывает, что всего было обнаружено 28 аллельных состояний для 9 локусов в 5 образцах капусты белокочанной (в

среднем по 4 аллеля на locus). Наибольшее число аллелей (6-8) для данного набора генотипов было детектировано для локусов Na12-A02, Na12-F12, локализованных на разных хромосомах SSR маркера, 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 по 100 растений каждого гибрида F_1 капусты белокочанной, а также по одному образцу каждой родительской формы. Результаты оценки представлены на рисунке 67.

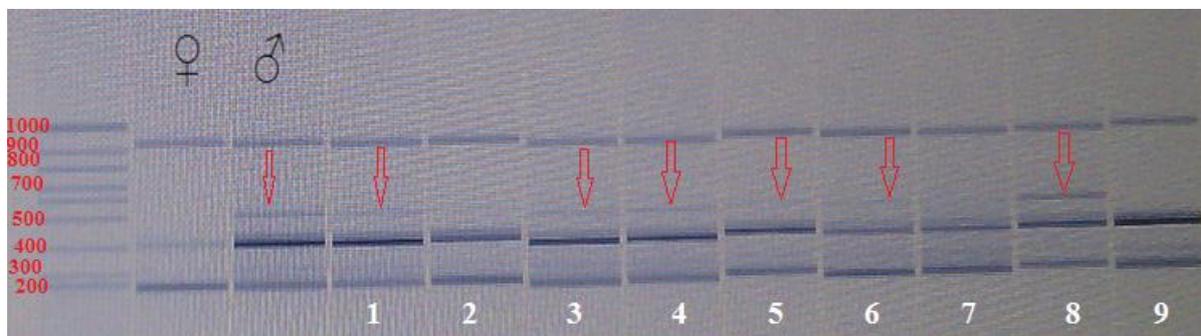


Рисунок 67 - Аллельная миграция в локусе **Na12-A02** гибрида F_1 капусты белокочанной Рица

Из 9 представленных на данной электрофореграмме семян, «отцовская» аллель присутствует у 6 (№№ 1, 3, 4, 5, 6, 8), которые, таким образом, являются гибридными. Остальные анализируемые семена несут аллель материнской формы, которые получены возможно в результате самоопыления. Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа составил 86,0 %. Гибринологический 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 проведённом нами исследовании определён набор наиболее информативных (полиморфных) SSR-локусов, которые были использованы для определения генетической чистоты (гибридности) гибридов F₁ капусты белокочанной коммерческих партий отдела овощекартофелеводства. Выявленный уровень полиморфизма микросателлитных локусов ДНК позволяет успешно использовать их как надёжный лабораторный метод оценки уровня гибридности семян гибридов F₁ капусты белокочанной.

3.7 Оценка уровня гибридности гибридов F₁ *Capsicum annuum* L. на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров.

Закон «О семеноводстве» устанавливает правовую основу деятельности по производству, заготовке, браковке, хранению и другому использованию семян сельскохозяйственных культур, а также по организации их семеноводства и сортового контроля. Вопрос о контроле сортовой чистоты семенного материала является актуальным. Основная гарантия качества семенного материала - создание отраслевой системы сертификации семян. Важнейшим элементом сертификации, как это предусмотрено международными нормами, должно быть проведение грунт-контроля, что позволит повысить ответственность производителей за качество семян. Для проведения сортового контроля используются следующие методы: лабораторный анализ, апробация, грунт-контроль. Грунт-контроль – метод проверки подлинности и чистоты сорта на различных этапах его размножения. Грунтовой контроль используется для подтверждения того, что свойства и признаки сорта остались неизменными в процессе воспроизводства семян.

Перец сладкий (*Capsicum annuum* L.) – один из самых древних и популярных видов овощных культур в мире. В семеноводстве этой культуры особенно актуальны проблемы определения гибридности коммерческих

партий семян у гибридов F_1 . Для решения этих задач возможно использование традиционного метода грунт-контроля, что требует значительной затраты времени и посевных площадей. Кроме этого, оценка по морфологическим признакам в значительной степени зависит от условий окружающей среды. Наиболее перспективные системы маркирования семенного материала основаны на оценке полиморфизма ДНК. В частности, микросателлитные повторы ДНК (SSR) стабильны в соматических клетках, локуспецифичны, их наследование, как правило, носит кодоминантный характер, что позволяет отличать гомозиготное состояние исследуемого локуса от гетерозиготного. Распределение по всему геному облегчает использование этих маркеров как для молекулярного картирования генома, так и для выполнения целого ряда прикладных селекционно-генетических задач.

Цель данного раздела работ состояла в разработке методической схемы оценки уровня гибридности (процент гибридных семян) для гибридов F_1 перца сладкого на основе ПЦР (микросателлитного) анализа и внедрение её в процесс семеноводства.

Для достижения указанной цели необходимо было выполнить следующие задачи:

- проработать информацию, накопленную по данному вопросу к настоящему времени в мировой практике;
- провести поиск «нейтральных» молекулярных маркеров в базе данных www.ncbi.nih.gov, подходящих для оценки сортовой чистоты, а также генетической однородности линий капусты белокочанной;
- выявить наиболее информативные маркеры, полиморфные между родительскими линиями гибридов;
- оптимизировать параметры ПЦР для отобранных маркеров и проведение SSR-анализа.

На первом этапе работ для оценки уровня гибридности гибридов F_1 перца сладкого на основе применения ДНК-маркирования нами был

проверен полиморфизм SSR-маркеров, между родительскими формами перца сладкого, используемыми в селекционной работе отделом овощекартофелеводства ФГБНУ «ВНИИ риса» (рис. 68-70). Затем на основании полученной информации, проводился контроль уровня гибридности коммерческих партий семян гибридов F₁ Памир (рис. 68- 70) и Фишт.

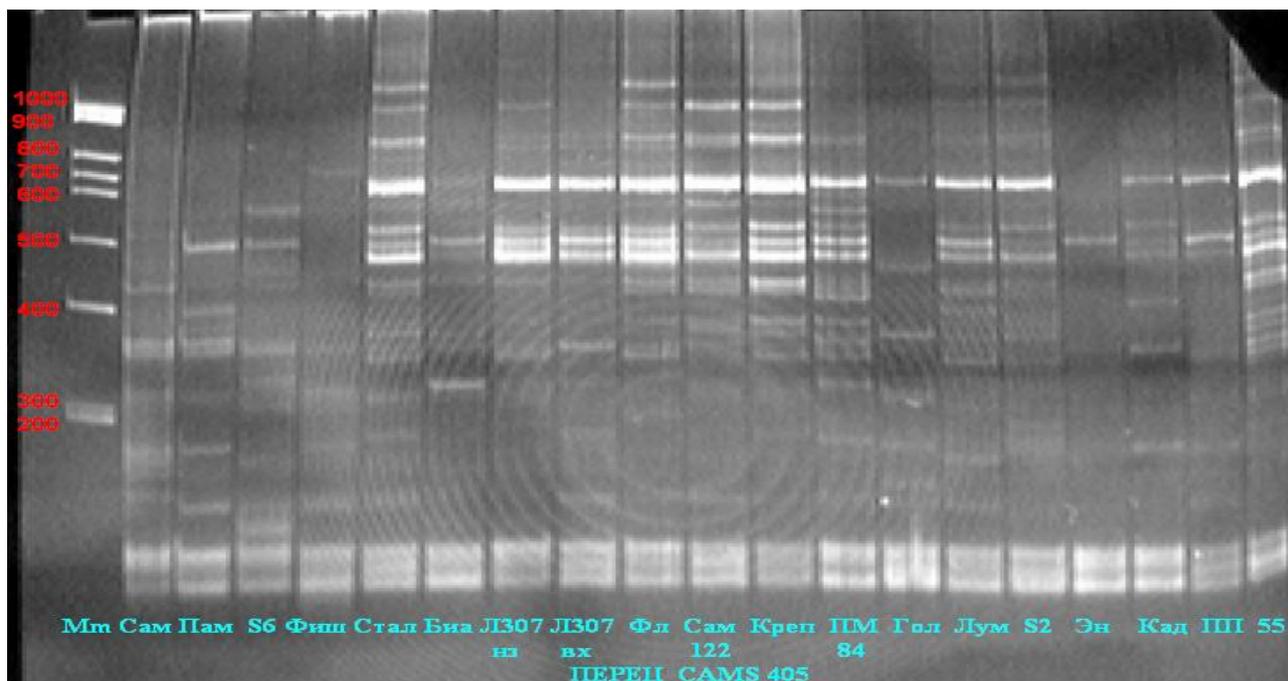


Рисунок 68 - Амплификация ДНК генотипов перца сладкого с парой праймеров SAMS-405

Примечание: Mm –маркер молекулярного веса, Сам – ms См, Пам – Памир F₁, S-6, Фиш – Фишт F₁, Стал –Zg 1, Биа – Биа132, Л307нз (плоды опущены вниз), Л307вх (плоды подняты вверх), Фл – Фламинго, Сам 122 – Сам 122, Креп - Креп 312, ПМ 84 - ПМ 84, Гл – ms Гл, Лум – ms Лум, S-2, Эн – ms Эн, Кад – ms Кад, ПП – ms Янт1, 55- Селигер F₁.

Рисунок 68 демонстрирует аллельное разнообразие анализируемых генотипов сладкого перца по локусу SAMS-405.

У исследованного набора образцов перца сладкого выявлено 16 аллелей по изученному микросателлитному локусу.

На рисунке 69 представлено аллельное разнообразие и показан высокий уровень полиморфизма анализируемых генотипов по локусу SAMS-117.

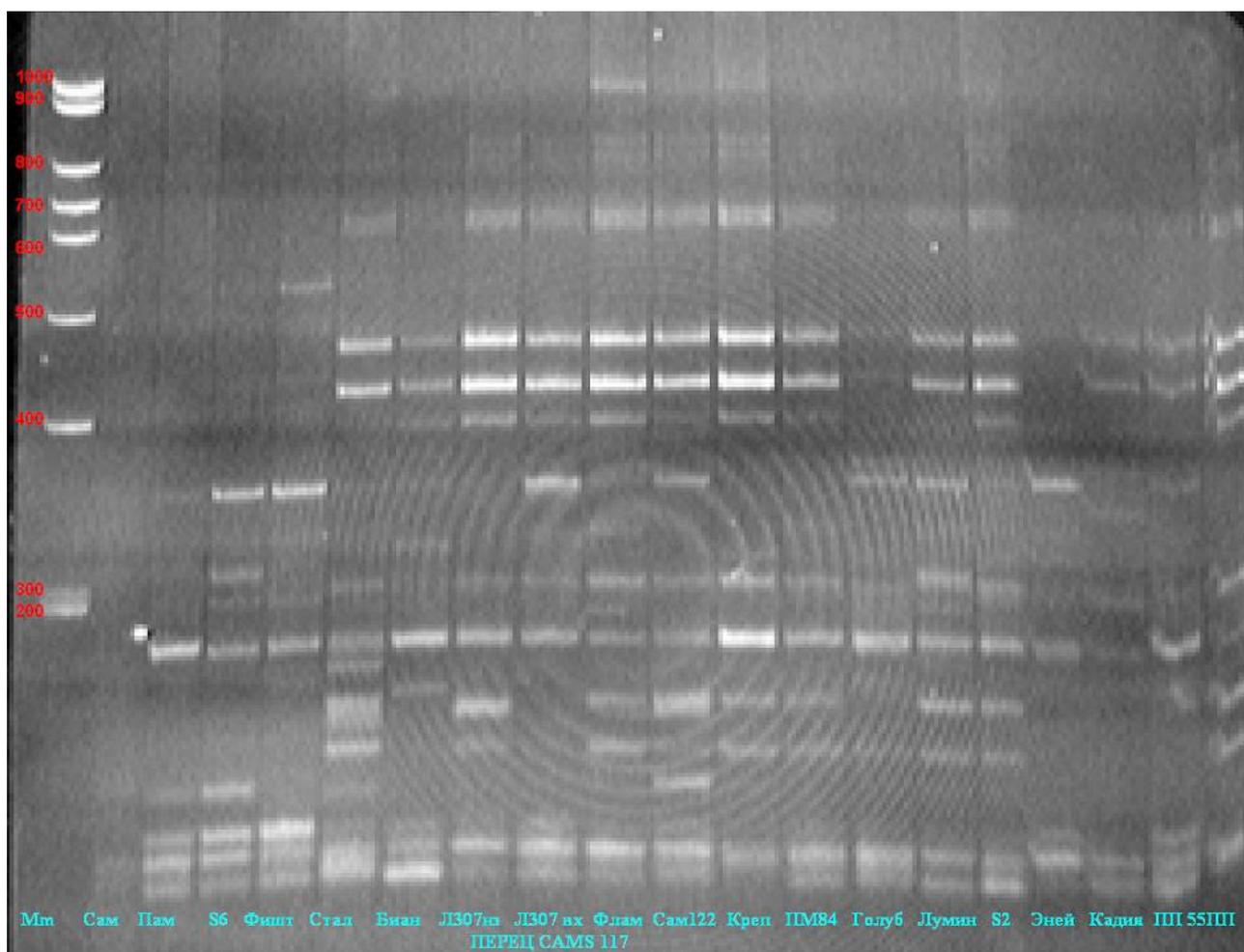


Рисунок 69 - Амплификация ДНК генотипов перца сладкого с парой праймеров SAMS-117

Примечание: Mm –маркер молекулярного веса , Сам – Сам122, Пам – Памир F₁, S-6, Фиш – Фишт F₁, Стал –Zg 1, Биа – Биа132, Л307нз (плоды опущены вниз), Л307вх (плоды подняты вверх), Фл – Фламинго, Сам 122 Самоцвет 122, Креп - Креп 312, ПМ 84 - ПМ 84, Гл – ms Гл, Лум – ms Лум, S-2, Эн – ms Эн, Кад – ms Кад, ПП – ms Янт1, 55- Селигер F₁.

По данному микросателлитному локусу у исследованного набора образцов перца сладкого выявлено 16 аллелей.

На рисунке 70 представлено аллельное разнообразие и показан высокий уровень полиморфизма анализируемых генотипов по локусу SAMS-142

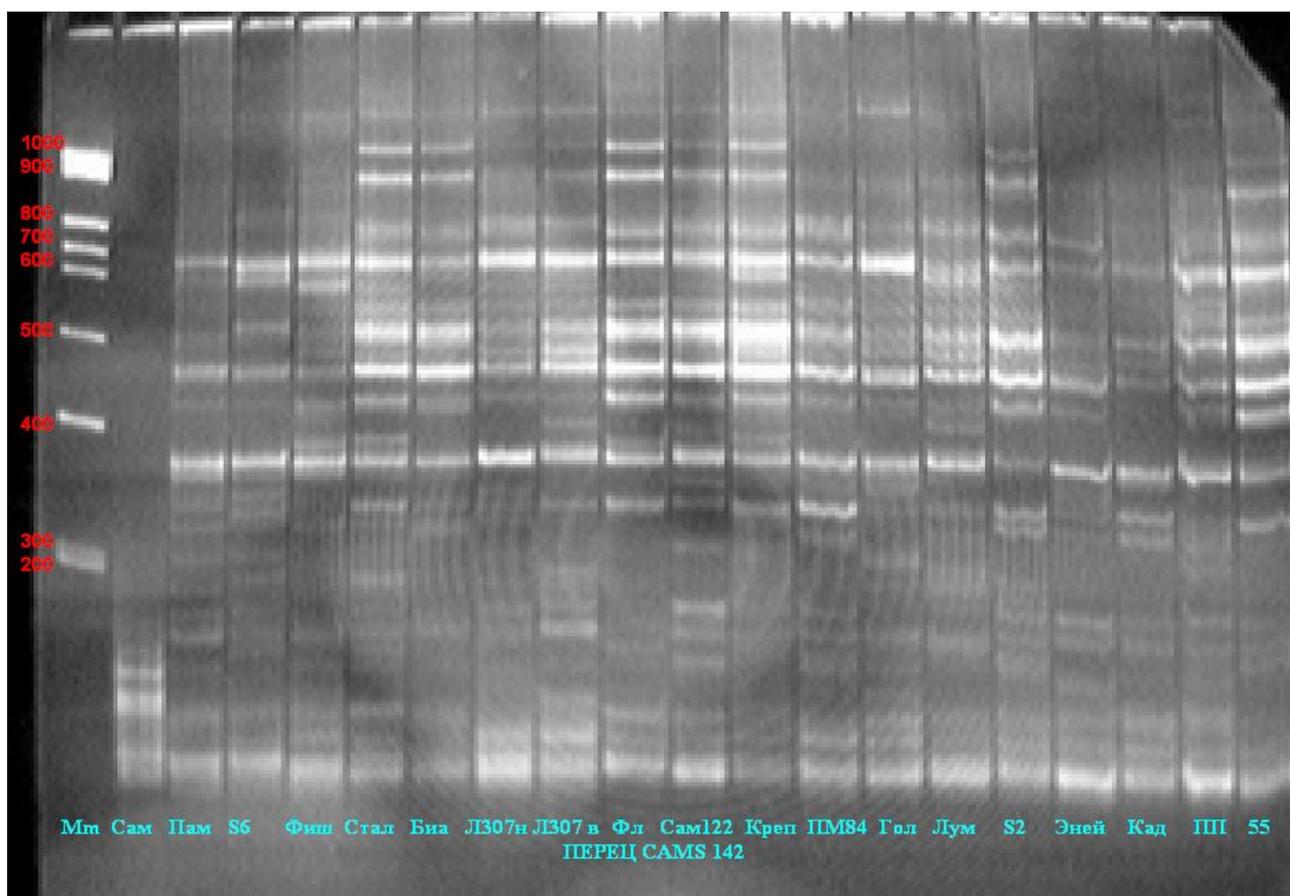


Рисунок 70 - Амплификация ДНК генотипов перца сладкого с парой праймеров SAMS-142

Примечание: Mm –маркер молекулярного веса , Сам – ms См, Пам – Памир F₁, S-6, Фиш – Фишт F₁., Стал –Zg 1, Биа – Биа132, ЛЗ07нз (плоды опущены вниз), ЛЗ07вх (плоды подняты вверх), Фл – Фламинго, Сам 122 Сам122, Креп - Креп 312, ПМ 84 - ПМ 84, Гл – ms Гл, Лум – ms Лум, S-2, Эн – ms Эн, Кад – ms Кад, ПП – ms Янт1, 55- Селигер F₁.

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

Проверен полиморфизм указанных молекулярных маркеров между родительскими линиями болгарского перца Самоцвет, S-6, ms ПМ 84, ms Голубок, ms Лумина, S-2, Бианка, используемые в селекционной работе отделом овощеводства (рис.71, 72).

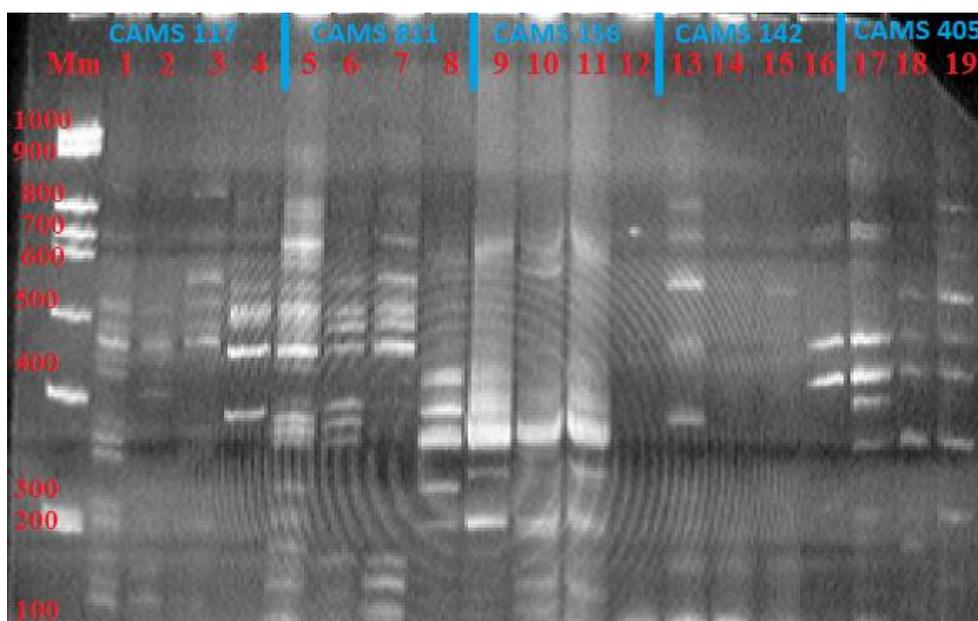


Рисунок 71 - Визуализация продуктов амплификации некоторых линий *Capsicum annuum L.* по маркерам CAMS-117, CAMS-811, CAMS-156, CAMS-142, CAMS-405

Примечание: дорожки №1, 5, 9, 13, 17 - линия болгарского перца Самоцвет; дорожки №2, 6, 10, 14, 18 - линия болгарского перца S-6 (материнская форма); № 3, 7, 11, 15, 19 - ms ПМ 84 (отцовская форма, закрепитель стерильности); дорожки № 4, 8, 12, 16 - ms Голубок (отцовская форма, закрепитель стерильности).

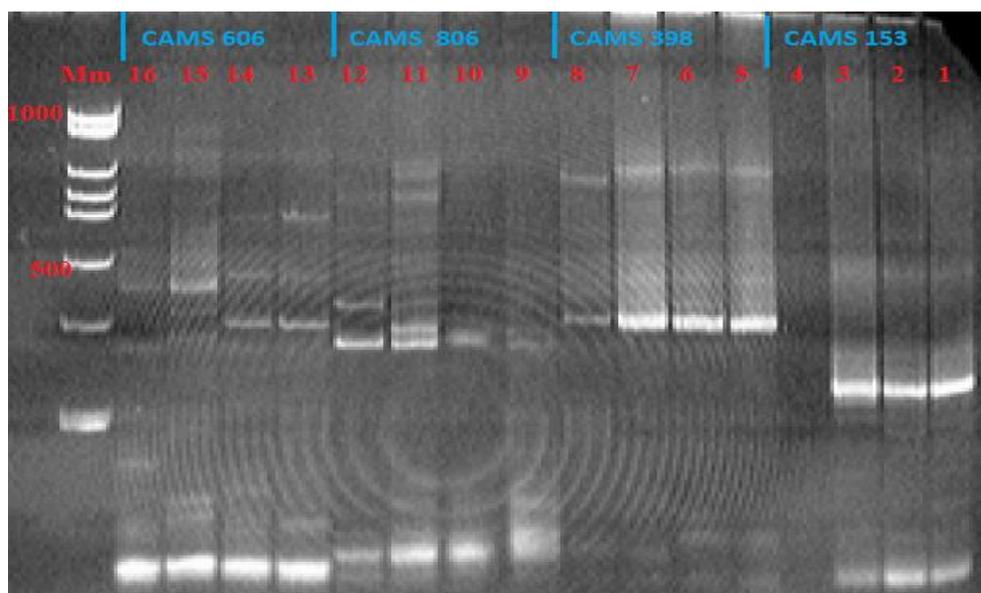


Рисунок 72 - Визуализация продуктов амплификации некоторых линий *Capsicum annuum L.* по маркерам CAMS-153, CAMS-398, CAMS-806, CAMS-606.

Примечание: дорожки №1, 5, 9, 13, 17 - линия болгарского перца Самоцвет; дорожки №2, 6, 10, 14, 18 - линия болгарского перца S-6 (материнская форма); № 3, 7, 11, 15, 19 - ms ПМ 84 (отцовская форма, закрепитель стерильности); дорожки № 4, 8, 12, 16 - ms Голубок (отцовская форма, закрепитель стерильности).

Все изученные образцы показали между собой заметные отличия по отдельным аллельным состояниям. Идентификация изученных образцов выполнялась на основании данных об аллельных состояниях использованных маркеров у каждого отдельно взятого генотипа с использованием программы Gel-Pro Analyzer 3.1.

Всего по изученным микросателлитным локусам у исследованного набора образцов перца болгарского 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 - 156, наименьшее (1-2) для локусов CAMS-398, CAMS-811 (Дубина и др., 2016 в).

Таким образом, по данным проведенного нами ПЦР-анализа 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).

Следующим этапом нашей работы было проведение ПЦР-анализа для оценки уровня гибридности районированных на территории Краснодарского края гибридов F₁ перца сладкого Фишт и Памир с использованием двух кодоминантных SSR-маркеров: CAMS-117, CAMS-142 (рис. 73-74).

Молекулярно-генетическую оценку процента гибридности болгарского (сладкого) перца F₁ Памир проводили, анализируя 100 растений. Исследования велись с использованием отобранного SSR-маркера CAMS 142.

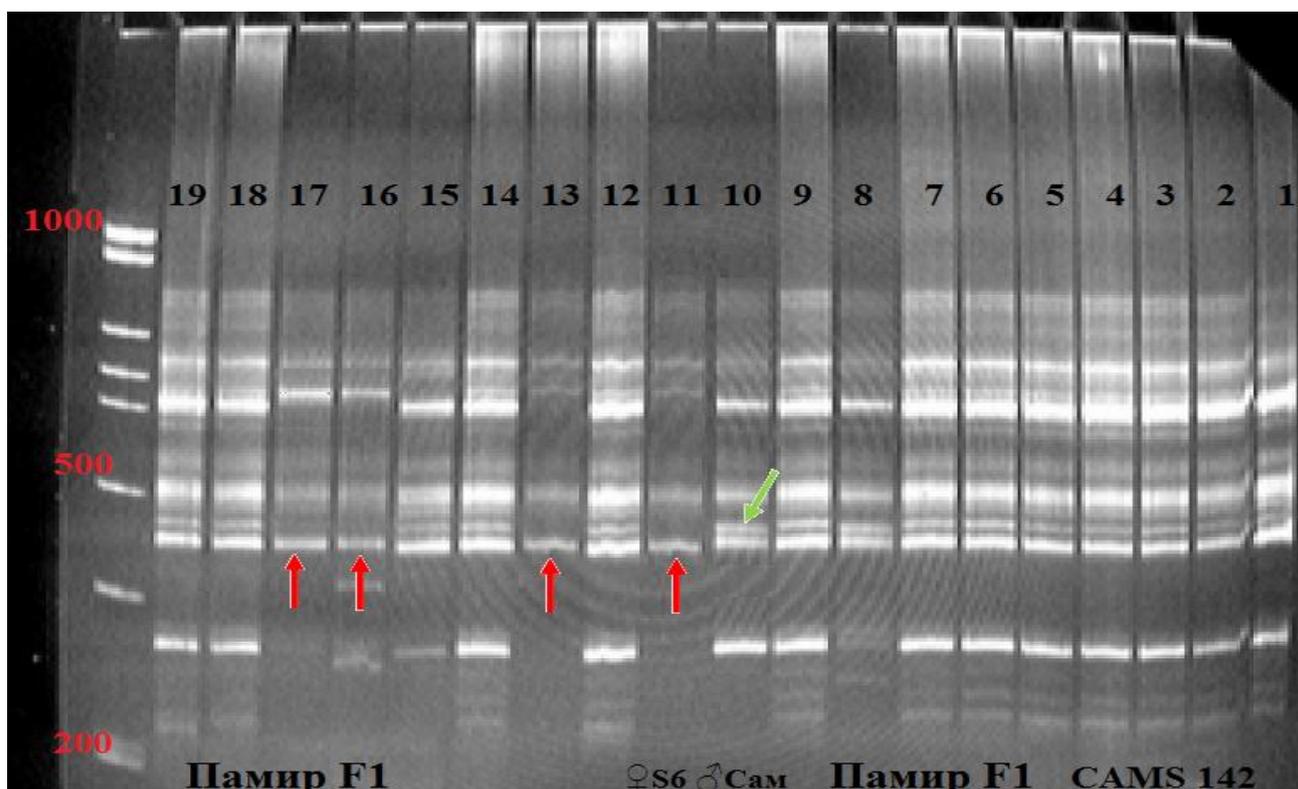


Рисунок 73 - Аллельная миграция в локусе CAMS 142 гибрида F₁ Памир перца сладкого

Примечание: S6 – материнская форма, Сам – отцовская форма

Электрофореграмма рисунка 73 демонстрирует, что образцы №№ 19, 18, 15, 14, 12, 1-9 по локусу CAMS 142 имеют как «отцовские», так и «материнские» аллели и, следовательно, являются гибридными. Образцы №№ 17, 16, 13 несут аллель материнской формы и получены, возможно, в результате самоопыления. Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа составил 92,0 % (на 100 проанализированных растений - 8 материнских).

На рисунке 74 представлены результаты ПЦР-анализа по оценки уровня гибридности семян гибрида F₁ Памир перца сладкого по локусу CAMS 117.

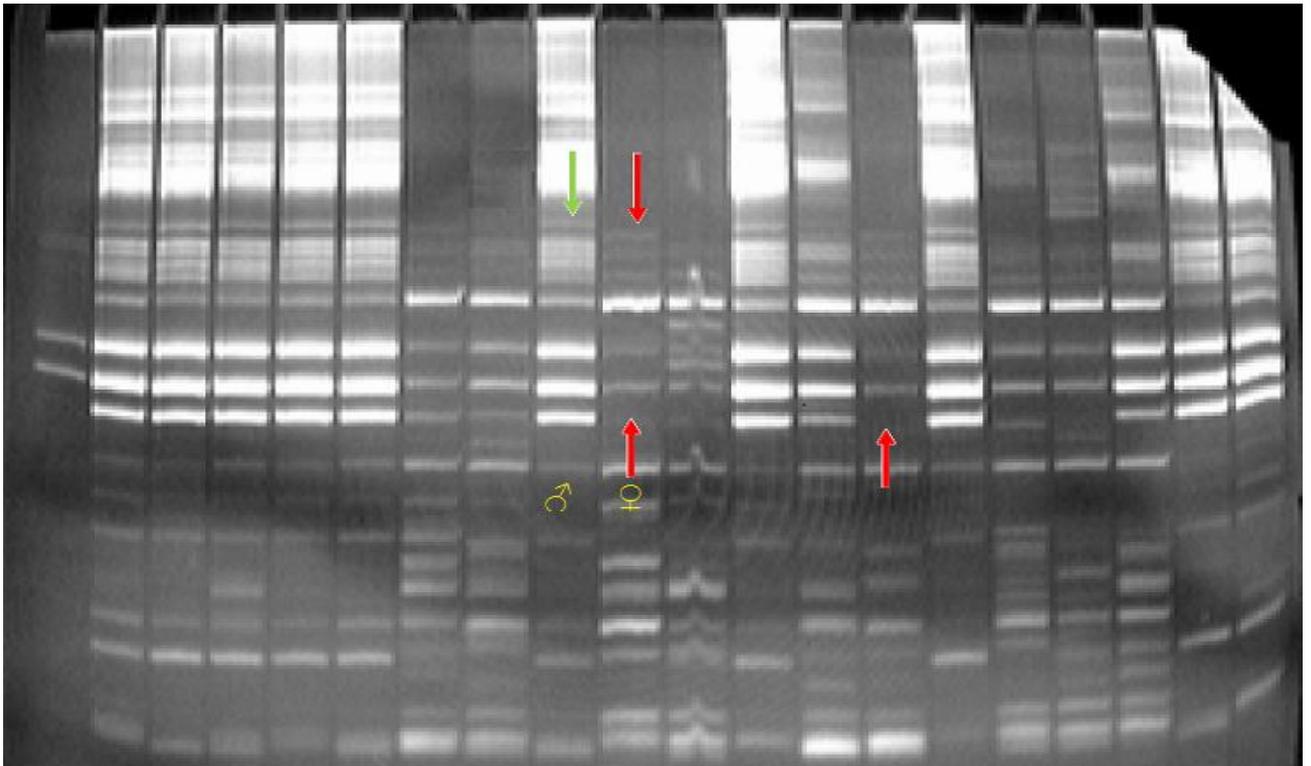


Рисунок 74 - Аллельная миграция в локусе CAMS 117 гибрида F₁ Памир перца сладкого

Примечание: ♀ - S6, ♂ - ms Cm

Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа по локусу CAMS 117 составил также 92,0 % (на 100 растений - 8 материнских).

ПЦР- анализ на определения уровня гибридности гибрида F₁ перца сладкого Фишт показал 96 % по двум локусам - CAMS 117 и CAMS 142.

Таким, образом, в проведённом нами исследовании установленный уровень полиморфизма системы молекулярного маркирования на основе микросателлитных локусов ДНК позволяет с успехом использовать её как надежный лабораторный метод определения уровня гибридности гибридов F₁ перца сладкого, а также оценки сортовых качеств семян.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Селекция с использованием молекулярных маркеров это новая, развивающаяся наука. Она безопасна с точки зрения экологии и потребления продуктов питания. В настоящее время она получает распространение на все виды сельскохозяйственных животных и растений.

В данной работе нами продемонстрированы возможности использования маркер-опосредованной селекции (MAS) для создания селекционного материала растений с заданными свойствами.

Эффективность применения молекулярно-генетических методов зависит от каждого конкретного случая и напрямую связана с возможностью ускорения селекционного процесса, повышения контроля генетической чистоты гетерозисных культур, а также изучения биоразнообразия фитопатогенных грибов.

Стратегия применения должна основываться на надежности, эффективности, информативности и взаимодополняемости вышеуказанных подходов, а также базироваться на достижениях в геномике и биоинформатике. При этом в программах с использованием методов гибридизации на первых этапах главную роль могут играть современные молекулярно-генетические методы исследований.

Применение новых методов селекции позволит, со временем, перейти на интенсивное хозяйство, получить растения и животных гораздо большей продуктивности и более устойчивых к различным факторам среды.

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*). Подобранны 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. Сформированна 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 проростания 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. У 19 микросателлитных маркеров, использованных в работе 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 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 использования их как эффективной маркерной системы для оценки генетической однородности семян гибридов F_1 перца сладкого, что может быть востребовано в семеноводческом процессе.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВА

Рекомендовать созданные образцы риса с генами устойчивости к пирикуляриозу 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 пирикуляриозу в одном генотипе рекомендовать для селекционных программ по созданию перспективных форм, устойчивых к пирикуляриозу, с целью контроля целевых генов в гибридном материале.

Использовать созданные базы данных для анализа и мониторинга популяций и патотипов возбудителя пирикуляриоза 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 F_1 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов А.А. Лабораторный экспресс-метод оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу / А.А. Аверьянов, В.П. Лапикова, Г.Г. Петелина // Большие Вяземы: ВНИИФ – 1990. – № 12. – 15 с.
2. Азарин К.В. Селекция риса, устойчивого к полному затоплению (обзор) / К.В. Азарин, А.В. Усатов., П.И. Костылев // Рисоводство. 2017. - №4 (37) с. 35-42.
3. Агроклиматические ресурсы Краснодарского края / Отв. ред. З.М. Русеева и Ш.Ш. Народецкая. – Л.: Гидрометеиздат, 1975. – 276 с.
4. Анискина Ю.В. ДНК-генотипирование растений родов *Brassica* и *Solanum* / Ю.В. Анискина, В.А. Бирюкова, Н.С. Велишаева и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2005. – № 1. – С. 110–119.
5. Артемьева А.М. Анализ филогенетических связей вида *Brassica oleracea* L. (капуста огородная) / А.М. Артемьева, Э. Клоке, Ю.В. Чесноков // Вестник ВОГиС. – 2009. № 4 (13). – С. 759-771.
6. Бочко Т.Ф. Методологические аспекты агроэкологической оптимизации использования природно-ресурсного потенциала рисовых мелиоративных агроландшафтов / Т.Ф. Бочко, К.М. Авакян // Сельскохозяйственная биология. – 2006. – №5. – С.81-87.
7. Ван дер Планк Я. Генетические и молекулярные основы патогенеза у растений. – М., 1981. – 236 с.
8. Вахрушева О.А. Система врожденного иммунитета у растений / О.А. Вахрушева, С.А. Недоспасов // Молекулярная биология. – 2011. – №1 (45). – 21 с.
9. Гаркуша С.В. Проблемы отрасли рисоводства в Российской Федерации и пути их решения / С.В. Гаркуша, Л.В. Есаулова, В.И. Госпадинова // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – №12(29). – С. 10-12.

10. Госпадинова В.И. Повышение конкурентоспособности российского риса - путь к импортозамещению / В.И. Госпадинова, С.В. Гаркуша, Е.М. Харитонов, Л.В. Есаулова // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – №8(30). – С. 102-104.
11. Дзюба В.А. Генетика риса. – Краснодар, 2004. – 283 с.
12. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – Изд. 4-е, перераб. и доп. – М.: Колос, 1979. – 416 с.
13. Дубина Е.В. Белковые маркеры в сортовой идентификации риса: дис. ... канд. биол. наук. – 2003. – 114 с.
14. 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 а. - № 66. - С. 475-485.
15. Дубина Е.В. Использование методов молекулярного маркирования в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / Е.В. Дубина // Рисоводство. 2011 б. № 19. С. 2.
16. Дубина Е.В. Использование молекулярного маркирования в селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу / Е.В. Дубина // Наука Кубани. - 2012. - № 4.- С. 15-18.
17. Дубина Е.В. Создание устойчивой к пирикулярриозу генплазмы риса с использованием технологий ДНК-маркирования / 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 а. – № 8 (51). – С. 881-886.
18. 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, М.Г. Рубан,

С.В. Гаркуша, Л.В. Есаулова, Е.П. Максименко // Достижения науки и техники АПК. – 2015 б. - № 12. - С. 40-42.

19. 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 в. - № 1. - С. 30-34.

20. Дубина Е.В. Создание новых резистентных форм *Oryza sativa* L. к *Magnaporthe grisea* (Herbert) BARR. с использованием методов молекулярного маркирования / Е.В. Дубина, В.Н. Шиловский, Г.Л. Зеленский, Е.С. Харченко, В.Я. Рубан, Л.В. Есаулова, Е.П. Максименко, И.Б. Никитина // Молодой ученый. – 2015 г. - № 9-2 (89). - С. 15-20.

21. 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 д. - С. 85-87.

22. 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 а. - С. 40-44.

23. Дубина Е.В. Разработка методической схемы оценки гибридности семян F_1 *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 б. Т. 30. - № 8. - С. 49-51.

24. 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 в. - Т. 30. - № 8. - С. 42-44.

25. 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 а. - С. 180-181.

26. 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 б. – № 2 (35). – С. 20-26.

27. 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 в. - № 6 (54). - С. 29-35.

28. 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 а. С. 91-94.

29. 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 б. - Т. 32. - № 10. - С. 19-23.
30. Дьяков Ю.Т. и др. Общая и молекулярная фитопатология: Учеб. Пособие / Ю.Т. Дьяков и др. – М.: Изд-во Общества фитопатологов, 2001. – 302 с.
31. Зайцев В. С. Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173 / В. С. Зайцев, Э. Е. Хавкин // Доклады РАСХН. – 2001. – № 2. – С. 3-5.
32. Зеленский Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, рисовой листовой нематоды и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: автореф. дис.... д-ра с.-х. наук. – Краснодар: ВНИИ риса, 1993. – 48 с.
33. Г. Л. Зеленский. Рис: биологические основы селекции и агротехники: монография / Г. Л. Зеленский. –Краснодар: КубГАУ, 2016. –238 с.
34. Ильницкая Е.Т. Молекулярное маркирование на устойчивость к пирикулярриозу: дис. ... канд. биол. наук. – 2007. – 99 с.
35. Календарь Р.Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков / Р. Н. Календарь // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: тез. докл. Международной конференции. – Киев, 1994. – С. 25-26.
36. Карлов Г.И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2010. – 322 с.

37. Каталог сортов риса и овощебахчевых культур кубанской селекции / Сост. В.А. Багиров, С.В. Гаркуша – Краснодар: «ЭДВИ», 2016. – 160 с.
38. Каталог сортов риса селекции ВНИИ риса. / Сост. Н.П. Дьяченко и др. – Краснодар. – 2007. – 48 с.
39. Коваленко Е.Д. Методические указания по оценке устойчивости сортов риса к возбудителю пирикулярриоза / Е.Д. Коваленко, Ю.В. Горбунова, А.А. Ковалёва и др. М.: ВАСХНИЛ, 1988. – 30 с.
40. Кожухова Н.Э. ISSR-анализ для реконструкции исторических событий: сравнение инбредных линий кукурузы ВИР44 и А344 / Н.Э. Кожухова, Е.В. Гудыменко, Ю.М. Сиволап // Геном растений: тез. докл. IV Международной конференции. Одесса, 10-13 июня 2003 г. – Одесса, 2003. – С. 18.
41. Кожухова Н.Э. Полимеразная цепная реакция и особенности ее применения для анализа полиморфизма / Н.Э. Кожухова // Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Научно - методическое руководство. – К.: Аграрна наука, 1998. – С. 21-33.
42. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. – С.-Пб.: ВИР, 1998. – 370 с.
43. Костылев П.И. Северный рис (генетика, селекция, технология) / П.И. Костылев, А.А. Парфенюк, В.И. Степовой. – Ростов-на-Дону: ЗАО «Книга», 2004. – 576 с.
44. 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.

45. 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.108-116.
46. 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, и др. // *Экологическая генетика*. - 2017. - Т. 15. - № 3. - с. 54-63. doi: 10.17816/ecogen15354-63.
47. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов / И.Н. Леонова // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2013. – № 2 (17). – С. 314-325.
48. Лобашев М.Е. Генетика. – Ленинград: издательство ленинградского университета, 1969. – 752 с.
49. Лось Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса / Г.Д. Лось // *Сельскохозяйственная биология*. – 1987. – №12. – С. 15-17
50. Малюта С.С. Розробка тест-системи для діагностики Rh-лейкемії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / С.С. Малюта, Г.Д. Телегеев, М.В. Дибков и др. // *Наука та інновації*. – 2005. – № 3. – С. 14-19.
51. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
52. Методика проведения грунтового контроля по группам сельскохозяйственных растений. – М.: ФГНУ Росинформагротех», 2004. – 108 с.
53. 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.

54. Мягих Ю.А. Применение молекулярного маркирования для повышения эффективности селекции риса: дис. ... канд. биол. наук. – Краснодар, 2009. – 100 с.
55. Олдендерфер М.С. Кластерный анализ. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ / М.С. Олдендерфер, Р.К. Блэшфилд; пер. с англ. под ред. И. С. Енюкова. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 215 с.
56. Поморцев А.А. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений / Поморцев А.А., Кудрявцев А.М., Упелник В.В., Конарев В.Г. и др., 2004. Электронный ресурс: <http://docs.cntd.ru/document/1200113117>.
57. Похно С.Л. Разработка адаптивных сортовых комплексов для агроландшафтных районов рисосеяния Краснодарского края: дис. ... канд. с.-х. наук. – Краснодар, 2011. – 188 с.
58. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применения. – М: Мир, 1977. – с. 57-77, 89 - 102.
59. Селекция полевых культур. Создание высокоурожайных сортов. 2011: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://selekcija.ru/ris-genetika.html>. – (Дата обращения: 19.01.2019).
60. Серебровский А.С. Генетический анализ. – М.: Наука, 1970. – 342 с.
61. Скаженник М.А. Методы физиологических исследований в рисоводстве / М.А. Скаженник, Н.В. Воробьев, О.А. Досеева – Краснодар: ВНИИ риса, 2009. – 23 с.
62. Скаженник М.А. Оценка и создание исходного материала риса устойчивого к низким положительным температурам / М.А. Скаженник, Н.В. Воробьев, И.Н. Чухирь и др. // Интродукция нетрадиционных и редких растений. Материалы X Международной научно-методической конференции. – Ульяновск. – 2012. – Т. 2. – С. 195-197.

63. Скаженник М.А. Создание холодостойкого исходного материала для селекции риса в рамках Консорциума стран с умеренным климатом / М.А. Скаженник, Н.В. Воробьев, В.А. Дзюба и др. // *Зерновое хозяйство России*. – 2013. - № 3(27). – С. 11-15.

64. Скаженник М.А. Создание холодостойкого исходного материала риса для селекции сортов в рамках консорциума стран с умеренным климатом / М.А. Скаженник, Н.В. Воробьев, В.А. Дзюба и др. // *Зерновое хозяйство России*. – 2014. - № 5(35). – С. 11-17.

65. 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.

66. 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.Чинненко // *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*. 2017. - № S12. - С. 193-195.

67. Сметанин А.П. Методики опытных работ по селекции, генетике, семеноводству, семеноведению и контролю за качеством семян риса / А.П. Сметанин, В.А. Дзюба, А.И. Апрод. – Краснодар, 1972. – 156 с.

68. Тихонова Н.А. Методические указания по диагностике, учету и оценке вредоносности пирикулярриоза риса / Н.А. Тихонова, Г.А. Девяткина, А.И. Ключко и др. – М.: ВАСХНИЛ, 1983. – 40 с.

69. Фролова В.С. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике / В.С.

Фролова, Е.Д. Коваленко, Ж.Г. Наскидашвили, Т.М. Силичева и др. – М.: ВАСХНИЛ, 1983. – 14 с.

70. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве / Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология. – 1997. – № 5. – С. 3-21.

71. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – № 4/2 (17). – С. 1044-1054.

72. Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – № 4 (15) – С. 757–768.

73. Чекалин Н.М. Генетика устойчивости растений и вирулентности патогенов: Типы наследственной устойчивости растений: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://agromage.com/stat_id.php?id=407/. – (Дата обращения: 19.01.2019).

74. Чесноков Ю.В. Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях. – С.-Пб.: АФИ, 2013. – 116 с.

75. Шаптуренко М.Н. Использование RAPD-маркеров для оптимизации отбора исходного материала перца сладкого (*Caosicum annuum L.*) в селекции на гетерозис / М.Н Шаптуренко, Л.А. Тарутина, Т.В. Печковская, Л.А. Мишин, Л.В. Хотылева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – №1 (17). – С. 63-71.

76. Шилов И.А. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикуляриозу риса Pi-ta, Pi-b / И.А. Шилов, О.С. Колобова, Ю.В. Анискина, Т.В. Шалаева, Н.С. Велишаева, П.И. Костылев, Е.В. Дубина // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – № 8 (30). – С. 45-48.

77. Шилов И.А. Технология массового скрининга риса на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу 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.Н. Костылев, Е.В. Дубина // Достижения науки и техники АПК. - 2018. - № 11. - С. 21-25.

78. Шкаликов В. Иммуитет растений / В. Шкаликов, В. Дьяков, Ю. Дьяков, А. Смирнов, Ф. Джалилов, Ю. Тройков, Ю. Коновалов Ю., Гриценко В. – М.: Колос С, 2005. – 192 с.

79. Abdel-Mawgood A. Application of molecular markers for hybrid maize (*Zea mays* L.) identification / A.Abdel-Mawgood // Food, Agriculture, Environment. – 2006. – № 2 (4) – P. 44-51.

80. Ahn S.N Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) / Sang-Nag Ahn, Yeon-Kyu Kim, Ha-Cheol Hong, Seong-Sook Han, Soo-Jin Kwon, Hae-Chune Choi, Huhn-Pal Moon, Susan R. McCouch // Euphytica.- 2000.- Vol. 116 (1), p. 17–22.

81. Allender C.J. Simple sequence repeats reveal uneven distribution of genetic diversity in chloroplast genomes of Brassica oleracea and (n = 9) wild relatives / C.J. Allender, J. Allainguillaume, J. Lynn, G.J. King // Theor. Appl. Genet. – 2007. – V. 114. – P. 609-618.

82. Al-Shehbaz I. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview / I. Al-Shehbaz, M. Beilstein, E. Kellogg // Plant Syst. Evol. – 2006. – V. 259. – P. 89-120.

83. Arase S. Light-Enhanced Resistance to Magnaporthe grisea Infection in the Rice Sekiguchi Lesion Mutants / S. Arase, K. Fujita, T. Uehara, Y. Honda and J. Isota // Journal of Phytopathology. – 2000. – V. 148.– P. 197-203.

84. Ashkani S. Analysis of simple sequence repeat markers linked with blast disease resistance genes in a segregating population of rice (*Oryza sativa*) / S. Ashkani, M.Y. Rafii, M. Sariah, et al. // Genetics and Molecular Research. – 2011. – № 10 (3). – P. 1345-1355.

85. Bailey C.D. Toward a global phylogeny of the Brassicaceae / C.D. Bailey, M.A. Koch, M. Mayer et al. // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – V. 23. – P. 2142–2160.
86. Ballini E. A genome- wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance / E. Ballini, J.B. Morel, G. Droc, et al. // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 2008. – № 21. – P. 859-868.
87. Barry G. The use of the Monsanto draft rice genome sequence in research // *Plant Physiol.*- 2001.- V. 125.- P. 1164-1165
88. Bent A.F. Plant disease resistance genes, function meets structure / A.F. Bent // *The Plant Cell.* – 1996. – № 8. – P. 1757-1771.
89. Berruyer R. Characterization of Pi33, a rice resistance gene interacting with the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 / R. Berruyer, H. Adreit, J. Milazzo, et al. // *International Rice Research Newsletter.* - 2002. – Vol. 27(2). – p. 11-12.
90. Ballini E. A genome- wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance / E. Ballini, J. B. Morel, G. Droc et al. // *Molecular Plant-Microbe Interactions.*- 2008. –№ 21. – P.859-868.
91. Bonman J. Breeding rice for resistance to pest / J. Bonman, G. Khush, R. Nelson // *Annu. Rev. Phytopatol.*- 1992.- V. 30.- P. 507-528.
92. Brar D.S. Molecular Marker Assisted Breeding /Darshan S. Brar // *Molecular Techniques in Crop Improvement.* - 2001. – p. 55-83
93. Catling H.D. Rice in deep water / H.D. Castling // *International Rice Research Institute, Manila, Philippines. Macmillan, London, 1992.* – 542 p.
94. Cekic C. The potencial of ISSR-PCR primer-pair combination for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model / C. Cekic, N.H. Battey and M. J. Wilkinson // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – № 103. P. 540-564.

95. Chakravarthi B.K. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa*. L) / B. K. Chakravarthi, R. Naravaneni // African J. of Biotech. – 2006. – № 5. – P. 684- 688.
96. Chauhan R. Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVRI-CO39* of *Magnaporthe grisea* / R. Chauhan, M. Farman, H.-B. Zhang, S. Leong // Molecular Genetics and Genomics. – 2002.- Vol. 267(5), p. 603–612.
97. Chen M. An integrated physical and genetic map of the rice genome / M. Chen, G. Presting, W.B. Barbazuk et al. // The Plant Cell.- 2002.- V. 14.- P. 537-545.
98. Collard, B.C.Y. Developing new flood-tolerant varieties at the International Rice Research Institute (IRRI). / B.C.Y. Collard, E.M. Septiningsih, S.R. Das, Carandang J.J., Pamplona A.M., Sanchez D.L., Kato Y., YE G., Reddy J.N., Singh U.S., Iftekharuddaula K.M., Venuprasad R., Vera-cruz C.N., Mackill D.J. and Ismail A.M. // SABRAO Journal of Breeding and Genetics. – 2013. – № 45 (1). – P. 42-56.
99. Conaway-Bormans C.A. Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z*, in rice for use in marker-assisted selection / C.A. Conaway-Bormans, M.A. Marchetti, C.W. Johnson, A.M. McClung, W.D. Park // Theor. Appl. Genet.- 2003.- V. 107.- P. 1014-1020.
100. Correa-Victoria F.J. Gene combinations in rice for the development of durable resistance to *Pyricularia grisea* in Colombia. Proc. 3rd Int. / F.J. Correa-Victoria, D. Tharreau, C. Martinez, M. Vales et al. // Temperate Rice Conference.- Punta del Este, 2003.
101. Deng Y. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety / Y. Deng, X. Zhu, Y. Shen, Z. He // Theor. Appl. Genet.- 2006.- V. 113.- P. 705-713.

102. Diwan N. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean / N. Diwan, P.B. Cregan // *Theor. Appl. Genet.* - 1997.- V. 95. - P. 723-733.

103. Dobrovolskaya O. Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*) / Oxana Dobrovolskaya, Petr Martinek, Anatoly V. Voylokov et al. // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2009.- Vol. 119 (5), p. 867–874.

104. 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 a. – № 8 (15). – P. 752-756.

105. 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. Составитель Синяев Д. Н. – 2015 с. - с. 205-208.

106. 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 с. Vol. 13. - № 48. - С. 2757-2762.

107. Engelke D. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli* / D. Engelke, A. Krikos, M. Bruck // *Anal. Biochem.* - 1990. - № 2 (191) - P. 396-400.

108. Felix G. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin / G. Felix, J.D. Duran, S. Volko, T. Boller // *Plant J.* – 1999. – № 18(3). – P. 265-276.

109. Foote T. Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the Ph1 locus in wheat / T. Foote, M. Roberts, N. Kurata, T. Sasaki, G. Moore // *Genetics*.- 1997.-V. 147.- P. 801-807.

110. Fuentes J.L. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to the blast resistance gene Pi-1 in rice for marker-assisted selection (MAS) / J.L. Fuentes, F. Correa-Victoria, F. Escobar, G. Prado, G. Aricapa, M.C. Duque. Poster.

111. Fuji K. Gene analysis of panicle blast resistance in rice cultivars with rice stripe resistance / K. Fuji, Y. Hayano-Saito, N. Sugiura, N. Hayashi, N. Saka et al. // *Breed. Res.*- 1999.- V. 1.- P. 203-210.

112. Fukao T. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice / T. Fukao and J. Bailey-Serres // *PNAS*. 2008. – № 105 (43). – P. 16814-16819.

113. Fukao T. The submergence tolerance regulator Sub1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice / T. Fukao, El. Yeung and J. Bailey-Serres // *The Plant Cell*. – 2011. – V. 23. – P. 412-427.

114. Garg N. PCR Primer Design: DREB Genes / Garg N, Pundhir S, Prakash A., Kumar A. // *J Comput Sci Syst Biol*. - электронный ресурс: <https://www.omicsonline.org/pcr-primer-design-dreb-genes-jcsb.1000021.php?aid=1211>

115. George M. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* with rep-PCR using endogenous repetitive DNA sequences / M. George, R.J. Nelson, R. S. Zeigler, H. Leung // *Phytopathology* 88. – 1998. – P. 223-229.

116. Girish Kumar K. Marker assisted backcross gene introgression of major genes for blast resistance in rice / K. Girish Kumar, S. Hittalmani, K. Srinivasachary // *Advances in Rice Blast Research*. – 2000. – P. 43-53.

117. Goff S.G. A draft sequence of the rice genome / S.G. Goff, D. Ricke, T.H. Lan, G. Presting, R. Wang et al. (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) // *Science*.- 2002.- V. 296.- P. 92-100.

118. Hanacek P. DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers / P. Hanacek, T. Vyhnanek, M. Rohrer, J. Cieslarova, H. Stavelikova // Hort. Sci. Prague. – 2009. – № 36 (4). – P. 127-132.
119. Harushima Y. A high-density rice genetic map with 2275 markers using a single F2 population / Y. Harushima, M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano et al. // Genetics.- 1998.- V. 148.- P. 479-494.
120. Hattori Y. The ethylene response factors Snorkel1 and Snorkel2 allow rice to adapt to deep water / Y. Hattori, K. Nagai, S. Furukawa, X.J. Song, R. Kawano, H. Sakakibara, J.Z. Wu, T. Matsumoto, A. Yoshimura, H. Kitano, M. Matsuoka, H. Mori, M. Ashikari // Nature. – 2009. – № 460. – P. 1026-1031.
121. Hayashi K. Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes / K. Hayashi, H. Yoshida, I. Ashikawa // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – № 113. – P. 251-260.
122. Hittalmani S. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice / S. Hittalmani, A. Parco, T.V. Mew, R.S. Zeigler, N. Huang // Theor. Appl. Genet.- 2000.- V. 100.- P. 1121-1128.
123. Huang N. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR / N. Huang, E.R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay et al. // Theor. Appl. Genet.- 1997- V. 95.- P. 313-320.
124. Hur Y.J. Pyramiding of two rice bacterial blight resistance genes, *Xa3* and *Xa4*, and a closely linked cold-tolerance QTL on chromosome 11 / Yeon-Jae Hur, Jun-Hyeon Cho, Hyun-Su Park et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2016. – Vol. 129.- p. 1861–1871.
125. Ichicawa N. A rapid PCR-aided selection of a rice line containing the Rf-1 gene which is involved in restoration of the cytoplasmic male sterility

/ N. Ichicawa, N. Kishimoto, A. Inagaki, A. Nakamura et al. // Mol. Breed.- 1997.- V. 3.- P. 195-202.

126. Iftekharuddaula K.M. Rapid and high-precision marker assisted backcrossing to introgress the SUB1 QTL into BR11, the rainfed lowland rice mega variety of Bangladesh / K.M. Iftekharuddaula, M.A. Newaz, M.A. Salam, H.U. Ahmed, M.A.A. Mahbub, E.M. Septiningsih, B.C.Y. Collard, D.L. Sanchez, A.M. Pamplona, D.J. Mackill // Euphytica. – 2011. – № 178. – P. 83-97.

127. Imam J. Molecular Diversity and Mating Type Distribution of the Rice Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in North-East and Eastern India / Jahangir Imam, Shamshad Alam, Nimai Prasad Mandal, Dipankar Maiti, Mukund Variar, Pratyosh Shukla // Indian Journal of Microbiology. – 2015. - Vol. 55 (1), p. 108–113.

128. Jaisval P. Gramene: development and integration of trait and gene ontologies for rice / Jaisval P., Ware D., Ni J., Chang K. et al. // Comparative and functional genomics.- 2002.- V. 3.- P. 132-136.

129. Jena K.K. Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding / K.K. Jena, H.P. Moon, D.J. Mackill // Korean J. Breed. – 2003. – V. 35. – P. 133-140.

130. Jensen L.B. Locating genes controlling allelopathic effects against barnyardgrass in upland rice / L.B. Jensen, B. Courtous, L. Shen, Z. Li et al. // Agron. Journ.- 2001.- V. 93.- P. 21-26.

131. Jeung J.U. A novel gene, Pi-40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice / J.U. Jeung, B.R. Kim, Y.C. Cho et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – V. 115. – P. 1163-1177.

132. Jeung J.U. Fingerprinting temperate japonica and tropical indica rice genotypes by comparative analysis of DNA markers / J.U. Jeung, H.G. Hwang, H.P. Moon, K.K. Jena // Euphytica.- 2005.- V. 146.- P. 239-251.

133. Jeung U. A novel gene, Pi-40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice / U. Jeung, B.R. Kim, Y.C. Cho et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2007. – V. 115. – P. 1163-1177.

134. Jiang J. Identification of a 118-kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene Pi-2(t) in rice / J. Jiang and S. Wang // Mol. Genet. Genomics.- 2002.- V. 268.- P. 249-252.

135. Jiang L. Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.) / L. Jiang, S. Liu, M. Hou, J. Tang, L. Chen, H. Zhai, J. Wan // Field Crops Research. – 2006 a. – № 98 (1). P. 68-75.

136. Jiang G.H. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIAγ1* / Guang-Huai Jiang, Zhi-Hui Xia, Yong-Li Zhou et al. // Molecular Genetics and Genomics. – 2006 б. – Vol. 275. – p. 354–366.

137. Jung K.-H. The submergence tolerance regulator *sub1a* mediates stress-responsive expression of *ap2/erf* transcription factors / K.-H. Jung, Y.-S. Seo, H. Walia, P. Cao, T. Fukao, P. E. Canlas, F. Amonpant, J. Bailey-Serres, and P. C. Ronald // Plant Physiology. – 2010. – V. 152. – P. 1674-1692.

138. Kaye C. The development of simple sequence repeat (SSR) markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established molecular linkage map / C. Kaye, J. Milazzo, S. Rozenfeld, M.-H. Lebrun, D. Tharreau // Fungal Genet Biol. – 2003. – № 40 (3). – P. 207-214.

139. Kende H. Deepwater Rice: A Model Plant to Study Stem Elongation / H. Kende, E. Knaap, H.T. Cho // Plant Physiology. – 1998. – №4 (118). – P. 1105-1110.

140. Kennard, W.C. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber /

W.C. Kennard, K. Poetter, A. Dijkhuisen, V. Meglic, J. Staub and M. Havey // Theor. Appl. Genet. – 1994. – № 89. – P. 42-48.

141. Khush G.S. Rice genetics / G.S. Khush, D.S. Brar, B. Hardy. – Los Banos, 2001. – 488 p.

142. Kiyosawa S. Genetic and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance // Annual Review of Phytopathology.- 1989.- V. 20.- P. 93-117.

143. Kishor I. Mining for major blast resistance genes in rice landraces of Karnataka / Kishor Ingole, Sk. Prashanthi, P. U. Krishnaraj // Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2014. - Vol. 74(3). – P. 378 DOI: 10.5958/0975-6906.2014.00857.8

144. Kiyosawa S. The influence of resistance gene frequencies in rice plants on virulence gene frequencies in blast fungus population in Japan / S. Kiyosawa, H. Yamaguchi, M. Yamada // Ann. Phytopath. Sos. Jap.- 1982.- V. 48.- P. 199-209.

145. Koide Y. Blast resistance genes and their selection markers in rice (*Oryza sativa* L.) / Y. Koide, N. Kobayashi, D. Xu, Y. Fukuta // JIRCAS Working Report. – 2009. – № 63. – P. 95-122.

146. Kostylev P.I. Prospects of use of rice with the gene Sub1 tolerant to the long-term flooding in the breeding of domestic crop varieties / P.I. Kostylev, A.A. Redkin, E.V. Usatov, M.S. Makarenko // Grain Economy of Russia. – 2015. – № 4 (40). – P. 37-42.

147. Kumar V. Microsatellite (SSR) Based Assessment of Genetic Diversity among the Semi-dwarf Mutants of Elite Rice Variety WL112 / Vikash Kumar and Suresh Gopal Bhagwat // International Journal of Plant Breeding and Genetics. – 2012. – vol. 6. – P. 195-205.

148. Kurata N. Conservation of genome structure between rice and wheat / N. Kurata, G. Moore, Y. Nagamura, T. Foote et al. // Biotechnology- 1994.- V. 12.- P. 276-278.

149. Lang F. Physiology of receptor-mediated lymphocyte apoptosis / F. Lang, I. Szabo, A. Lepple-Wienhues, D. Siemen, E. Gulbins, E. News // *Physiol. Sci.* – 1999. – № 14. – P. 194-200.
150. Lang N.T. Fine mapping for blast resistance gene in rice (*Oryza sativa* L.) using bulked segregant analysis / N.T. Lang, G.S. Khush, N. Huang, B. Buu // *Omonrice.* - 2001.-V. 1.- P. 1-8.
151. Launder E.S. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural population / E.S. Launder, P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, L. Newburg // *Genomics.* - 1987.- V. 1.- P. 174-181.
152. Lee S.W. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21 mediated innate immunity / S.W. Lee et al. // *Science.* – 2009. – № 326 (5954). – P. 850-853.
153. Levy M. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in rice blast fungus / M. Levy, J. Ramao, M.A. Marchetti, J.E. Hamer // *The Plant Cell.* – 1991. – № 3. – P. 95-102.
154. Levy M. Genetic diversity of rice blast fungus in a disease nursery in Colombia / M. Levy, F.J. Correa-Victoria, R.S. Zeigler, S. Shizong, J.E. Hamer // *Phytopathology.* – 1993. – № 83. – P. 1427-1433.
155. Levy M. Lineage structure, avirulence locus polymorphism and organization of pathotype diversity in rice blast fungus / M. Levy, K.M. Shahjahan, B. Valent // *Abstract 3rd Int. Rice Genet. Symp.* - Manila, the Philippines, 1995.- poster 81.
156. Li C.Y. Development of minisatellite markers in phytopathogenic fungus, *Magnaporthe grisea* / C.Y. Li, J.B. Li, L. Liu, J. Yang, Y. Su, Y.Y. Wang, Y. Xie, M. Ye and Y.Y. Zhu // *Molecular Ecology Notes* – 2007. – V. 131. – P. 144-152.
157. Li Y. X. Induced Pib Expression and Resistance to *Magnaporthe grisea* are Compromised by Cytosine Demethylation at Critical Promoter Regions in Rice /Yuan Xiang Li, Qiong Xia, +5 authors Bao Liu // *Journal of integrative*

plant biology. - 2011. - 53(10). - p. 814-23. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01070.x.

158. Linh T.-H. Improving submergence tolerance of vietnamese rice cultivar by molecular breeding / T.-H. Linh, L.-H. Linh, D.-T. K. Cuc, L.-H. Ham and T.-D. Khanh // J. Plant Breed. Genet. - 2013. - № 1 (3). - P. 157-168.

159. Liu G. Two broad-spectrum blast resistance genes, Pi9(t) and Pi2(t), are physically linked on rice chromosome 6 / G. Liu, G. Lu, L. Zeng, G.L. Wang // Mol. Genet. Genomics.- 2002.- V. 267.- P. 472-480.

160. Liu K. Genetic Structure and Diversity Among Maize Inbred Lines as Inferred From DNA Microsatellites /Kejun Liu, Major Goodman, Spencer Muse et al. // Genetics. - 2003. - Vol. 165 (4). - p. 2117-2128.

161. Liu Y. Dissecting quantitative resistance against blast disease using heterogeneous inbred family lines in rice / Yan Liu, Xiao Yuan Zhu, Shaohong Zhang, Marichu Bernardo, et al. // Theoretical and Applied Genetics. - 2011. - Vol. 122 (2), p. 341-353.

162. Louarn S. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in Brassica oleracea / S. Louarn, A.M. Torp, I.B. Holme // Genet. Res. Crop Evol. - 2007. - V. 54. - P. 1717-1725.

163. Luce C. The use of microsatellite markers to examine the diversity genetic resources of rice (*Oryza sativa* L.) adapted to European conditions / C. Luce, J.L. Noyer, D. Tharreau // Proceeding of the international symposium on molecular markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in horticulture.-Montpellier, 2000.- P. 221-235.

164. Ma Z.Q. Frequencies and sequence characteristics of dinucleotide, trinucleotide, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat / Z.Q. Ma, M. Roder, M.E. Sorrells // Genome.- 1996.- V. 39.- P. 123-130.

165. Mackill D.J. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice / D.J. Mackill, Z. Zhang, E.D. Redona // Genome.- 1996.- V. 39.- P. 969-977.

166. Mackill D.J. Molecular mapping and marker-assisted selection for major-gene traits in rice / D.J. Mackill and J. Ni // Rice genetic. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium.- Los Banos, 2001.- P. 137-151.
167. Mackill D.J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers // Crop Sci.- 1995.- V. 35.- P. 889-894.
168. Mammadov J. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding / J. Mammadov, R. Aggarwal, R. Buyyarapu, S. Kumpatla // International Journal of Plant Genomics. – 2012. - Article ID 728398, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/728398>.
169. Martin William J. Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity / William J. Martin, John McCallum, Masayoshi Shigyo, Jernej Jakse, Joseph C. Kuhl, Naoko Yamane, Meeghan Pither-Joyce, Ali Fuat Gokce, Kenneth C. Sink, Christopher D. Town, Michael J. Havey // Molecular Genetics and Genomics. – 2005. – Vol. 274(3). – p. 197–204.
170. Masojc P. Application of molecular markers in process of selection / P. Masojc // CMBL. – 2002. – № 21 (7) – P. 499-510.
171. McCouch S.R. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) / S.R. McCouch, L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare et al. // DNA research.- 2002.- V. 9.- P. 199-207.
172. McCouch S.R. Mapping of blast resistance genes in rice / S.R. McCouch, R.G. Nelson, J. Tohme, R.S. Zeigler // Rice blast disease.- 1994.- V. 1.- P. 167-186.
173. McCouch S.R. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding / S.R. McCouch, X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu et al. // Plant Mol. Biol.- 1997.- V. 35.- P. 89-99.
174. McCouch S.R. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications / S.R. McCouch, S. Temnykh, A. Lukashova, J.

Coburn, G. DeClerck et al. // Rice genetic. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium.- Los Banos, 2001.- P. 117-135.

175. McCouch S.R. Molecular mapping of rice chromosomes / S.R. McCouch, G. Kochert, Z.H. Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, S.D. Tenksley // Theor. Appl. Genet.-1988.- V. 76.- P. 815-829.

176. Mekwatanakarn P. Sexually fertile Magnaporthe grisea rice pathogens in Thailand / P. Mekwatanakarn, W. Kositratana, T. Phromraksa, R.S. Zeigler // Plant Disease.- 1999.- V. 83.- P. 939-943.

177. Mew T.V. Fine-mapping of major genes for blast resistance in rice / T.V. Mew, A.S. Parco, S. Hittalmani, T. Inukai et al. // Rice Genet. Newsl.- 1994.- V. 11.- P. 126-128.

178. Mickelbart M.V. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability / M. V. Mickelbart, P. M. Hasegawa and J. Bailey-Serres // Nature Reviews Genetics. – 2015. – P. 1-15.

179. Minamiyama Y. An SSR based linkage map of Capsicum annuum / Y. Minamiyama, M. Tsuru, M. Hirai // Molecular Breeding. – 2006. – V. 18. – P. 157-169.

180. Miyamoto M., Ando I., Rybka K., Kodama O., Kawasaki S. High resolution mapping of the indica-derived genes. I. Pi-b / M. Miyamoto, I. Ando, K. Rybka, O. Kodama, S. Kawasaki // Mol. Plant-Microbe Interact.- 1996.- V. 9.- P. 6-13.

181. Mohan M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants / M. Mohan, S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, T. Sasaki // Molecular Breeding. – 1997. – Vol. 3 (2). – P. 87–103.

182. Mohammadi S. Study of chromosomal locations and gene effects on yield and yield components in maize using microsatellite markers / S. Mohammadi, B. Prasanna, C. Sudan // Cel. Mol. Biol. Let. – 2002. – № 2a (7). P. 599-606.

183. Mohan M. Genome mapping, molecular marker and marker-assisted selection in crop plants / M. Mohan, S. Nair, A. Bhagwat,

T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, T. Sasaki // *Molecular Breeding*.- 1997.- V. 3.- P. 87-103.

184. Moose S.P. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement / S.P. Moose, R.H. Mumm // *Plant Physiol.* – 2008. V. 147. – P. 969-977.

185. Morgante M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics / M. Morgante, A.M. Oliveri // *Plant J.*- 1993.- V. 3.- P. 175-182.

186. Mullis K. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction / K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* - 1986. - № 2 (51) - P. 263-273.

187. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // *Nucleic Acids Research.* – 1980. – V. 10. – P. 4321-4325.

188. Nagao S. Genetical studies on rice plants. XXVII. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice / S. Nagao, M. Takahashi // *J. Fac. Agri. Ho-Univ.* - 1963. - Vol. 53.- p.72-130.

189. Niroula R.K. Sub1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species / R.K. Niroula, C. Pucciariello, V.T. Ho, G. Novi, T. Fukao and P. Perata // *The Plant Journal.* 2012. – V. 72. – P. 282-293.

190. Nga N. T.T. Identification of genes for resistance to a *Digitaria* isolate of *Magnaporthe grisea* in common wheat cultivars / N. T.T. Nga, V. T.B. Hau, Y. Tosa // *Genome.* - 2009. – Vol. 52(9). – P. 801-809, <https://doi.org/10.1139/G09-054>.

191. Openshaw S.J. Marker assisted selection in backcross breeding. In: *Analysis of molecular marker data* / S.J. Openshaw, S.J. Jarboe, W.D. Bears // *Joint plant Breed. Symp. Ser. Corvallis, Oregon, USA, 1994.*- P. 41-43.

192. Padmanabhan S.Y. Identification of pathogenic races of *Pyricularia oryzae* in India / S.Y. Padmanabhan, N.K. Chakrabarti,

S.C. Mathur, J. Veeraraghwan // *Phytopathology*. – 1970. – № 60. – 1574-1577.

193. Panaud O. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) / O. Panaud, X. Chen, S. R. McCouch // *Molecular and General Genetics MGG*. - 1996, Volume 252 (5). - p. 597–607.

194. Park J.-H. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum* / J.-H. Park, G.J. Choi, K.S. Jang, H.K. Lim, H. T. Kim, K.Y. Cho, J.-C. Kim // *FEMS Microbiology Letters*. – 2005. – V. 252. – P. 309-313.

195. Rathour R. Virulence structure of the *Magnaporthe grisea* rice population from the northwestern Himalayas / R. Rathour, B. M. Singh, P. Plaha // *Phytoparasitica*. – 2006. – Vol. 34 (3). – p. 281–291.

196. Resurreccion A.P. Classification of cultivated rices into indica and japonica types by the isozyme, RFLP, and two milled-rice methods / A.P. Resurreccion, C.P. Villareal, A. Parco, G. Second, B.O. Juliano // *Theor. Appl. Genet.*- 1994.- V. 89.- P. 14-18.

197. Rohlf F.J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1 .80. Exeter Software, Setauket. NY, 1988.

198. Ronald L. DNA-based markers in plants / Ronald L. Phillips and Indra K. Vasil // *Advances in cellular and molecular biology of plants*. - 2001. – Vol. 6. ISBN 978-90-481-5672-6 ISBN 978-94-015-9815-6 (eBook) DOI 10.1007/978-94-015-9815-6.

199. Saghai Maroof M.A. Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP mapping / M.A. Saghai Maroof, G.P. Yang, R.M. Biyashev et al. // *Theor. Appl. Genet.*- 1996.- V. 92.- P. 541-551.

200. Saito A. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice / A. Saito, M. Yano, N. Kishimoto, M. Nakagahra, et al. // *J Breed.* – 1991.- Vol. 41. – P. 665–670.

201. Saito K. Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus Ctb1 for cold tolerance at the booting stage of rice / K. Saito, Y. H. Saito, W. M. Funatsuki, Y. Sato et al. // Theor. Appl. Genet. – 2004. – № 109. – P. 515-522.

202. Saji S. A physical map with yeast artificial chromosome (YAC) clones covering 63% of the 12 rice chromosomes / S. Saji, Y. Umehara, A.A. Baltazar, H. Yamane, H.A. Tanoue // Genome.- 2001.- V. 44.- P. 32-37.

203. Santoso H. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* / H. Santoso, D. Andriantsimialona, D.W. Utami, J.L. Notteghem, M.H. Lebrun and D. Tharreau // Molecular Ecology Notes. – 2007. – № 7. – P. 667-670.

204. Sasaki R. Inheritance of rice blast resistance / R. Sasaki // Japan. J. Genet.- 1922.- V.1.- P. 81-85.

205. Sasaki T. The progress in rice genomics / T. Sasaki // Euphytica. – 2001. – V. 118. – P. 103-111.

206. Septiningsih E.M. Anaerobic germination-tolerant plants and related materials and methods / E.M. Septiningsih, T. Kretzschmar. – 2015. – WO 2015087282 A1.

207. Septiningsih E.M. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond / E.M. Septiningsih, A.M. Pamplona, D.L. Sanchez, C.N. Neeraja, G.V. Vergara, S. Heuer, A.M. Ismail and D.J. Mackill // Annals of Botany. 2009. – V. 103. – P. 151-160.

208. Septiningsih E.M. QTL mapping and confirmation for tolerance of anaerobic conditions during germination derived from the rice landrace Ma-Zhan Red / E.M. Septiningsih, J.C.I. Ignacio, P.M.D. Sendon, D.L. Sanchez, A.M. Ismail, D.J. Mackill // Theor Appl Genet. – 2013. – № 126 (5). – P. 1357-1366.

209. Shalini Ph. Genetic analysis of fertility restoration under CGMS system in rice (*Oryza sativa* L.) using three-way test-cross method / Ph. Shalini, S.Manonmani, S. Robin // Journal of Genetics. – 2015. – Vol. 94 (1), p. 9–16.

210. Sharma T. R. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-k^h* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea* / T. R. Sharma, M. S. Madhav, B. K. Singh, P. Shanker, T. K. Jana, V. Dalal, A. Pandit, A. Singh, K. Gaikwad, H. C. Upreti, N. K. Singh // Molecular Genetics and Genomics. – 2005. - Vol. 274, p. 569–578.

211. Shinoda H. Studies on the variety resistance of rice to blast / H. Shinoda, K. Toriama, T. Yunoki, A. Ezaka, Y. Sakurai // Bull. Chugoku Agric. Exp. Stn. Ser. A.-1971.- V. 20.- P. 1-25.

212. Snowdon R.J. Molecular markers in Brassica oilseed breeding: current status and future possibilities / R.J. Snowdon, W. Friedt // Plant Breeding. – 2004. – V. 123. – P. 1-8.

213. Staub J.E. Evidence for colinearity among genetic linkage maps in cucumber / J.E. Staub, Z. Sun, S.M. Chung, R.L. Lower // HortScience. – 2007. – № 42. – P. 20-27.

214. Suh J.P. Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.) / J.P. Suh, J.U. Jeung, J.I. Lee, Y.H. Choi, J.D. Yea, P.S. Virk, D.J. Mackill, K.K. Jena // Theoretical and Applied Genetics. – 2009. – V. 120. – P. 985-995.

215. Suh J.P. Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerance genotypes of rice (*Oryza sativa* L.) / J.P. Suh, J.U. Jeung, J.I. Lee, Y.H. Choi et al. // Theor. Appl. Genet. – 2010. – № 120. – P. 985-995.

216. Suh J.P. Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerance genotypes of rice (*Oryza sativa*) / J.P. Suh, J.U. Jeung, J.I. Lee, Y.H. Choi, J.D. Yea, P.S. Virk, D.J. Mackill and K.K. Jena // Theor. Appl. Genet. – 2010. – № 120. – P. 985-995.

217. Takeuchi Y. Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate japonica rice /

Y. Takeuchi, H. Hayasaka, B. Chiba, I. Tanaka et al. // *Breed. Sci.* – 2001. № 51. – P. 191-197.

218. Takuro Ishii. The Effectiveness of Marker-Assisted Introgression in Backcross Breeding for Nutrient Traits of Self-Fertilizing Crops / Takuro Ishii // *Plant Nutrition — Molecular Biology and Genetics.* – 1999. – p. 379-385.

219. Taramino G. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize / G. Taramino, S. Tingey // *Genome.* - 1996. -№ 2 (39) - P. 277-287.

220. Temnykh S. Mapping and genome organization of microsatellite in rice (*Oryza sativa* L.) / S. Temnykh, W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Liporich, Y.G. Cho, S.R. McCouch // *Theor. Appl. Genet.*-2000.-V. 100.- P. 697-712.

221. Thomas M.R. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs) / M.R. Thomas, N.S. Scott // *Theor. Appl. Genet.*- 1993.- V. 86.- P. 985-990.

222. Tikunov Yu.M. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* / Yu.M. Tikunov, L.I. Khrustaleva, G.I. Karlov // *Euphytica.* – 2003. № 131. – P. 71-80.

223. Umehara Y. Construction and characterization of a rice YAC library for physical mapping / Y. Umehara, A. Inagaki, H. Tanoue, Y. Yasukochi, Y. Nagamura // *Molecular Breeding.*- 1995.- V. 1.- P. 79-89.

224. Varshney R.K. Genic microsatellite markers in plants: features and applications / R.K. Varshney, A. Graner, M.E. Sorrells // *TRENDS in Biotechnology.* – 2005. - 23 (1). – P. 48-55.

225. Varshney R.K. Genic molecular markers in plants: development and applications / R.K. Varshney, T. Mahendar, R.K. Aggarwal, A. Börner // *Genomics-Assisted Crop Improvement.* – 2007. – V. 1. – P. 13-29.

226. Varshney R.K. Genomics-assisted breeding for crop improvement / R.K. Varshney, A. Graner, M.E. Sorrells // *Trends Plant Sci.* – 2005. – V. 10. – P. 621-630.

227. Vergara B.S. Deepwater rice and its response to deep-water stress / B.S. Vergara, M.B. Jackson, S.K. De Datta // In: Climate and Rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 1976. – P. 301.
228. Vestheim H. Application of Blocking Oligonucleotides to Improve Signal-to-Noise Ratio in a PCR / Hege Vestheim, Bruce E. Deagle, Simon N. Jarman et al. // Part of the Methods in Molecular Biology book series. – 2010. – Vol. 687. – p. 265-274.
229. Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kupier, M. Zabeau // Nucl. Acids Res. – 1995. – № 23. – P. 4407-4414.
230. Wang G.L. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and Identification of clones linked to Xa-21 disease resistance locus / G.L. Wang, T.E. Holsten, W.Y. Song, H.P. Wang // Plant J.- 1995.- V. 7.- P. 525-533.
231. Wang Z. W. A new fertility restorer locus linked closely to the *Rfo* locus for cytoplasmic male sterility in radish / Zhi Wei Wang, Yu Jie Zhang, Chang Ping Xiang, Shi Yong Mei, Yuan Zhou, Guo Pei Chen, Ting Wang //Theoretical and Applied Genetics. 2008. - Vol. 117, p. 313–320.
232. Wang C. Identification and fine mapping of the new bacterial blight resistance gene, Xa31 (t), in rice / Chuntai Wang, Guoshong Wen, Xinghua Lin, Duanpin Zhang // European Journal of Plant Pathology - 2009. – Vol. 123(2). – p. 235-240. DOI: 10.1007/s10658-008-9356-4
233. Warwick S.I. Phylogeny of tribe Brassiceae (Brassicaceae) based on chloroplast restriction site polymorphisms and nuclear ribosomal internal transcribed spaces and chloroplast trnL intron sequences / S.I. Warwick, C.A. Sauder // Can. J. Bot. – 2005. – V. 83. – P. 467-483.
234. Weber J.L. Human DNA polymorphism and methods of analysis / J.L. Weber // Curr. Opin. Biotechnol.- 1990.- V. 1.- P. 166-171.
235. Weising K. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi / K. Weising,

- H. Nybom, K. Wolff, W. Meyer. USA, Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. – 444 p.
236. Wu J.L. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates / J.L. Wu, Y.Y. Fan, D.B. Li, et al. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2005. – № 111. – P. 50-56.
237. Wu B. Recombinant microsatellite amplification: a rapid method for developing simple sequence repeat markers / Bin Wu, Ping Lu, Zongwen Zhang // *Molecular Breeding*. – 2012. – Vol. 29 (1). - p. 53–59.
238. Xia J.Q. DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas / J.Q. Xia, J.C. Corell, F.N., Lee, M.A. Marchetti, D.D. Rhoads // *Phytopathology*. – 1993. – № 83. – P. 1029-1035.
239. Xu K. A high-resolution linkage map in the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1 / K. Xu, X. Xu, P.C. Ronald and D.J. Mackill // *Mol. Gen. Genet.* – 2000. – № 263. – P. 681-689.
240. Xu K. Sub1A is an ethylene response factor-like gene that confers submergence tolerance to rice / K. Xu, X. Xia, T. Fukao, P. Canlas, R. Maghirang-Rodriguez, S. Heuer, A.I. Ismail, J. Bailey-Serres, P.C. Ronald, D.J. Mackill // *Nature*. – 2006. – V. 442. – P. 705-708.
241. Yan Z. Construction of an integrated map of rice with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers / Z. Yan, C. Denneboom, A. Hattendorf, O. Dolstra, T. Debener, P. Stam, P. B. Visser // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2005. – Vol. 110 (4), p. 766–777.
242. Yan Z. Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea* / Z. Yan, Z. Geng, L. Fucheng, W. Zonghua, J. Gulei, Y. Long, W. Ying, C. Xi, X. Zhaohua, Z. Xiangqian, W. Hongkai, L. Jianping, L. Guodong, W. Weiren // *Fungal Genetics and Biology*. – 2008. – № 45. – P. 1340-1347.

243. Yu J. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica) / J. Yu, S. Hu, J. Wang, G.K. Wong, S. Li, Y. Deng et al. // Science.- 2002.- V. 296.- P. 79-91.

244. Zhang M. Association mapping reveals novel genetic loci contributing to flooding tolerance during germination in indica rice / M. Zhang, Q. Lu, W. Wu, X. Niu, C. Wang, Y. Feng, X. Wei // Frontiers in Plant Science. – 2017 a. – P. 1-11.

245. Zhang Y. The Race Structure of the Rice Blast Pathogen Across Southern and Northeastern China /Yaling Zhang, Qiongle Zhu, Yongxiang Yao et al. // Rice. – 2017 б. – Vol. 10 (1), p. 46 <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0185>.

246. Zhao J. Genetic relationships within *Brassica rapa* inferred from AFLP fingerprints / J. Zhao, X. Wang, B. Deng et al. // Theor. Appl. Genet. – 2005. – V. 10. – P. 1301-1314.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1



УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГУП РИЗ
«Красноармейский» им. А.И.Майстренко,
доктор сельскохозяйственных наук
С.В. Кизинёк

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждаю, что в период с 2014 - 2016 г.г. на площади 5 га рисовой оросительной системы хозяйства проходили оценку по комплексу хозяйственно-ценных признаков созданные Е.В. Дубиной линии риса с интродуцированными и пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу.

Отобрано 7 высокопродуктивных, с урожайностью 10 и более т/га, устойчивых к пирикулярриозу, а также с хорошим качеством крупы линии риса, которые готовятся к передаче на государственное сортоиспытание.

Зам. директора
ФГУП «Рисоводческий племенной завод
«Красноармейский» им. А.И. Майстренко»

И.В. Безручко

Приложение 2

УТВЕРЖДАЮ:
Врио директора ФГУЭСП «Красное»
ВНИИ риса
Е.П. Максименко



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждаю, что в период с 2014-2018 гг. на площади 6 га рисовой оросительной системы хозяйства проходили оценку по комплексу хозяйственно-ценных признаков созданные Е.В. Дубина линии риса с интродуцированными и пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу.

Отобрано 8 высокопродуктивных, с урожайностью 10 и более т/га, устойчивых к пирикулярриозу, а также с хорошим качеством крупы сортообразцов риса, которые готовятся к передаче на государственное сортоиспытание. Сорт риса Альянс с геном Pi-ta передан на государственное сортоиспытание в 2017 году.

Зам. директора
ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса



Л.П. Жванько

Специалист по НИОКР
ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса



И.Б. Никитина

Приложение 3



При поддержке Департамента науки,
промышленной политики и предпринимательства города Москвы



Спонсор конкурса



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ • МИНИСТЕРСТВО ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ТОРГОВЛИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК • РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКИЙ СОЮЗ ХИМИКОВ • ЗАО «ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ»



Международная научно-практическая конференция

БИОТЕХНОЛОГИЯ И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ

проводится в рамках Московского международного конгресса

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

При поддержке Департамента науки, промышленной политики и предпринимательства города Москвы

Конкурс молодых ученых
на лучшую научно-исследовательскую работу
ДИПЛОМ
награждается

**Дубина
Елена Викторовна
за работу**

**“Разработка методологии маркер - вспомогательной
селекции риса на устойчивость к MAGNOPORTHE GRISEA L. С
использованием методов ПЦР”
медалью**

Сопредседатель Организационного комитета,
директор Института биомедицинской
химии им.В.Н. Ореховича РАНХ,
академик

А. И. Арчаков



Председатель конкурсной комиссии,
академик

В. И. Швец

www.mosbiotechworld.ru

18-20 марта 2014

Россия, Москва, Новый Арбат, 36/9 (Здание Правительства Москвы)

**ПРЕЗИДИУМ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК**

**НАГРАЖДАЕТ
ДИПЛОМОМ**

старшего научного сотрудника ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института риса Россельхозакадемии

**Дубину
Елену Викторовну**

*За лучшую завершённую научную
разработку 2012 года*

**«ДНК - технологии (молекулярное маркирование) в
повышении эффективности селекции и семеноводства риса»**

**Президент Российской академии
сельскохозяйственных наук**



Г.Романенко

Приложение 6

АДМИНИСТРАЦИЯ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ



ДИПЛОМ

ЛАУРЕАТА ПРЕМИИ
АДМИНИСТРАЦИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
В ОБЛАСТИ НАУКИ, ОБРАЗОВАНИЯ И КУЛЬТУРЫ

№ 558

Краснодар, 07 июня 2013 года

ПОСТАНОВЛЕНИЕМ ГЛАВЫ АДМИНИСТРАЦИИ
(ГУБЕРНАТОРА) КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

от 21 мая 2013 года № 500

ДУБИНА
Елене Викторовне

ПРИСУЖДЕНА ПРЕМИЯ
АДМИНИСТРАЦИИ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

В ОБЛАСТИ НАУКИ ЗА 2012 ГОД

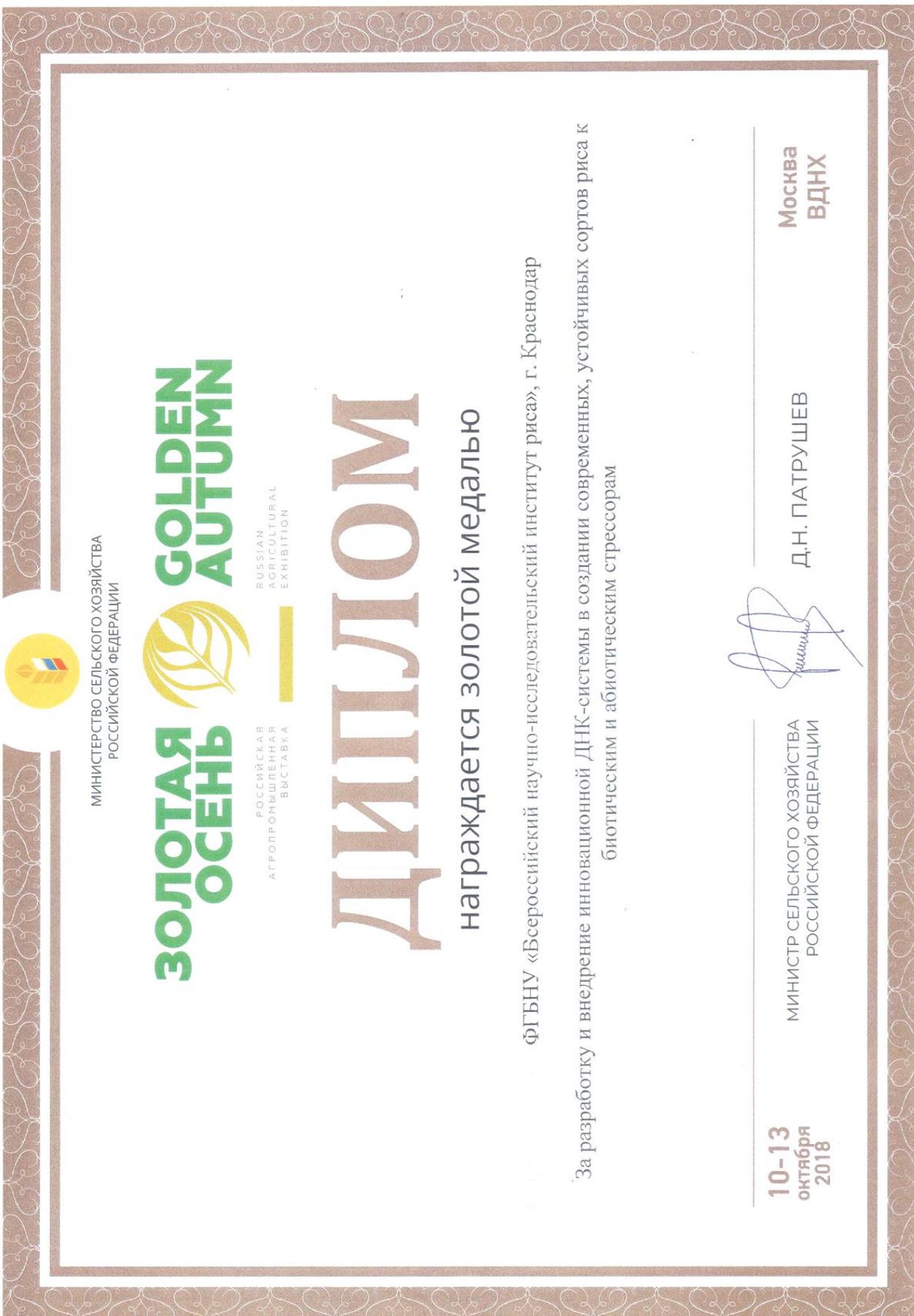
М.П.

Глава администрации
Краснодарского края



Handwritten signature of A. N. Tkachev in blue ink.

А. Н. Ткачев



Приложение 8



Приложение 9

Диплом лауреата премии Правительства РФ



ДИПЛОМ
ЛАУРЕАТА
ПРЕМИИ ПРАВИТЕЛЬСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАСПОРЯЖЕНИЕМ ПРАВИТЕЛЬСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

от 18 декабря 2018 г. № 2827-р

ПРИСУЖДЕНА

ПРЕМИЯ ПРАВИТЕЛЬСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
В ОБЛАСТИ НАУКИ И ТЕХНИКИ

ДУБИНА
Елене Викторовне

Приложение 10

Dr. Nebanin V. M.

Приложение к правилам составления
и подачи заявки на выдачу патента
Форма 301

ФГБУ Государственная комиссия Российской Федерации
по испытанию и охране селекционных достижений
107139, Москва, Орликов пер. 1/11

Номер заявки

--	--	--	--	--	--	--	--

 Дата регистрации

--	--	--	--	--	--	--	--

 (год, месяц, число)

ЗАЯВЛЕНИЕ НА ВЫДАЧУ ПАТЕНТА НА СЕЛЕКЦИОННОЕ ДОСТИЖЕНИЕ

1(a) Заявитель(и) Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» (ФГБНУ «ВНИИ риса») 350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3 <small>(Указать имя юридического или физического лица и его адрес)</small>			
ИНН 2311028161		E-mai:arri_kub@mail.ru	
2(a) Адрес для переписки по заявке			2(б) Это адрес:
3	5	0	9
2	1	350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3	
ФГБНУ «ВНИИ риса»			<input checked="" type="checkbox"/> одного из заявителей
			<input type="checkbox"/> одного из авторов
Телефон	229-45-66	Телефакс	
Телекс	ИНН 2311028161		<input type="checkbox"/> доверенного лица
3(a) Род, вид		Рис посевной <small>(русское название)</small>	
3(б) Род, вид		Oriza sativa. L. <small>(латинское название)</small>	
4(a) Предлагаемое название		Ленарис	
4(б) Селекционный номер		КП - 30	
5(a) Действительным(и) автором(ами) является(ются):			
<input type="checkbox"/> заявитель(и) (все)		<input checked="" type="checkbox"/> следующее(ие) лицо(а)	
Фамилия	Имя	Отчество	Адрес
Дубина	Елена	Викторовна	350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, ул. Серединная, д. 9
Рубан	Маргарита	Георгиевна	350916, г. Краснодар, ст. Елизаветинская, ул. Набережная, д. 79
Максименко	Евгений	Петрович	353814, Краснодарский кр., Красноармейский р-н, пос. Октябрьский, ул. Красная, д. 47, кв.12
По имеющейся у меня (нас) информации других действительных авторов нет.			
5(б) Селекционное достижение получено заявителем(ями):			
<input checked="" type="checkbox"/> по договору			
<input type="checkbox"/> по наследству			
<input type="checkbox"/> иначе (указать)			
5(в) Селекционное достижение выведено в стране (ах) Россия			

Приложение 11

ФГБУ "ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ИСПЫТАНИЮ И ОХРАНЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ ДОСТИЖЕНИЙ"

Орликов пер., 1/11, Москва, 107139
Тел. : (495) 607-86-26; Факс (495) 411-83-66

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ ЗАЯВКИ

Кому : ФГБНУ 'ВНИИ РИСА'
Адрес : 350921, Г. КРАСНОДАР, П/О БЕЛОЗЕРНЫЙ, 3

Культура Рис
Сорт / Гибрид ЛЕНАРИС

Ваша заявка на выдачу патента прошла процедуру предварительной экспертизы.

Заявке присвоен № **76046 / 8153452** Дата регистрации **25.10.2018**
Год начала испытаний **2019** Дата приоритета **25.10.2018**

Решение по Вашей заявке будет принято после:

- оценки на ООС по результатам испытаний на ГСУ. Вы должны выслать в указанные ниже пункты испытаний с отметкой "идентификация" необходимое количество посадочного материала:

		кв. семян	мест в кв.
БЕЛОЗЕРНЫЙ	353826, КРАСНОДАР. К., КРАСНОАРМЕЙСК. Р.-Н. П. РИСООПЫТН ЫЙ, УЛ. КОМСОМОЛЬСКАЯ, Д. 6, К. 6	4	120

В установленные сроки Вам необходимо оплатить соответствующие госпошлины и выслать копии платежных поручений в отдел Регистрации Госкомиссии. Размер пошлин указан в рублях:

	руб.
4 Экспертиза селекционного достижения на новизну	330
5 Испытание селекционного достижения на отличимость, однородность и стабильность	5280

Пошлины принимаются на прилагаемый счет.

Платеж производится отдельно по каждому заявленному селекционному достижению. В платежном поручении необходимо указать код госпошлины в соответствии с положением о патентных госпошлинах на селекционные достижения, культуру и название сорта (гибрида), за который производится платеж.

- Вписавание риской не допускается
Открыть ф. 30Р (заявление на выдачу патента, все материалы
поставить компьютером)*
- Отдел зертвовак: на фото должно быть одно растение! Растение на фото не соответствует описанию сорта по высоте (п. 23), а п. 23 расходится в свою очередь с данными измерениями высоты растений и длиной метелки (там явно ошибочные данные)*
- Замените фото растений и "Показатели по " 27. 11/18
измерениями длины стебля и метелки"*

НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА РЕГИСТРАЦИИ
И ГОСРЕЕСТРОВ

О.М. ПЕРЦУХОВА

Приложение 12

ФГБНУ ВНИИ риса
УНУ «Коллекция генетических ресурсов
риса, овощных и бахчевых культур»

АКТ

Приема образцов в коллекцию ВНИИ риса для патентного отдела

Для передачи сорта на госсортоиспытание сельскохозяйственных культур в 2018 г. и пополнения генофонда культуры в Коллекцию ВНИИ риса переданы зерно (семена), метелка и описание нового сорта, которому присвоен регистрационный номер коллекции.

№ п/п	Культура	№ каталога ВНИИ риса	Название сорта	Год репродукции	Автор сорта
1	рис	05099	Амтарис	2018	Рубина Е.В. Рубан М.Г.

Руководитель УНУ ВНИИ риса

Коротенко Т.Л.

Дата 10.10.2018 г.

Приложение 13

Заявление на сорт риса Капитан

Приложение 14

Уведомление о присвоении номера заявки на сорт риса Капитан

Приложение 15

Государственная комиссия Российской Федерации
по испытанию и охране селекционных достижений
107139, Москва, Орликов пер., 3а

Приложение 1 к Правилам составления
И подачи заявки на выдачу патента
Форма № 301
Номер заявки

--	--	--	--	--	--	--	--

Дата регистрации

--	--	--	--	--	--	--	--

(год, месяц, число)

ЗАЯВЛЕНИЕ
НА ВЫДАЧУ ПАТЕНТА
НА СЕЛЕКЦИОННОЕ ДОСТИЖЕНИЕ

1 (а) Заявитель (и)
(юридическое или физическое лицо)
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» (ФГБНУ «ВНИИ риса»),
350921, г. Краснодар, пос. Белозёрный, 3

1 (б) Гражданство

2 (а) Адрес для переписки по заявке
3 5 0 9 2 1 г. Краснодар
пос. Белозерный, 3, ФГБНУ
«ВНИИ риса»
телефон 229-45-66 телефакс 229-41-24
телекс

2 (б) Это адрес:
 одного из заявителей
 одного из авторов
 доверенного лица

3 (а) Род, вид **Рис посевной**
(русское название)

3 (б) Род, вид **Oryza sativa L.**
(латинское название)

4 (а) Предлагаемое название **Альянс**

4 (б) Селекционный номер **ВНИИР 1830 -13**

5 (а) Действительным (и) автором (ами) является (ются):
 заявитель (и) (все) следующее (ие) лицо (а)

Фамилия	Имя	Отчество	Адрес
Шиловский	Валентин	Николаевич	350062, г. Краснодар, ул. Атарбекова, 32, кв. 71
Оглы	Андрей	Михайлович	353811, Красноармейский район, х. Трудобеликовский, ул. Таманская, 59
Дубина	Елена	Викторовна	350921, г. Краснодар, п. Белозёрный, ул. Срединная, 9

По имеющейся у меня (нас) информации других действительных авторов нет.
5(б) Селекционное достижение получено заявителем (ями):
 по договору
 по наследству
 иначе (указать)

5 (в) Селекционное достижение выведено в стране (ах) **Россия**

Приложение 16

ФГБУ "ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО ИСПЫТАНИЮ И ОХРАНЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ ДОСТИЖЕНИЙ"

Орликов пер., 1/11, Москва, 107139
Тел. : (495) 607-86-26; Факс (495) 411-83-66

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ ЗАЯВКИ

Кому : ФГБНУ 'ВНИИ РИСА'
Адрес : 350921, Г.КРАСНОДАР, П/О БЕЛОЗЕРНЫЙ, 3

Культура Рис
Сорт / Гибрид АЛЬЯНС

Ваша заявка на выдачу патента прошла процедуру предварительной экспертизы.

Заявке присвоен № **73414 / 8261653** Дата регистрации **17.11.2017**
Год начала испытаний **2018** Дата приоритета **17.11.2017**

Решение по Вашей заявке будет принято после:

- оценки на ООС по результатам испытаний на ГСУ. Вы должны выслать в указанные ниже пункты испытаний с отметкой "идентификация" необходимое количество посадочного материала:

		кг. семян	метелок
БЕЛОЗЕРНЫЙ	353826, КРАСНОДАР. К., КРАСНОАРМЕЙСК. Р-Н, П. РИСООПЫТН БЫ, УЛ. КОМСОМОЛЬСКАЯ, Д. 6. К. 6	4	120

В установленные сроки Вам необходимо оплатить соответствующие госпошлины и выслать копии платежных поручений в отдел Регистрации Госкомиссии. Размер пошлин указан в рублях:

	руб.
4 Экспертиза селекционного достижения на новизну	330
5 Испытание селекционного достижения на отличимость, однородность и стабильность	5280

Пошлины принимаются на прилагаемый счет.

Платеж производится отдельно по каждому заявленному селекционному достижению. В платежном поручении необходимо указать код госпошлины в соответствии с положением о патентных госпошлинах на селекционные достижения, культуру и название сорта (гибрида), за который производится платеж.

НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА РЕГИСТРАЦИИ
И ГОСРЕЕСТРОВ



О.М. ПЕРЦУХОВА

" 6 " 12 17

Приложение 17

ФГБУ "ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ИСПЫТАНИЮ И ОХРАНЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ ДОСТИЖЕНИЙ"

Орликов пер., 1/11, Москва, 107139

Тел. : (495) 607-86-26; Факс (495) 411-83-66

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ ЗАЯВКИ

Кому : ФГБНУ 'ВНИИ РИСА'

Адрес : 350921, Г.КРАСНОДАР, П/О БЕЛОЗЕРНЫЙ, 3

Культура Рис
Сорт / Гибрид АЛЪЯНС

Ваша заявка на допуск к использованию прошла процедуру предварительной экспертизы.

Заявке присвоен № 73412 / 8261653

Дата регистрации 17.11.2017

Год начала испытаний 2018

Дата приоритета 17.11.2017

Решение по Вашей заявке будет принято после:

- оценки на хозяйственную полезность по ДАННЫМ ГОСУДАРСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ в регионах РФ (семена должны быть высланы по разнарядкам филиалов ФГБУ Госсортокмиссии на сортоучастки заявленных регионов)
- оценки на ООС по результатам испытаний на ГСУ. Вы должны выслать посадочный материал в указанные ниже пункты испытаний с отметкой "идентификация" :

		кг. семян	метелок
БЕЛОЗЕРНЫЙ	353826.КРАСНОДАР.К.,КРАСНОАРМЕЙСК.Р-Н,П.ПРИСОЮБИТ НЫЙ.УЛ.КОМСОМОЛЬСКАЯ.Д.6.К.6	4	120

НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА РЕГИСТРАЦИИ
И ГОСРЕЕСТРОВ



" 6 " 12 17

О.М. ПЕРЦУХОВА

Приложение 18

ФГБНУ ВНИИ риса
УНУ «Коллекция генетических ресурсов
риса, овощных и бахчевых культур»

АКТ

Приема образцов в коллекцию ВНИИ риса для патентного отдела

Для передачи сорта на госсортоиспытание сельскохозяйственных культур в 20 ~~17~~ г. и пополнения генофонда культуры в Коллекцию ВНИИ риса переданы зерно (семена), метелка и описание нового сорта, которому присвоен регистрационный номер коллекции.

№ п/п	Культура	№ каталога ВНИИ риса	Название сорта	Год репродукции	Автор сорта
1	рис	05064	Амбиент	2017	Орлова А.И., Шилова И.В.

Руководитель УНУ ВНИИ риса
Коротенко Г.Л.



Дата 18.10.2017г.

Приложение 19

Заявление на сорт риса Пируэт

Приложение 20

Уведомление о присвоении номера заявки на сорт риса Пируэт

7. АВТОРЫ Всего авторов: 7 <input type="checkbox"/> авторы отказались быть упомянутыми в качестве таковых	
7А. СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ: Фамилия имя отчество: Дубина Елена Викторовна Дата рождения: число: 09 месяц: апрель год: 1977 Гражданство: Российская Федерация Автор согласен с обработкой указанных персональных данных в объеме действий, предусмотренных предоставляемой государственной услугой, и в течение срока действия исключительного права на регистрируемый объект	
Место жительства, включая указание страны: 350921, Российская Федерация, г. Краснодар, пос. Белозёрный, ул. Срединная, дом 9, тел.:+7(918)432-65-82	
Краткое описание творческого вклада автора при создании регистрируемой программы для ЭВМ или базы данных: Разработка структуры базы данных, получение фактических данных	
При публикации сведений о государственной регистрации программы для ЭВМ или базы данных автор просит: (отметить [X]) <input checked="" type="checkbox"/> упоминать его под своим именем <input type="checkbox"/> не упоминать его (анонимно) <input type="checkbox"/> упоминать его под псевдонимом: _____	
8. СВЕДЕНИЯ О ПЛАТЕЛЬЩИКЕ (указываются полное имя физического лица или наименование юридического лица) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»	
<input type="checkbox"/> Для физического лица Серия и номер документа, удостоверяющего личность:	<input checked="" type="checkbox"/> для юридического лица ИНН: 2311028161 КПП: 231101001 КИО:
ИНН:	СНИЛС:
9. СВЕДЕНИЯ О СОДЕРЖАЩИХСЯ В ЗАЯВКЕ ДОКУМЕНТАХ (отметить [X])	
<input type="checkbox"/> идентифицирующие программу для ЭВМ материалы в форме распечатки исходного текста	на л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> идентифицирующие программу для ЭВМ материалы в иной форме	на л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> материалы аудиовизуальных отображений, порождаемых программой для ЭВМ	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> материалы, идентифицирующие базу данных	на 6 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> документы, подтверждающие существенные затраты на создание базы данных	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> реферат	на 1 л. в 2 экз.
<input type="checkbox"/> иные материалы:	на 1 л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> дополнение к заявлению	на л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> доверенность(и)	на л.
<input checked="" type="checkbox"/> документ(ы) об уплате государственной пошлины (представляется по инициативе заявителя)	на 1 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> документ, подтверждающий наличие оснований для освобождения от уплаты государственной пошлины либо для уменьшения ее размера, либо для отсрочки ее уплаты	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> ходатайство(а)	на 1 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> иные документы (указать наименование документа)	на л. в 1 экз.
10. КОНТАКТНЫЕ РЕКВИЗИТЫ ДЛЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ТРЕТЬИМ ЛИЦАМ (тел., адрес электронной почты и др.):	
11. Заявителю известно, что в соответствии с подпунктом 4 пункта 1 статьи 6 Федерального закона от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» Федеральная служба по интеллектуальной собственности осуществляет обработку персональных данных субъектов персональных данных, указанных в заявлении, в целях и объеме, необходимых для предоставления государственной услуги. Заявитель настоящим подтверждает, что имеет согласия субъектов персональных данных, указанных в заявлении (за исключением представителя), на обработку их персональных данных, приведенных в настоящем заявлении, в Федеральной службе по интеллектуальной собственности в связи с предоставлением государственной услуги. Согласия оформлены в соответствии со статьей 9 Федерального закона от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных».	
12. ПОДПИСЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ(ЕЙ) (ПРАВОБЛАДАТЕЛЯ(ЕЙ) ИЛИ ЕГО (ИХ) ПРЕДСТАВИТЕЛЯ(ЕЙ)) Директор ФГБНУ «ВНИИ риса»  Гаркуша С.В./  М.П.	
<i>(от имени юридического лица заявление подписывается руководителем организации или иным лицом, уполномоченным на это в установленном законодательством Российской Федерации порядке, с указанием его должности и скрепляется печатью юридического лица при наличии печати. Подпись любого лица должна быть расшифрована с указанием фамилии и инициалов и указана дата заявления персональных данных в целях и объеме. Правообладатели – физические лица подтверждают согласие с обработкой указанных в данном заявлении персональных данных в целях и объеме, необходимых для предоставления государственной услуги, и в течение срока действия исключительного права на регистрируемый объект)</i>	

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2019620149

«ШТАММЫ ПАТОГЕНА *RYRICULARIA ORYZAE* SAV.
ЮГА РОССИИ»

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» (RU)*

Авторы: *Дубина Елена Викторовна (RU), Харченко Елена Семёновна (RU), Серая Лидия Ивановна (RU), Рубан Маргарита Георгиевна (RU), Гаркуша Сергей Валентинович (RU), Подколзин Олег Анатольевич (RU), Нартымов Дмитрий Владимирович (RU)*

Заявка № 2018621608

Дата поступления 06 ноября 2018 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 24 января 2019 г.

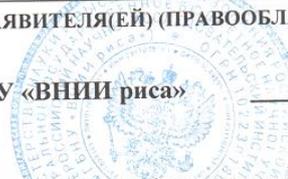


Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

Приложение 23

ВХОДЯЩИЙ НОМЕР ВК _____ Дата поступления: ____ . ____ . 20 ____	РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ ИЛИ БАЗЫ ДАнных в РЕЕСТРЕ _____ Дата регистрации: ____ . ____ . 20 ____	РЕГИСТРАЦИОННЫЙ номер заявки _____ Дата поступления: ____ . ____ . 20 ____
В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп.1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993 З А Я В Л Е Н И Е о государственной регистрации (отметить [X]): <input type="checkbox"/> Программы для ЭВМ <input checked="" type="checkbox"/> Базы данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с пунктом 4 статьи 1259 Кодекса <input type="checkbox"/> Базы данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с пунктом 3 статьи 1334 Кодекса		АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (Почтовый индекс, адрес на терри- тории Российской Федерации; имя или наименование адресата) 350921, Российская Федерация, г. Краснодар, пос. Белозёрный, 3 ФГБНУ «ВНИИ риса», Гаркуша Сергей Валентинович Тел.: 8(861)229-41-98 Факс: 8 (861)229-41-49 Адрес электронной почты: arrri_kub@mail.ru
Представляя указанные ниже документы, заявитель подтверждает отсутствие в представленном на регистрацию объекте сведений, составляющих государственную тайну, и предоставляет Роспатенту право на воспроизведение материалов, идентифицирующих регистрируемый объект, на бумажном носителе и путем записи на электронном носителе, в том числе записи в память ЭВМ, в целях, необходимых для предоставления государственной услуги		
1. НАЗВАНИЕ ПРЕДСТАВЛЕННОЙ НА РЕГИСТРАЦИЮ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ ИЛИ БАЗЫ ДАННЫХ «Анализ популяций возбудителя пирикулярноза риса (<i>Pyricularia oryzae</i> Cav.) по признаку вирулентности»		
2. ПРАВООБЛАДАТЕЛЬ (ЗАЯВИТЕЛЬ(И)) ОГРН: 1022301808000 ИНН: 2311028161 Серия и номер документа, удостоверяющего личность _____ СНИЛС: _____ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» 350921, Российская Федерация, Краснодарский край, г. Краснодар, п. Белозерный, 3 <i>(указываются фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) и место жительства (для физического лица) или наименование юридического лица (согласно учредительным документам) и место нахождения (для юридического лица), включая название страны. Данные о месте жительства автора(ов)-заявителя(ей) приводятся в графе 7А)</i> <input checked="" type="checkbox"/> регистрируемый объект создан за счет средств федерального бюджета Указанное лицо является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ: <input type="checkbox"/> исполнителем работ по <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту заказчик работ: Контракт от: ____ . ____ . 20 ____ № ____ Всего правообладателей <u> 1 </u> <i>(заполняется только в случае создания программы для ЭВМ или базы данных по государственному или муниципальному контракту)</i>		
2А. ОСНОВАНИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПРАВА НА РЕГИСТРИРУЕМУЮ ПРОГРАММУ ДЛЯ ЭВМ ИЛИ БАЗУ ДАННЫХ: (отметить [X]) (заполняется, если заявитель является юридическим лицом, или состав заявителей не соответствует составу авторов) <input checked="" type="checkbox"/> заявитель является работодателем автора <input type="checkbox"/> передача прав автором или его правопреемником заявителю <input type="checkbox"/> передача прав работодателем заявителю <input type="checkbox"/> в порядке универсального правопреемства (наследование, реорганизация) <input type="checkbox"/> заявитель является изготовителем базы данных <input type="checkbox"/> заявитель является автором _____ <i>Для БД, охраняемой смежными правами</i> <i>Иное - указать</i>		
3. РЕГИСТРИРУЕМЫЙ ОБЪЕКТ <input checked="" type="checkbox"/> Не содержит персональные данные <input type="checkbox"/> Содержит персональные данные Регистрационный номер _____ в Реестре операторов, осуществляющих обработку персональных данных		
4. ГОД СОЗДАНИЯ РЕГИСТРИРУЕМОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ ИЛИ БАЗЫ ДАННЫХ <u> 2018 </u>		
5. СТРАНА И ГОД ОБНАРОДОВАНИЯ (ПЕРВОГО ОПУБЛИКОВАНИЯ) РЕГИСТРИРУЕМОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ ИЛИ БАЗЫ ДАННЫХ: Страна: <u> Российская Федерация </u> Год: <u> 2018 </u>		
5А. ГОД ОБНОВЛЕНИЯ РЕГИСТРИРУЕМОЙ БАЗЫ ДАННЫХ, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с пунктом 3 статьи 1334 Кодекса _____		
6. Представленная на регистрацию база данных зарегистрирована в Реестре баз данных как: <input type="checkbox"/> База данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с пунктом 4 статьи 1259 Кодекса. Рег. № _____ от _____ <input type="checkbox"/> База данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с пунктом 3 статьи 1334 Кодекса. Рег. № _____ от _____ <input type="checkbox"/> нет		

7. АВТОРЫ Всего авторов: 9 <input type="checkbox"/> авторы отказались быть упомянутыми в качестве таковых	
7А. СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ: Фамилия имя отчество: Дубина Елена Викторовна Дата рождения: число: 09 месяц: апрель год: 1977 Гражданство: Российская Федерация Автор согласен с обработкой указанных персональных данных в объеме действий, предусмотренных предоставляемой государственной услугой, и в течение срока действия исключительного права на регистрируемый объект	
Место жительства, включая указание страны: 350921, Российская Федерация, г. Краснодар, пос. Белозёрный, ул. Срединная, дом 9, тел.:+7(918)432-65-82	
Краткое описание творческого вклада автора при создании регистрируемой программы для ЭВМ или базы данных: Разработка структуры базы данных, получение фактических данных	
При публикации сведений о государственной регистрации программы для ЭВМ или базы данных автор просит: (отметить [X]) <input checked="" type="checkbox"/> упоминать его под своим именем <input type="checkbox"/> не упоминать его (анонимно) <input type="checkbox"/> упоминать его под псевдонимом: _____	
8. СВЕДЕНИЯ О ПЛАТЕЛЬЩИКЕ (указываются полное имя физического лица или наименование юридического лица) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»	
<input type="checkbox"/> Для физического лица Серия и номер документа, удостоверяющего личность:	<input type="checkbox"/> для юридического лица ИНН: 2311028161 КПП: 231101001 КИО:
ИНН:	СНИЛС:
9. СВЕДЕНИЯ О СОДЕРЖАЩИХСЯ В ЗАЯВКЕ ДОКУМЕНТАХ (отметить [X])	
<input type="checkbox"/> идентифицирующие программу для ЭВМ материалы в форме распечатки исходного текста	на л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> идентифицирующие программу для ЭВМ материалы в иной форме	на л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> материалы аудиовизуальных отображений, порождаемых программой для ЭВМ	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> материалы, идентифицирующие базу данных	на 4 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> документы, подтверждающие существенные затраты на создание базы данных	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> реферат	на 1 л. в 2 экз.
<input type="checkbox"/> иные материалы:	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> дополнение к заявлению	на 1 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> доверенность(и)	на л.
<input checked="" type="checkbox"/> документ(ы) об уплате государственной пошлины (представляется по инициативе заявителя)	на 1 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> документ, подтверждающий наличие оснований для освобождения от уплаты государственной пошлины либо для уменьшения ее размера, либо для отсрочки ее уплаты	на л. в 1 экз.
<input checked="" type="checkbox"/> ходатайство(а)	на 1 л. в 1 экз.
<input type="checkbox"/> иные документы (указать наименование документа)	на л. в 1 экз.
10. КОНТАКТНЫЕ РЕКВИЗИТЫ ДЛЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ТРЕТЬИМ ЛИЦАМ (тел., адрес электронной почты и др.):	
11. Заявителю известно, что в соответствии с подпунктом 4 пункта 1 статьи 6 Федерального закона от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» Федеральная служба по интеллектуальной собственности осуществляет обработку персональных данных субъектов персональных данных, указанных в заявлении, в целях и объеме, необходимых для предоставления государственной услуги. Заявитель настоящим подтверждает, что имеет согласия субъектов персональных данных, указанных в заявлении (за исключением представителя), на обработку их персональных данных, приведенных в настоящем заявлении, в Федеральной службе по интеллектуальной собственности в связи с предоставлением государственной услуги. Согласия оформлены в соответствии со статьей 9 Федерального закона от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных».	
12. ПОДПИСЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ(ЕЙ) (ПРАВООБЛАДАТЕЛЯ(ЕЙ) ИЛИ ЕГО (ИХ) ПРЕДСТАВИТЕЛЯ(ЕЙ))	
 Директор ФГБНУ «ВНИИ риса» _____ /Гаркуша С.В./ М.П.	
<i>(от имени юридического лица заявление подписывается руководителем организации или иным лицом, уполномоченным на это в установленном законодательством Российской Федерации порядке, с указанием его должности и скрепляется печатью юридического лица при наличии печати. Подпись любого лица должна быть расшифрована с указанием фамилии и инициалов и указана дата подписания заявления. Правообладатели – физические лица подтверждают согласие с обработкой указанных в данном заявлении персональных данных в целях и объеме, необходимых для предоставления государственной услуги, и в течение срока действия исключительного права на регистрируемый объект)</i>	

Приложение 24

001


Федеральная служба по интеллектуальной
собственности
Федеральное государственное бюджетное
учреждение
**«Федеральный институт
промышленной собственности»
(ФИПС)**
Бережковская наб. 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499)240-60-15. Факс (8-495)531-63-18

350921,
г. Краснодар, п. Белозерный, 3,
ГБНУ "ВНИИ риса",
С.В.Гаркуше

На № 01-34/1045-12 от 16.11.2018

Наш № 2018Э16499

При переписке следует ссылаться на наш №
Исходящая корреспонденция от 07.12.2018



Заявка №/69

Сообщаем Вам, что в Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный институт промышленной собственности» (ФИПС) поступил комплект материалов на регистрацию базы данных: «АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПИРИКУЛЯРИОЗА РИСА (*RYRICULARIA ORYZAE* SAV.) ПО ПРИЗНАКУ ВИРУЛЕНТНОСТИ».

Правообладатель (заявитель) – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса».

В данном комплекте материалов представлен расчетный документ (п/п № 547252 от 12.11.2018) на сумму 4500 руб. с КБК 16811505020016000140 для уплаты патентных пошлин.

Сообщаем Вам, что в соответствии со ст. 333.30 Налогового кодекса РФ при обращении за совершением действий по государственной регистрации программ для ЭВМ, баз данных и топологий интегральных микросхем уплачивается государственная пошлина.

КБК для уплаты государственной пошлины - 16810809000011000110.

49924022:

В случае отсутствия или неправильного указания каких-либо реквизитов пошлина считается неуплаченной, и заявка не может быть принята к рассмотрению.

Если заявитель заинтересован в принятии заявки к рассмотрению, ему предлагается уплатить государственную пошлину на реквизиты для уплаты государственных пошлин.

О факте уплаты предлагается уведомить отдел регистрации программ ЭВМ, баз данных и топологий ИМС ФИПС.

Для возврата неверно уплаченной пошлины плательщику следует направить заявление на имя главного бухгалтера Роспатента Е.А.Киселевой о возврате неверно уплаченной пошлины.

Заявление должно быть оформлено на бланке организации, подписано руководителем и главным бухгалтером организации, подписи должны быть скреплены печатью организации. К заявлению должен быть приложен оригинал платежного документа.

Кроме того, просим уточнить вид объекта, представленный на регистрацию:

- база данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с п. 4 ст. 1259 Кодекса,

либо

- база данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с п. 3 ст. 1334 Кодекса,

поскольку в представленном заявлении отмечено: [x] База данных, государственная регистрация которой осуществляется в соответствии с п. 3 ст. 1334 Кодекса.

Вх. № 3901 от 19.12.2018