

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»**

На правах рукописи

Черткова Наталья Григорьевна

**СОЗДАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ДНК–МАРКЕРОВ СЕЛЕКЦИОННЫХ
ОБРАЗЦОВ РИСА, УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ
СРЕДЫ**

1.5.7. Генетика

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Усатов Александр Вячеславович

Ростов–на–Дону – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Биологические особенности и генетическая изменчивость риса (<i>Oryza sativa</i> L.).....	15
1.2 Геномные исследования риса.....	20
1.2.1 Гены устойчивости риса к глубоководному затоплению.....	22
1.2.2 Гены устойчивости риса к хлоридному засолению.....	29
1.3 ДНК–маркеры в селекции риса.....	36
1.4 Андрогенез <i>in vitro</i> , как метод создания селекционного материала растений.....	39
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1 Объекты исследований.....	46
2.2 Методы исследований.....	48
2.2.1 Молекулярно-генетические методы.....	48
2.2.2 Определение устойчивости селекционных образцов риса к глубоководному затоплению в лабораторных опытах и оранжерейных экспериментах.....	55
2.2.3 Определение солеустойчивости селекционных образцов риса в лабораторных опытах.....	57
2.2.4 Андрогенез <i>in vitro</i>	59
2.2.5 Полевые эксперименты и характеристика гибридов риса по комплексу хозяйственно ценных признаков.....	66
2.2.6 Статистическая обработка результатов.....	69
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
3.1 Отбор исходного материала риса для скрещивания и ДНК–маркеров устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.....	70

3.2	Определение информативности ДНК–маркеров устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.....	77
3.3	Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК гибридных генотипов риса.....	83
3.3.1	Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК гибридного материала риса по устойчивости к глубоководному затоплению.....	83
3.3.2	Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК гибридного материала риса по устойчивости к хлоридному засолению.....	88
3.4	Оценка гибридных образцов риса на устойчивость к абиотическим факторам среды.....	92
3.4.1	Определение устойчивых к глубоководному затоплению гибридных образцов риса.....	92
3.4.2	Определение солеустойчивых гибридных образцов риса.....	100
3.5	Создание дигаплоидных генотипов риса с помощью метода андрогенеза <i>in vitro</i>	105
3.5.1	Получение дигаплоидов риса с генами глубоководного затопления.....	105
3.5.2	Получение дигаплоидов риса с генами солеустойчивости.....	117
3.6	Характеристика линий риса по комплексу хозяйственно ценных признаков в полевых условиях.....	123
	ВЫВОДЫ.....	129
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
	ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	154
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	159
	ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	160

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MAS – маркер–вспомогательная селекция, или селекция с использованием молекулярных маркеров (marker-assisted selection)

APLP – метод анализа однонуклеотидных полиморфизмов в мтДНК

ДНК–маркеры – полиморфный признак, выявляемый методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК

RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA)

AFLP – это маркер полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК (amplified fragment length polymorphism)

SSR–маркеры – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) (Simple Sequence Repeats)

RFLP – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism)

IRGSP – Международный проект по секвенированию генома риса (International Rice Genome Sequencing Project)

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information)

RIS – база данных (Relational Interface System)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)

QTL – локус, связанный с определением количественного признака (quantitative trait locus)

DSR – метод посева риса (Direct seeded rice)

AG – гены энергии прорастания у риса (Anaerobic Germination)

IRRI – Международный институт риса (International Rice Research Institute)

AP2/ERF – семейство транскрипционных факторов встречающихся у растений (APETALA2/ethylene responsive factor).

SK1 и SK2 – гены устойчивости риса к глубоководному затоплению (*SNORKEL1/SNORKEL2*)

Sub1A – ген устойчивости риса к глубоководному затоплению (*SUBMERGENCE*)

in vitro (с лат. – «в стекле») – методика выполнения экспериментов в стерильных условиях

F₁, F₂ – гибриды первого, второго поколения

ЭДТА – четырёхосновная карбоновая кислота (этилендиаминтетрауксусная кислота)

MS – питательная среда Мурасиге и Скуга для культивирования проростков риса

\bar{x} – среднее арифметическое значение признака

s – стандартное отклонение

±SEM – стандартная ошибка средней

C_v – коэффициент вариации

пг – единица измерения содержания ДНК (пикограммы)

R_f – частота рекомбинации

cM – сантиморганида

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рис (*Oryza sativa* L.) – это важнейшая злаковая и продовольственная культура, которая служит богатым источником углеводов и используется в диетическом питании большей частью населения Земли (Jena, Kim, 2020; Kuang et al., 2021; Phukan et al., 2023). Рис – очень чувствительная к условиям выращивания культура, которая предъявляет определённые требования к температуре, влаге и почве. В нашей стране рис выращивают на севере его мирового ареала (Костылев, Краснова, 2022).

В мире рис выращивается на площади около 170 млн. га, основные территории риса сосредоточены в Азии и Африке, а в России на площади около 207 тыс. га, основные территории сосредоточены в Краснодарском крае и Ростовской области (Алабушев и др., 2019). С каждым годом площади посева под этой культурой сокращаются из-за ухудшения пригодности сельскохозяйственных угодий, т.к. значительная их часть осложнена неблагоприятными почвенными условиями (Харитонов и др., 2015). В нашей стране одними из главных факторов, которые могут сокращать урожайность и ухудшать его качество, являются сорные растения и засоленные почвы. Эти причины могут приводить к снижению урожайности риса до 80%. Применение химических препаратов в борьбе с сорняками иногда малоэффективно и нерентабельно, а также приводит к химическому загрязнению воды в оросительных системах и природных водоемах (Oladosu et al., 2020; Черткова и др., 2023). Оптимальным решением возникших проблем является выращивание сортов, устойчивых к абиотическим факторам среды, которые помогут снизить потери урожаев, материальные затраты на химическую защиту, тем самым сократить загрязнение окружающей среды (Oladosu et al., 2020; Черткова и др., 2023).

Актуальность работы обусловлена повышением эффективности создания новых продуктивных сортов и гибридов риса для культивирования

их в конкретных агроэкологических условиях (Костылев и др., 2020; Костылев и др., 2025). Одним из ключевых моментов при создании новых высокоурожайных сортов, является длительность и трудоемкость традиционных селекционных методов, которые по-прежнему широко применяются в нашей стране. Отбор исходного материала по фенотипу и создание на их основе сортов с комплексом хозяйственно ценных признаков и генетической устойчивостью к абиотическим факторам среды может занимать порядка 10–15 лет (Костылев и др., 2025). В связи с этим особое значение приобретает внедрение в классическую селекцию молекулярно-генетических и биотехнологических методов, таких как ДНК-маркирование признаков и андрогенез *in vitro*, которые помогут сократить сроки селекционного процесса (Гончарова, 2005; Ali et al., 2014; Лесняк и др., 2021).

ДНК–маркеры обладают рядом преимуществ перед морфологическими и физиологическими признаками, не подвержены селекционному давлению, равномерно распределены по всему геному и обладают высоким полиморфизмом (Platten et al., 2014). Маркерная селекция существенно оптимизирует процедуру выведения новых сортов, повышая эффективность и сокращая сроки отбора растений, обладающих желаемыми генетическими признаками и возможностью создания их за 6–8 лет (Kumar et al., 2012; Ali et al., 2014, Костылев, 2023).

Другой подход ускорения селекционного процесса – андрогенез *in vitro* (Гончарова, 2012). Главным преимуществом метода является получение гомозиготных линий с важнейшими генетическими и фенотипическими особенностями за 1–2 года (Maharani et al., 2020). Внедрение выше перечисленных технологий в классическую селекцию позволит повысить эффективность и сократить сроки создания новых востребованных сортов собственной селекции.

Степень разработанности темы

Исследованиями, посвященными изучению генетического разнообразия генов устойчивости к биотическим и абиотическим стресс-факторам, качества зерна вида *Oryza sativa* L., занимаются множество ученых, как российских (Авакян и др., 2011; Зеленская и др., 2018; Скаженник и др., 2019), так и зарубежных (Sun et al., 2000; Ren et al., 2005; Zhu et al., 2005; Xu et al., 2006; Septiningsih et al., 2013; Oladosu et al., 2020; Oe et al., 2021; Singh et al., 2021; Zhao et al., 2021; Parida et al., 2022). Множество исследований проводятся с применением биотехнологических методов (андрогенез *in vitro*) для получения дигаплоидных генотипов риса (Chen, 1986; Gueye, Ndir, 2010; Гончарова, 2012; Илюшко, 2019; Maharani et al., 2020; Савенко и др., 2022; Черткова и др., 2022; Kostylev et al., 2023). В настоящее время геном риса полностью секвенирован, созданы базы данных с последовательностями нуклеотидов (Goff et al., 2002; Herwibawa, Kusmiyati, 2020), что значительно облегчает изучение генов устойчивости с применением молекулярно-генетических методов.

Объект исследования

Объектом исследования служили коллекционные образцы риса селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» (г. Зерноград) Боярин, Контакт, Кубояр, Степняк, Командор, Бахус, Магнат, Южанин, Кубань-3 и ФГБНУ «ФНЦ риса» (г. Краснодар) сорт Новатор, зарубежные сорта устойчивые к глубоководному затоплению IR-64, TDK-1, CR-1009, Swarna, Mazhan Red, Khan Dan, BR-11, Inbara-3, Kharsu 80A, Khao Hlan On и хлоридному засолению IR74099, R21(IR86385), R26(IR86385), R20(IR86385), R17(IR86385), FL-478, IR527132B, Pokkali, а также гибриды, полученные в результате скрещивания сортов отечественной и зарубежной селекции.

Цель исследования

Создать на основе ДНК-маркирования и андрогенеза *in vitro* селекционные образцы риса, устойчивые к глубоководному затоплению и

хлоридному засолению, и провести их оценку в полевых условиях по комплексу хозяйственно ценных признаков.

Задачи исследования:

1. На основе лабораторных и полевых испытаний из коллекции «АНЦ «Донской» выделить высокопродуктивные отечественные сорта риса и зарубежные доноры устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

2. Определить информативность ДНК–маркеров устойчивости риса к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

3. Провести гибридизацию между отечественными высокопродуктивными сортами и зарубежными сортами устойчивыми к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

4. Отобрать с помощью ДНК–маркеров гибридные комбинации риса, устойчивые к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

5. С помощью андрогенеза *in vitro* и ДНК–маркирования создать дигаплоидные линии риса, устойчивые к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

6. Оценить устойчивые гибридные комбинации риса по комплексу хозяйственно ценных признаков в полевых условиях.

Научная новизна исследования

Впервые на основе ДНК–маркирования, при скрещивании высокопродуктивных отечественных сортов с зарубежными донорными сортами, созданы гибриды риса с генами устойчивости к глубоководному затоплению *Sub1*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2* и хлоридному засолению *Saltol*, *SKC1*, *SNC*. Методически оптимизирован метод андрогенеза *in vitro* для получения дигаплоидных линий риса. Впервые, на основе метода андрогенеза *in vitro* и ДНК–маркирования, созданы дигаплоидные линии риса устойчивые к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

Теоретическая и практическая значимость

В результате исследования отобраны информативные ДНК–маркеры признака устойчивости риса к глубоководному затоплению и хлоридному засолению. Созданные в ходе работы гибриды и дигаплоидные линии риса на основе селекционного материала отечественных сортов и зарубежных доноров признака устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению, представляют собой перспективный исходный материал для дальнейшей селекционной работы.

Методология и методы исследования

Настоящее исследование проводили на кафедре генетики Академии биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского ЮФУ (Ростов–на–Дону) и в лаборатории клеточной селекции Федерального государственного бюджетного учреждения «АНЦ «Донской» (г. Зерноград). Выделение геномной ДНК из растительной ткани растений риса осуществляли с помощью СТАВ метода с авторскими модификациями (Маркин, 2006). Оценку количества и качества выделенной ДНК проводили на спектрофотометре Implen Nanophotometr NP80. Амплификация осуществлялась в 96-луночных планшетах в термоциклере Rotorgene 6000 (Corbett Research, Австралия) и C1000 Touch (Thermal Cycler, США). Амплификационные продукты подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Гель фотодокументировали в трансиллюминаторе под УФ-светом с помощью видеосистемы GelDoc 2000 (BioRad, США). Электрофореграммы анализировали при помощи программы Bio-Rad ImageLab 6.0. Праймерные пары маркеров с последовательностями олигонуклеотидов, комплементарные участкам генов устойчивости к глубоководному затоплению *Sub1*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2* и хлоридному засолению *Saltol*, *SKC1*, *SNC* отбирали по литературным данным и базы данных Национального центра биотехнологической информации (www.ncbi.nih.gov). Праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (г. Москва). Морфологический и физиологический скрининг устойчивости к

глубоководному затоплению у риса, проводили в лабораторных опытах и оранжерейных условиях, рассчитывали % выживаемости. Оценку устойчивости к хлоридному засолению селекционного материала риса проводили способом проращивания растений 14 дней в растворе воды с добавлением соли (NaCl) в концентрациях 1,0% и 1,5%, рассчитывали показатель скорости роста (длину ростка и корня) и % всхожести семян. Растительный материал (метелки риса), отобранный для метода культуры пыльников *in vitro* (андрогенез *in vitro*), стерилизовали по методике Бутенко Р.Г. (1964). Фенологические наблюдения и оценку морфо–биологических признаков и свойств растений риса проводили по методическим указаниям ВИР и классификатору рода *Oryza* L. (1982). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office, анализ корреляционных и регрессионных методов, построение гистограмм в программном пакете STATISTICA 6.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В результате гибридизации высокопродуктивных отечественных сортов риса с зарубежными сортами, устойчивыми к глубоководному затоплению, с применением информативных ДНК–маркеров, получены гибридные комбинации риса устойчивые к данному стресс–фактору и комплексом хозяйственно ценных признаков.

2. В результате скрещивания высокопродуктивных отечественных сортов с зарубежными образцами, устойчивыми к хлоридному засолению, с применением информативных ДНК–маркеров, получены гибриды риса, устойчивые к данному стресс–фактору и обладающие комплексом хозяйственно ценных признаков.

3. Оптимизирована методика создания дигаплоидных линий риса, с помощью которой получены гомозиготные формы, устойчивые к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

Степень достоверности и апробация диссертации

Достоверность выводов и научных положений диссертации обеспечена применением классических методов селекции с внедрением современных молекулярно–генетических и биотехнологических подходов (андрогенез *in vitro*) для создания новых сортов риса, устойчивых к абиотическим факторам среды. Результаты диссертационного исследования были представлены на 16 международных и всероссийских конференциях: Международная научная конференция, посвящённая 95–летию Ботанического сада ЮФУ «Биологическое разнообразие и биоресурсы степной зоны в условиях изменяющегося климата» (24–29 мая 2022 г., г. Ростов-на-Дону); V Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» посвященная 135–летию со дня рождения Н.И. Вавилова (21–25 ноября 2022 г., Санкт–Петербург); 25 Межвузовская студенческая научная конференция «Студент–Исследователь–Учитель» РГПУ им. А.И. Герцена (3–17 апреля 2023 г., г. Санкт–Петербург); Всероссийская (национальная) научно–практическая конференция «Научно–техническое обеспечение АПК Юга России» (16 мая 2023 г., г. Зерноград, Ростовская область); II Международная молодёжная конференция «Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве» (19–20 октября 2023, г. Обнинск); X Международная конференция «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса» (27 октября 2023 г., г. Ставрополь); Всероссийская научно–практическая конференция Кубанского отделения ВОГиС «Генетический потенциал сельскохозяйственных растений и его реализация в селекции, семеноводстве и размножении» (14 февраля 2024 г., г. Краснодар); XX Всероссийская ежегодная молодежная научная конференция с международным участием «Наука Юга России: достижения и перспективы» (15–26 апреля 2024 г., г. Ростов–на–Дону); Всероссийская (национальная) научно–практическая конференция, посвященная 300–летию Российской академии наук «Научно–техническое обеспечение АПК Юга России» (15–24 мая 2024 г., г. Зерноград,

Ростовская область); VI Международная научно–практическая конференция, посвященная 300-летию Российской академии наук «Проблемы и перспективы научно–инновационного обеспечения агропромышленного комплекса» (26–28 июня 2024 г., г. Курск); III Международная молодежная конференция «Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве» (23–24 октября 2024 г., г. Обнинск); XI международная конференция «Инновационные разработки молодых учёных – развитию агропромышленного комплекса» (5–6 декабря 2024 г., г. Михайловск, Ставропольский край); Международная научно–практическая конференция «Аграрная наука и производство: новые подходы и актуальные исследования» (11–13 февраля 2025 г., пос. Персиановский, Ростовская область); 2–я Всероссийская научно–практическая конференция молодых ученых, посвященная дню Российской науки «Актуальные исследования молодых ученых – результаты и перспективы» (12 февраля 2025 г., г. Благовещенск, Амурская область); Международная научно–практическая конференция «Современные проблемы изучения вредных организмов с целью повышения урожайности культур, получения экологически безопасной продукции и подготовки специалистов по защите растений», посвященная 110–летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора Ю.А. Леонтьевой» (20–21 марта 2025 г., г. Кинель, Самарская область); VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Молодые ученые в аграрной науке» (23–24 апреля 2025 г., г. Луганск, ЛНР).

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 11 печатных работ, в том числе 2 статьи в научных изданиях, включенных в мировые базы научного цитирования (Web of Science, Scopus, RSCI), 2 статьи из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК РФ и 7 тезисов в сборниках по результатам конференций.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно выполнил весь объем полевых и лабораторных работ по теме исследований, а также анализ научной литературы по теме работы, сформулировал цель и задачи исследования, составил схему селекционно-генетических мероприятий. Программа исследования разработана автором на основе предыдущих работ и скорректирована научным руководителем. Отбор селекционных образцов риса, проведение молекулярно-генетических исследований и применение биотехнологических методов (андрогенез *in vitro*) выполнено лично автором. Анализ, обобщение полученных результатов, статистическая обработка данных, формулирование положений, выносимых на защиту и выводов, выполнено автором. Подготовка материала для публикаций по теме диссертации выполнена автором.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представлена на 164 страницах машинописного текста и имеет следующую структуру: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы и приложения. Диссертационная работа включает 66 рисунков, 23 таблицы и 3 приложения. Список использованной литературы включает в себя 197 литературных источников, в том числе 144 на иностранных языках.

Финансовая поддержка работы

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-26-00246 «Изучение локусов количественных признаков, связанных с толерантностью риса к длительному погружению в воду и высокой энергией роста».

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологические особенности и генетическая изменчивость риса

(*Oryza sativa* L.)

Род *Oryza* L. – представлен однолетними и многолетними травянистыми растениями. По общепринятой классификации принадлежит к отделу *Anthophyta* (Покрытосеменных), классу *Monocotyledones* (Однодольных), порядку *Poáceae* (Мятликовые), семейству *Gramíneae* (Злаковые), подсемейству *Oryzoideae* (рисовидных), трибе *Oryzeae* (Рисовых) (Соколова, 1969; Цвелев, 1976). Род *Oryza* насчитывает более 30 диких видов (Khush, 1997; Vaughan et al., 2003). Согласно данным Sweeney, McCouch (2007) и оценкам других систематиков род разделен на четыре видовых комплекса: *O.sativa* (рис посевной), *O.officinalis* (лекарственный), *O.ridelyi* (Ридлея) и *O.granulate* (зернистый) (Wang et al., 1992; Mochizuki et al., 1993; Doi et al., 2002; Cheng et al., 2003; Vitte et al., 2004; Garris et al., 2005; Zhu, Ge, 2005; Londo et al., 2006; Gao, Innan, 2008). Комплекс *O.sativa* состоит из двух культивируемых видов: *O.sativa* (азиатский рис) и *O.glaberrima* (африканский, голый рис), а также шести диких видов: *O.rufipogon* (краснобородый), *O.nivara* (экотип *O.rufipogon*), *O.barthii* (Барта), *O.longistaminata* (длиннотычиночный), *O.meridionalis* (южный) и *O.glumaepatula* (засухоустойчивый) (Sweeney, McCouch, 2007).

В настоящее время азиатский рис (*O. sativa*) является самым распространённым видом в мире и выращивается повсеместно (в Юго-Восточной Азии, на Дальнем Востоке, в Африке, Австралии, Америке, Европе) (Khush, 1997). *O. sativa* появился благодаря одомашниванию дикого вида *O.perennis* Moench. Зоной возделывания риса вида *O.glaberrima* является Западная Африка, жители которой также используют в пищу зерно ряда дикорастущих видов риса точечного (*Oryza punctata*) и риса короткоязычкового (*Oryza barthii*). Дикие виды *O.rufipogon* можно встретить по всей Азии и Океании, *O.barthii* и *O.longistaminata* встречается в разных

районах Африки, *O. meridionalis* произрастает в Австралии, а *O. glumaepatula* в Центральной и Южной Америке. *O. sativa*, в зависимости от географических условий произрастания и по форме колоска, ученые разделили на два подвида: *indica* (индийский) и *japonica* (японский) (Sweeney, McCouch, 2007). Сорты *indica* и *japonica* соответствуют классификации предложенной S. Kato с соавторами (1928). Сорты *indica* – это растения, которые типичны для тропических и субтропических зон, которые произрастают по всей Южной и Юго-Восточной Азии и на юге Китая. Сорты *japonica* выращивают в северной Калифорнии, США, умеренных зонах Японии, Китая и Кореи (Костылев и др., 2004). В видовом многообразии риса имеются отличительные в генетическом отношении, группы сортов Индийского субконтинента, такие как *aromatica* (например, *basmati*) и сорта Бангладеш и Бенгалии, такие как *aus* (Глазко и др., 2009).

Происхождение риса до сих пор остается загадкой и вызывает много споров среди ученых. Если брать во внимание распространение видов риса, то можно предположить места центров происхождения этой культуры, из которых появились современные сорта. А. De Candolle (1883), считал центром происхождения культуры риса Индию и Китай, а Н. И. Вавилов (1935), только Индию (Бирму и Ассам). Т. Chang (1976) считал центром происхождения *O. sativa* Северо-Восточную Индия и Северный Бангладеш. Рис *O. sativa*, на основании археологических и лингвистических исследований ученых, впервые был одомашнен в бассейне реки Янцзы (Китай) и в долинах рек Южной и Юго-Восточной Азии более 10000 лет назад (Normile, 1997; Harris, 1996; Vaughan et al., 2008; Zhang et al., 2012). А. Mannion (1999) утверждал, что согласно археологическим данным рис возделывали азиатские фермеры еще в период неолита 11000 лет назад. Культивирование и распространение риса началось с Восточной Азии, далее за ее пределами и затем в Америке согласно, рамок колумбийского обмена. Вид *O. glaberrima* был доместичирован в Африке примерно 3000 лет назад (Choi, Young, 2019). Существуют также данные о найденных в Китае образцах риса, которые

датируются 3000 годов до нашей эры, в южную Японию рис был завезен примерно за 100 лет до нашей эры (Khush, 1997). Существует мнение, что прародителем риса *O.sativa* является дикий многолетний азиатский вид *O.perennis* или *O.rufipogon* (Sharma, Shastry, 1965; Oka, Morishima, 1982; Morishima, 1986). Два основных вида культурного риса *O.sativa* (азиатский культурный рис) и *O.glaberrima* (африканский культурный рис) были одомашнены независимо друг от друга. Азиатский рис был получен из азиатского дикорастущего риса (*O.rufipogon*) и имеет два основных вида: *japonica* и *indica*. *O.sativa japonica* был окультурен около 9000 лет назад, а *O.sativa indica* был выведен позже, с интрогрессией аллелей вида *japonica*. Около 3500 лет назад *O.glaberrima* был получен из *O. barthii*, который отделился от *O. rufipogon* примерно 600 000 лет назад (Shang, et al., 2022).

Посевной рис представляет собой группу сортов, выведенных в ходе длительного процесса окультуривания диких видов с пигментированным околоплодником (Зеленская и др., 2018). Рис посевной (*Oryza sativa* L.) – это злаковое, самоопыляющееся растение-гидрофит, т.е. выращивается на затопленной почве. Корневая система мочковатая, с поверхностным расположением корней, которые хорошо ветвятся и могут проникать на глубину до 60 см (рисунок 1).



Рисунок 1 – Растение риса

Растение риса имеет длинные побеги в виде полых соломины, с ребристыми жилками (до 35 см) и линейно–ланцетными листьями. Соцветием риса является остистая или безостая ветвистая метелка с одноцветковыми колосками. В основании колоска по бокам находятся колосковые чешуи. Цветки у растений риса обоеполые, которые имеют остистую или безостую цветковую чешую, околоцветковые пленки, шесть тычинок и завязь. Плод риса – пленчатая зерновка, находящаяся в полости цветковых чешуй (Авакян и др., 2011). Форма и окраска зерновок: короткие или удлиненные, длинные и серебристо-белые, красные, желто-коричневые и черные.

Рис является важной злаковой и продовольственной культурой, которая служит богатым источником углеводов для большей части населения Земли (Jena, Kim, 2020; Kuang et al., 2021; Phukan et al., 2023). Рис очень чувствительная к условиям выращивания культура, которая предъявляет определённые требования к температуре, влаге и почве. Диапазон культивирования культуры очень широк от 53° северной широты до 40° южной. Растения риса могут выращиваться на возвышенностях; больших

высотах; заболоченных низинах (Авакян и др., 2011; Зеленский, 2016; Naque et al., 2023). В настоящее время рис возделывается в 116 странах мира на площади около 168 млн. га, валовый сбор зерна в последние годы достиг цифр 2846 млн. т (данные на 2024 год). В РФ рис выращивают на севере его мирового ареала на площади около 207 тыс. га, основные площади сосредоточены в Краснодарском крае и Ростовской области (Алабушев и др., 2019; Костылев, Краснова, 2022). В нашей стране производством зерна риса занимается в восьми регионах, таких как: Краснодарский край, Республика Дагестан, Ростовская область, Республика Адыгея, Астраханская область, Приморский край, Республика Калмыкия и Чеченская Республика (Черепанова и др., 2021; Тараненко и др., 2021; Костылев, Аксенов, 2021; Черткова и др., 2024).

Урожайность зерен риса в среднем по России составляет 5,9 т/га, которая зависит от условий выращивания, влияния биотических и абиотических факторов среды, такие как затопление, засоление, болезни, а в нашей стране во многом это сорные растения (Черткова и др., 2024). Ведущими селекционными учреждениями в России, создающими сорта риса, являются Федеральное государственное научное учреждение «Федеральный научный центр риса» (ФГБНУ «ФНЦ риса», г. Краснодар), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Аграрный научный центр «Донской» (ФГБНУ «АНЦ «Донской», г. Зерноград), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Приморский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» (ФГБНУ «Приморский НИИСХ», г. Уссурийск), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт орошаемого земледелия» (ФГБНУ ВНИИОЗ, г. Волгоград).

Для маркерной селекции рис выступает в качестве модельной культуры или «эталонной» в понимании биологии зерновых культур. В первую очередь это связано с тем, что рис имеет наименьший, среди семейства злаковых культур, геном (12 хромосом, дающих в сумме 420–470 млн. пн). Благодаря

этому растению получена важная информация об организации и эволюции геномов зерновых культур, а также идентифицированы гены устойчивости к абиотическим и биотическим стресс-факторам (Salzberg et al., 2008; Глазко и др., 2009; Singh et al., 2015). У подвида *japonica* геном составляет 466 млн. пар, а у подвида *indica* – 420 млн. пар. Все виды рода *Oryza* имеют диплоидный ($2n=24$) или тетраплоидный набор ($2n=48$) хромосом, у которых гаплоидное число, т.е. основное число хромосом (n) равно 12.

1.2 Геномные исследования риса

Благодаря достижениям в области геномики и биотехнологии, рис стал модельным видом сельскохозяйственных культур. В настоящее время геном риса полностью секвенирован. Основной набор хромосом у растений риса ($n=12$) определили в 1910 году (Khush, 2001). В 1963 году установлено 12 групп сцепления для *Oryza sativa*, что соответствует гаплоидному числу хромосом (Causse et al, 1994). Следует отметить, что группы сцепления у двух подвидов риса *japonica* и *indica* не совпадают полностью. Данные различия, по всей вероятности, обусловлены генетическими отличиями и структурными особенностями хромосом у указанных подвидов.

В Корнельском университете (США) была создана первая генетическая карта риса, основанная на анализе 135 маркеров типа RFLP (McCouch et al., 1988). На данный момент создана база данных транскрибирующихся последовательностей, а также получена генетическая карта по 12 хромосомам (Harushima et al., 1998). Секвенированием генома риса занимались ученые, участвующие в двух проектах: Международный проект по секвенированию генома риса (IRGSP) *O. sativa* L. ssp. *japonica* сорта Nipponbare и проект по секвенированию генома *O. sativa* L. ssp. *indica*. В рамках двух проектов были достигнуты результаты в расшифровке 466 Мб последовательностей у *indica* и 420 Мб у *japonica*, что оценивается

идентификацией 30–50 тыс. генов (Goff et al., 2002; Herwibawa, Kusmiyati, 2020). В проектах принимали участие специалисты научных лабораторий из 10 стран (Япония, США, Китай, Тайвань, Корея, Индия, Таиланд, Франция, Бразилия, Англия). Благодаря проекту «3000 геномов риса» секвенированы геномы более 3000 сортов (Bindusree et al., 2017). Несмотря на это секвенирование геномов сортов риса продолжается (Herwibawa, Kusmiyati, 2020). На основе полученных результатов создано множество сетевых баз данных, таких как: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), Gramene (<http://www.gramene.org/>), Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>), RAP-DB (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>), RIS (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) и другие (Herwibawa, Kusmiyati, 2020).

Появление новых типов молекулярных маркеров SNP (Single nucleotide Polymorphisms), также внесло свой вклад в расшифровку генома. SNP помогли создать новую карту 12 хромосом по полиморфизму нуклеотидов в некодирующих межгенных последовательностях у разных сортов риса. В ходе проведенных исследований были открыты новые возможности для идентификации ключевых генов, определяющих важные количественные признаки (QTL) у риса. Была создана карта локализации QTL, которая охватывает основные характеристики урожайности риса, его устойчивость к воздействию соли на начальных этапах роста, засухоустойчивости, толерантности к глубокому затоплению и пирикуляриозу (Lizhi, Nonindependent, 2008; Molina et al., 2011).

В условиях сокращения производства риса и одновременном росте темпов прироста населения остро стоит задача повышения урожайности этой культуры для поддержания продовольственной безопасности (Jena, Kim, 2020). Влияние стресс-факторов окружающей среды демонстрирует неблагоприятные последствия на рост, развитие и продуктивность растений риса (Singh et al., 2021). Абиотические стрессы возникают в результате воздействия таких условий окружающей среды, как затопление, хлоридное засоление и щелочность почвы, засуха, сорная растительность,

токсичность/дефицит минеральных компонентов в почве, воздействие бактерий, вирусов, грибов и насекомых, повышенные или пониженные температуры, высокая концентрация тяжелых металлов (Shahbaz, Ashraf, 2013; Almeida et al., 2016). Взаимодействие факторов окружающей среды с генотипом риса влияет на основные агрономические характеристики, такие как: количество зерен в метелке, масса зерна с метелки, масса 1000 зерен и в итоге урожайность (Li et al., 2018; Singh et al., 2021). Меры борьбы с абиотическими факторами не всегда эффективны и могут отрицательно воздействовать не только на растение, но и на окружающую среду. Например, химическая защита растений риса в ряде случаев малоэффективна и нерентабельна, а также неблагоприятно влияет на окружающую среду, приводя к загрязнению воды в природных водоемах, гибели насекомых, рыб и т. д. Исследование воздействия факторов окружающей среды на агрономические показатели осложняется их динамичной и изменчивой природой (Li et al., 2018). Укрепление способности растений риса противостоять негативным воздействиям окружающей среды является ключевым фактором для повышения объемов производства и обеспечения продовольственной безопасности, особенно в условиях продолжающихся изменений климата (Kumar et al., 2022).

1.2.1 Гены устойчивости риса к глубоководному затоплению

В настоящее время во многих странах мира (Европе, Америке и России) рис высевают прямым способом посева (Direct seeded rice – DSR), в Азиатских же странах основной технологией остается посадка рассады (Kumar et al., 2022). Однако из-за неправильно выравненных полей, сильных дождей и плохого дренажа внедрение методов DSR может привести к снижению всхожести растений риса и гибели молодых побегов. С другой стороны, затопление рисовых чеков сразу после посева помогает в борьбе с сорными растениями, грызунами (Septiningsih et al., 2013). Наводнение в

зарубежных странах – это одно из экологических стресс–факторов, которое ограничивает рост, развитие растений риса, приводя к серьезным потерям урожая (Костылев и др., 2022). Излишнее количество воды приводит к гипоксии или даже аноксии, что серьезно ограничивает анаэробное дыхание растений риса и препятствует функционированию ферментов для расщепления углеводов и выработки энергии, необходимой для роста побегов (Mondal et al., 2020; Oe et al., 2021). Следовательно, создание сортов риса, способных выдерживать затопление во время прорастания, может значительно повысить выживаемость растений и сохранит урожайность (Septiningsih et al., 2013). В исследованиях некоторых ученых установлено, что толерантность к анаэробным условиям у растений риса является целостным полигенным признаком и контролируется взаимосвязью огромного количества физиологических и биохимических процессов, происходящих внутри растения (Mackill, Khush, 2018). Это позволяет растениям риса быстро удлинять стебель при низком уровне кислорода и ускорять газообмен в условиях недостатка кислорода (Mondal et al., 2020). Под воздействием неблагоприятных факторов среды растения риса способны развивать анатомические и морфологические адаптации, например аэренхиму, придаточные корни и воздушные пленки листьев (Черткова и др., 2023). Гены *SUBMERGENCE1* (*Sub1*), *SNORKEL* (*SK1* и *SK2*) и *Anaerobic Germination* (*AG1* и *AG2*), ответственные за устойчивость к глубоководному затоплению у риса, обнаружены и картированы на разных хромосомах (Азарин и др., 2017).

По мнению E. Septiningsih с соавторами (2013), энергия прорастания (*Anaerobic Germination* или *AG*) – это сложный признак, который контролируется несколькими семействами генов (Костылев и др., 2025). Гены способны участвовать в важных процессах, таких как расщепление крахмала до растворимых сахаров, гликолиз, ферментация и другие биохимические и метаболические процессы, которые способствуют выживанию растений риса в условиях глубоководного затопления за счет

удлинения их колеоптиле до поверхности воды (Bailey–Serres, Chang R, 2005; Ismail et al., 2008; Ismail et al., 2012; Mondal et al., 2020). В своих исследованиях S. Angaji с соавторами (2010) провели скрининг тысячи образцов риса из Центра генетических ресурсов IRRI и выявили несколько местных сортов, обладающих устойчивостью к стресс-фактору. В донорном сорте Khao Hlan On идентифицировали пять QTL, из них самый большой картирован на длинном плече хромосомы 9 (qAG-9-2).

Кроме того пять QTL: qAG-1-2, qAG-3-1, qAG-7-2, qAG-9-1 и qAG-9-2 обнаружили у гибридов, полученных от скрещивания линий Khao Hlan On и IR-64 (Haque et al., 2023). В исследованиях других ученых в рекомбинантных инбредных линиях Kinmaze (*japonica*) и DV85 (*indica*) были идентифицированы QTL на хромосомах 1, 2, 5 и 7 (Jiang et al., 2006). Пять QTL обнаружены у 81 RIL, полученного от скрещивания сорта Kinmaze с DV85, они расположены на хромосомах 1, 2, 5 и 7 (Haque et al., 2023). Основные QTL устойчивости к анаэробному стрессу обозначили как AG1 и AG2. Septiningsih (2013) и другие в своих исследованиях идентифицировали QTL на хромосомах 2, 5, 6 и 7 в популяции, полученной от скрещивания толерантного сорта Mazhan Red с неустойчивым сортом IR42 (рисунок 2).

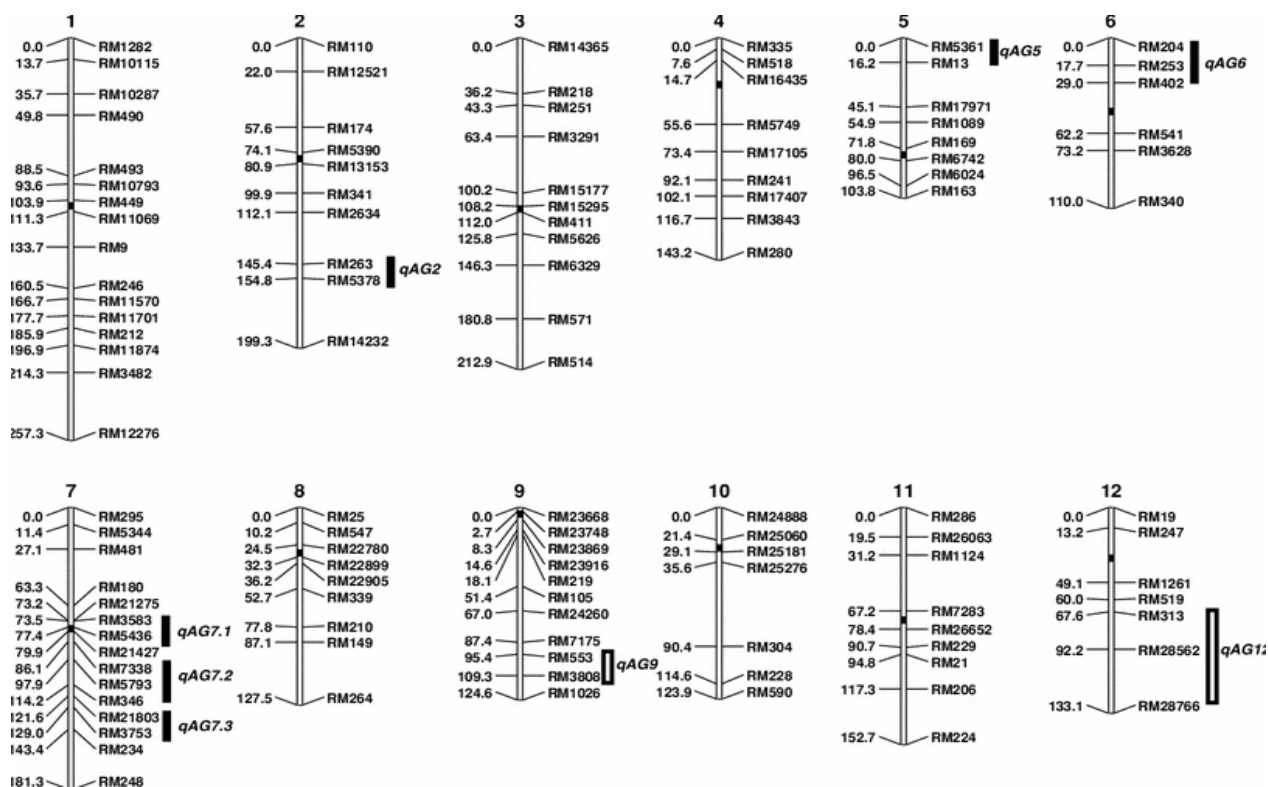


Рисунок 2 – Картирование QTL устойчивости к затоплению во время прорастания, с использованием популяции, полученной от IR42 и Mazhan Red (Septiningsih et al., 2013).

В сорте Mazhan Red идентифицировано шесть значимых QTL на 2, 5, 6, 7 хромосомах, а самые крупные QTL обнаружены на хромосоме 7 (qAG-7-1) в сорте Nanhi (Septiningsih et al., 2013; Baltazar et al., 2014).

У растений риса, есть также два противоположных типа адаптации к глубоководному затоплению. Некоторые виды риса способны избегать неблагоприятные условия, при этом активируя ростовые процессы стебля и листьев. Эта способность направлена на быстрое преодоление слоя воды и возобновления процессов дыхания. Явления удлинения побегов называется «стратегией бегства» или «эффект трубки», типичным примером которой является глубоководный или плавающий рис *Oryza sativa*.

Глубоководные сорта риса в отличие от современных сортов способны выживать на глубине более 50 см в течение месяца. Рост побегов у риса при увеличении уровня воды в чеках достигается за счёт удлинения междоузлий,

которые имеют полые структуры и функционируют, как трубки для обеспечения газообмена с атмосферой, на стадии вегетативного роста (Черткова и др., 2024). Рост междоузлий и развитие растений происходит благодаря действию этилена, гиббереллина и абсцизовой кислоты, а также семейства белков AP2/ERF. Удлинение междоузлий еще называется «плавающей способностью» (Черткова и др., 2023).

Hattori (2009) и другие ученые идентифицировали два гена *SNORKEL1* (*SK1*) и *SNORKEL2* (*SK2*), которые способны кодировать транскрипцию фактора этиленового ответа (Ethylene Responsive Factor), отвечающие за способность у растений риса к плаванию (Haque et al., 2023; Костылев и др., 2025). Локусы *SNORKEL* локализованные на 12 хромосоме, индуцируют выработку гиббереллиновой кислоты, ауксина и вызывают значительное удлинение междоузлий, что облегчает поглощение кислорода из атмосферы и транспортировку его к корням через аэренхиму (Черткова и др., 2023). Гены *SNORKEL* обнаружены у видов риса *O.rufipogon*, *O.nivara* и *O.glumaepatula* (Hattori et al., 2009; Sasayama et al., 2018).

Некоторые виды *O.sativa* сорта *indica* обладают способностью переносить затопление с помощью противоположного механизма, который называется «стратегией покоя» или «синдромом покоя». Механизм покоя проявляется в замедлении физиологических процессов, сохранении энергии, что приводит к кодированию этилена, ограничению метаболизма и роста (Bailey–Serres et al., 2010). Такая толерантность заключается в ограничении процессов метаболизма и роста во время затопления, а после сброса уровня воды возобновления ростовых процессов с использованием сохраненной энергии (Setter, Laureles, 1996; Fukao, Bailey–Serres, 2008).

Известно, что «стратегия покоя» обеспечивается локусом количественного признака (QTL) *SUBMERGENCE 1* (*Sub1*) (Азарин и др., 2016 а; Дубина и др., 2017; Черткова и др., 2023). Локус *Sub1*, расположенный на хромосоме 9, позволяет достичь до 70% выживания растений в стрессовых условиях так как побеги выдерживают полное

погружение до двух недель. В локусе *SUBMERGENCE1* находятся три сходных гена: *Sub1A*, *Sub1B*, *Sub1C*, но только ген *Sub1A* повышает устойчивость растений риса к анаэробным условиям (Xu et al., 2006; Азарин и др., 2016 а; Zhao et al., 2021; Khasna et al., 2020; Черткова и др., 2023; Костылев и др., 2025).

Механизм действия *Sub1* заключается в том, что этилен, накапливающийся во время затопления, индуцирует экспрессию гена *Sub1A*. Индуцированный белок гена *Sub1A* повышает чувствительность тканей к абсцизовой кислоте, что приводит к снижению действия гиббереллиновой кислоты. У гена выявлено несколько аллельных вариантов (*Sub1A-1*, *Sub1A-2*), которые регулируют метаболизм и продлевают период выживания растений риса в условиях глубоководного затопления (Yang et al., 2019; Черткова и др., 2023). Адаптация растения под контролем генов *Sub1* проявляется в избегании условий гипоксии и осуществлении нормальной аэрации тканей после сброса воды (Yang et al., 2021; Zhao et al., 2021). Гены *Sub1A* обнаружены у *O.sativa*, *O.rufipogon*, *O.nivara*. Известно, что механизмы устойчивости к глубоководному затоплению были обнаружены у нескольких видов дикого риса *O. rhizomatis*, *O.eichingeri* и *O.grandiglumis* (Niroula et al., 2012; Okishio et al., 2014). Первыми сортами риса с генами *Sub1*, созданные Международным научно-исследовательским институтом риса (IRRI), были шесть: Swarna, IR-64, Samba Mahsuri, BR-11, TDK-1 и CR-1009. Вторыми не менее значимыми являлись, также разработанные IRRI, сорта Ciherang и PSB Rc18. При этом сорт IR-64 использовался в качестве источника гена *Sub1* (Singh et al., 2017).

Изучением генетических механизмов устойчивости растений риса к глубоководному затоплению занимаются ученые из разных стран. W. Kamolsukyonyong с соавторами (2001) идентифицировали пять значимых QTL на разных хромосомах (QT1 – хромосома 1; qLEI3 – хромосома 3; qTIL12, qNEI12 и qLEI12 – хромосома 12) (Дубина и др., 2017). Благодаря азиатским ученым, применяющим RFLP и AFLP маркеры, сконструирована

карта локусов количественных признаков устойчивости к глубоководному затоплению у растений риса (Xu et al., 2000). В. Chakravarthi, R. Naravaneni (2006) идентифицировали группу SSR-маркеров, которые связаны с толерантностью к глубоководному затоплению у риса (Дубина и др., 2017; Костылев и др., 2025) (рисунок 3).

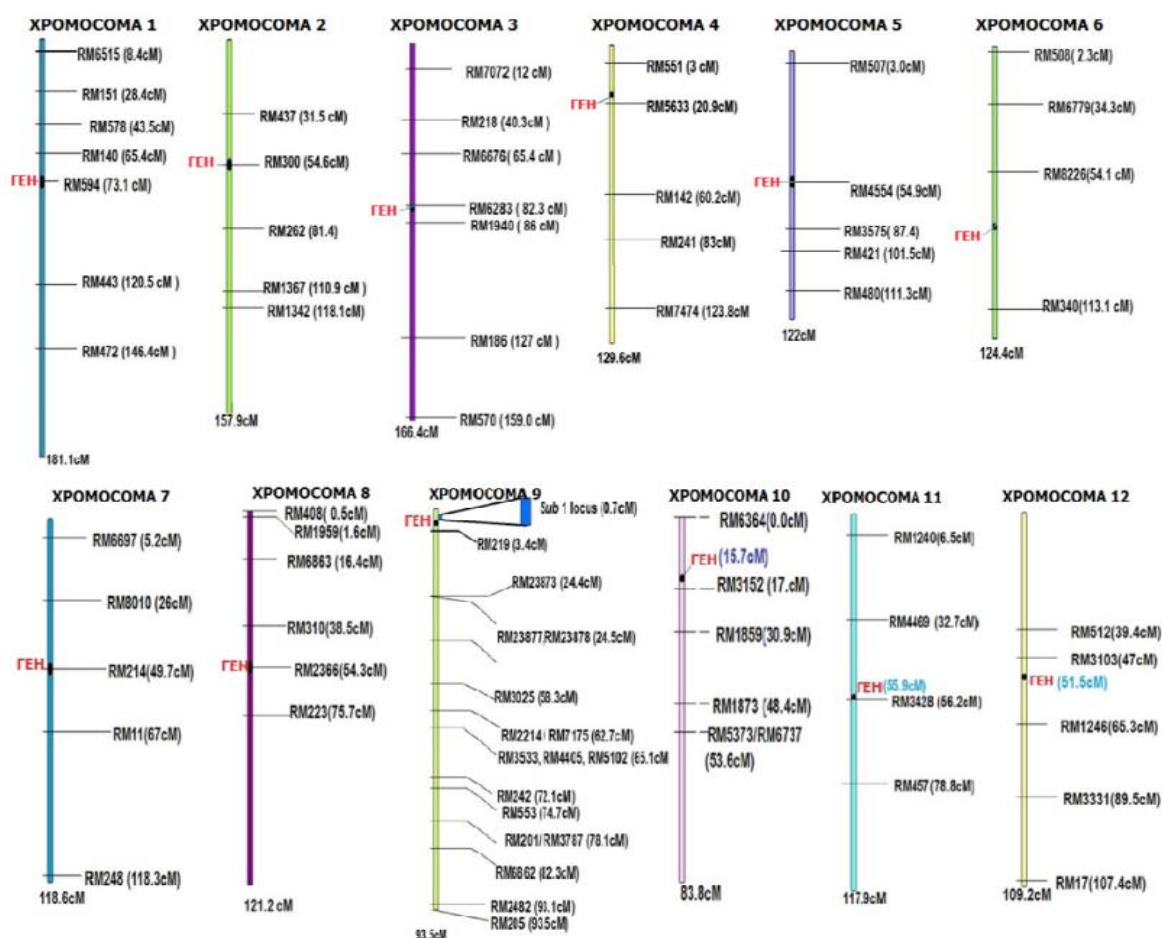


Рисунок 3 – Распределение SSR-маркеров толерантности к длительному затоплению по 12 хромосомам *Oryzae sativa* L. (Chakravarthi, Naravaneni, 2006; Дубина и др., 2017; Костылев и др., 2025)

Способы выживания растений риса в глубоководном слое воды являются противоположными, но не исключают сосуществования этих адаптаций и генов, ассоциированных с данной устойчивостью, у одного сорта или гибрида.

1.2.2 Гены устойчивости риса к хлоридному засолению

Основное распространение риса находится в тропических регионах мира, однако Россия является одним из самых северных регионов его выращивания. Значительная часть сельскохозяйственных угодий, отведённых под рисоводство в нашей стране, осложнена неблагоприятными почвенными условиями: засолением различной степени и типа, а также осолонцеванием. В этих условиях высокие урожаи могут быть получены только при использовании сортов риса с комплексом генов, устойчивости к хлоридному засолению (Харитонов, Гончарова, 2010).

Во всем мире засоленные почвы относятся к числу широко распространенного фактора, который оказывает негативное влияние на сельскохозяйственные культуры, в частности на растения риса (Жоголева и др., 2021). Степень воздействия напрямую коррелирует с уровнем засоления и приводит к ухудшению физиологических свойств растений, приводя к снижению их продуктивности (Шихмуратов, 2011). Высокие концентрации солей оказывают негативное воздействие на растения риса, вызывая целый спектр последствий, от замедления роста и развития всходов до летального исхода (Parida et al., 2004). Высокая засоленность почв приводит к огромным экономическим потерям во всех районах культивирования риса (Kumar et al., 2016; Singh et al., 2021; Черткова и др., 2024). Потери урожайности происходят в частности из-за снижения продуктивности растений и могут достигать до 80% (Ganie et al., 2019).

Засоление – это наличие высокой концентрации растворимых солей в верхних слоях почвы, которое ограничивает поглощение корнями воды и приводит к накоплению токсичных ионов в тканях растений (Харитонов, Гончарова, 2013). Понижение осмотического потенциала почвенного раствора может привести к дефициту воды для растений, даже если почва достаточно увлажнена (Костылев и др., 2025). Это связано с тем, что корням становится труднее поглощать влагу из окружающей среды (Parida et al., 2004). Обычно, засоление появляется в почвах, где преобладает щелочная

реакция, плохая ирригация и засуха (Харитонов, Гончарова, 2013; Herwibawa, Kusmiyati, 2020; Singh et al., 2021). Ученые утверждают, что осмотический стресс при засолении почвы приводит к дефициту H_2O в тканях растения, к накоплению ионов Na^+ и Cl^- и к нарушению соотношения Na^+/K^+ в растительных клетках (Horie et al., 2012). Засоление приводит к динамической конкуренции в тканях растений между Na^+ и K^+ за поглощение.

Рис (*Oryza sativa* L.) – это чувствительная к соли злаковая культура (Tian et al., 2011; Ganie et al., 2019; Yin et al., 2022). Солеустойчивость растений риса представляет собой многофакторный количественный признак, контролируемый множеством генов, документированных с помощью QTL-анализа. Экспрессия связанных с солеустойчивостью генов тесно связана с окружающей средой (Yin et al., 2022). Солеустойчивость подвержена воздействию внешних факторов, таких как высокая температура и влажность. Эти факторы влияют на процессы транспирации воды и транспорта ионов в растительных клетках, что усложняет фенотипирование растений риса в полевых условиях (Shannon, 1997; Wang et al., 2012; Ткачева, Досеева, 2015; Ju et al., 2022). Несмотря на усилия по селекции риса с повышенной устойчивостью к хлоридному засолению, достигнутый прогресс остаётся низким. Это обусловлено, во-первых, недостаточной эффективностью отбора, основанного на общих агрономических признаках. Во-вторых, отсутствуют эффективные методы оценки уровня толерантности к засолению у различных генотипов. В-третьих, отбор по фенотипу устойчивых к засолению растений риса осложняется самой природой этого процесса (Zeng et al., 2003).

Солевые отложения в почве неблагоприятно влияют на все ростовые процессы, происходящие в растениях риса. При этом степень воздействия варьирует в зависимости от стадии развития растений риса. Растительный организм реагирует на стрессовые факторы, как на клеточном уровне, так и на уровне целого организма, что характерно для неустойчивых к засолению

сортов риса (Roy et al., 2014). Все негативные последствия засоления для растений риса обусловлены воздействием ионов на мембраны клетки, осложнением процесса фосфорилирования и необратимыми изменениями в углеводном обмене и дыхании (Negrao et al., 2011).

Растения риса показывают разную реакцию на засоление в фазы развития, например, побеги очень чувствительны на ранних вегетативных (1–3 неделя всходов) и поздних репродуктивных стадиях развития, но частично толерантны в фазу полного кущения, налива зерна и созревания (Thomson et al., 2010; Singh et al, 2021; Черткова и др., 2024). При засолении почвы потери урожая происходят за счет задержки появления метелки, что приводит к увеличению сроков цветения и появлению большого количества стерильных цветков, а также происходит уменьшение длины метелки, высоты растения, количества колосков, корней и листьев (Waziri et al., 2016). Под воздействием стресса, вызванного засолением почвы, растения риса могут запускать морфофизиологические, биохимические и молекулярные механизмы защиты (Thomson et al., 2010). Так как рис является полуводной культурой и может расти в залитой водой почве, его иногда рекомендуют выращивать в проточной воде для выщелачивания солей и опреснения засоленных почв (Ismail et al., 2007; Thomson et al., 2010; Singh et al., 2010).

В настоящее время благодаря генетическим исследованиям, достижениям геномики, с помощью локусов количественных признаков (QTL), анализа ассоциаций и секвенирования генома риса идентифицировано множество QTL, контролирующей устойчивость к хлоридному засолению у риса, расположенных на 12 хромосомах (Zhu et al., 2005; Костылев и др., 2025) (рисунок 4).

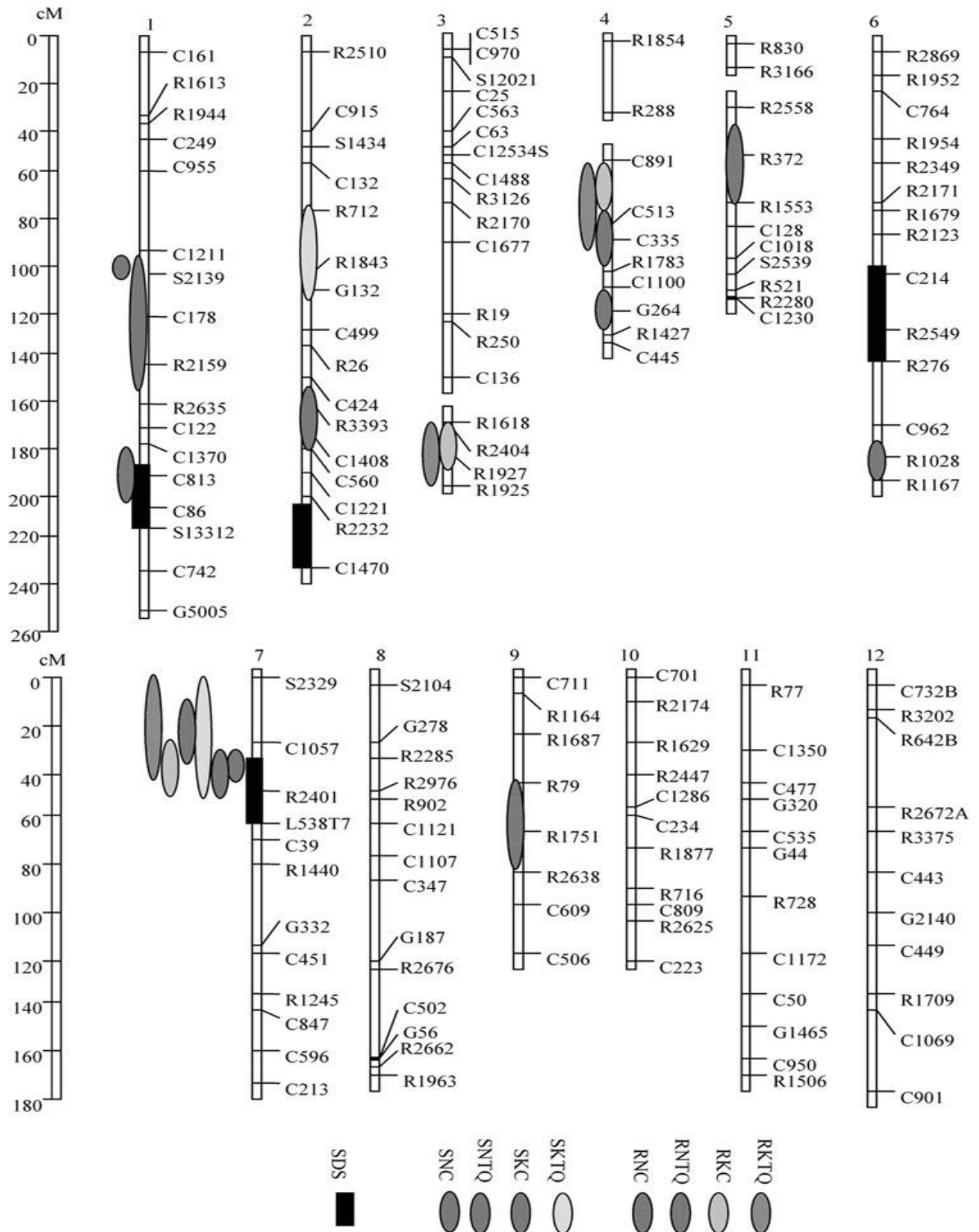


Рисунок 4 – Генетическая карта хромосом риса с указанием местоположения QTL для *SKC1* и других признаков, связанных с солеустойчивостью в популяции F₂ Nona Vokra x Koshihikari (Zhu et al., 2005; Костылев и др., 2025).

Секвенирование большого количества генотипов позволило выявить гены, контролирующие механизмы солеустойчивости (Kumari et al., 2016). За последние годы идентифицированы QTL, которые используются для анализа поглощения Na^+ , K^+ и ионного баланса в корнях и побегах. М. Коуама с соавторами (2001) идентифицировали десять QTL солевого стресса: поглощения Na^+ и K^+ , концентрации Na^+ и K^+ и соотношения Na^+/K^+ в побегах. Р. Вонилла с соавторами (2002) картировали локус *Saltol* на хромосоме 1, связанный с QTL для поглощения Na^+ и K^+ и соотношения Na^+/K^+ . Н. Лин с соавторами (2004) картировали QTL на двенадцати хромосомах риса, которые регулируют концентрации Na^+/K^+ в корнях и побегах. М. Амтар с соавторами (2009) сообщили о 25 идентифицированных QTL, контролирующих концентрацию ионов соли на хромосомах 1, 2, 3 и 8. А. Пандит с соавторами (2010) сообщили о восьми QTL, контролирующих концентрацию ионов соли на хромосомах 1, 8 и 12, а Л. Ченг с соавторами (2012) сообщили о двенадцати QTL контролирующих концентрацию ионов соли на хромосомах 1, 2, 3, 4, 7 и 11.

На протяжении всего жизненного цикла (онтогенеза) риса устойчивость к хлоридному засолению определяется комплексом генов. Основными идентифицированными и картированными генами устойчивости к хлоридному засолению, являются *Saltol* и *SKC1*, расположенные на хромосоме 1 (рисунок 5).

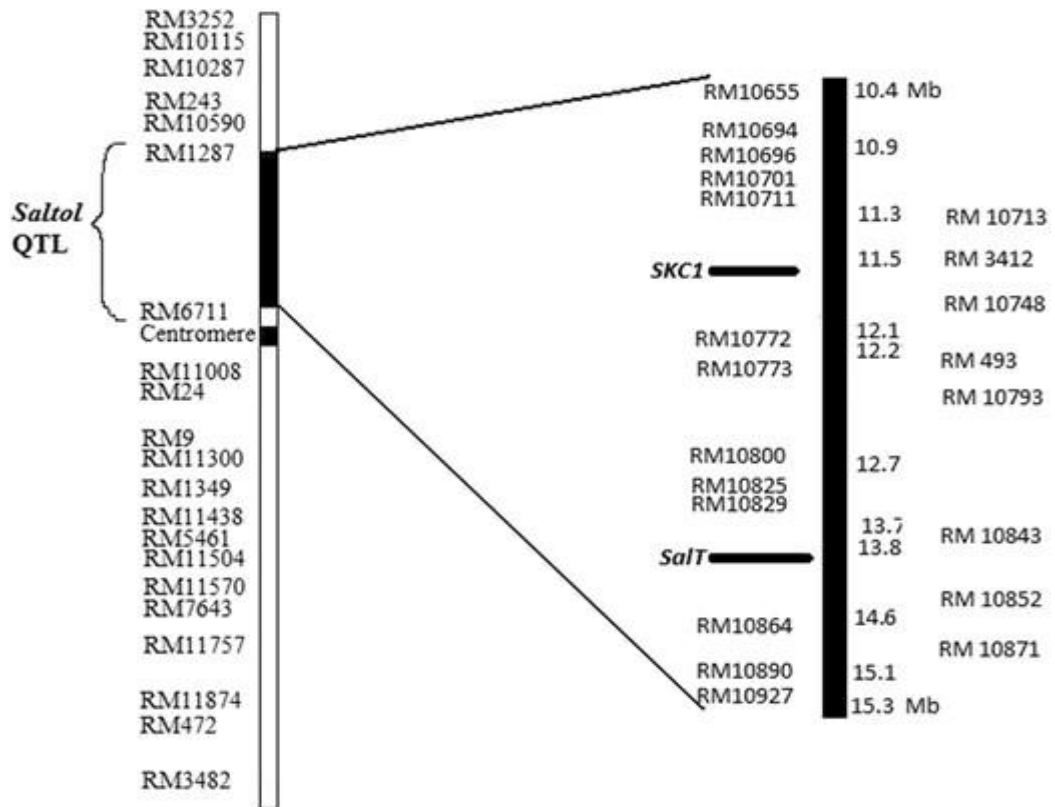


Рисунок 5 – SSR-маркеры, расположенные в области *Saltol* на 1-й хромосоме риса (Bonilla et al., 2002; Thomson et al., 2010).

Ген *Saltol* первоначально идентифицировали у сорта Pokkali (IR29) с помощью анализа транскриптома генома между контрастными генотипами риса, который контролирует гомеостаз K^+/Na^+ в побегах солеустойчивого риса (Pareek, 2009).

В 2005 году команда зарубежных ученых провела серию исследований, направленных на выявление генетической основы устойчивости риса к засолению. В ходе работы был идентифицирован ген *SKC1*, играющий важную роль в поддержании баланса K^+ у сорта риса, устойчивого к засолению, при воздействии солевого стресса. Данное открытие подтверждает ранее установленную связь между поддержанием гомеостаза K^+ и устойчивостью растений к засолению (Ren et al., 2005). Далее, с помощью биотехнологических методов, ген *SKC1* был перенесен в новые сорта риса. Проведенная оценка проростков на устойчивость к засолению подтвердила, что введение гена *SKC1* придает растению желаемую

характеристику. Результаты анализа наследования признаков в поколении дополнительно подтвердили локализацию гена *SKC1* на первой хромосоме. Ген *SKC1* в основном экспрессируется в клетках паренхимы, расположенных вокруг сосудов ксилемы. Использование метода фиксации потенциала показало, что кодируемый им белок *SKC1* функционирует как селективный переносчик ионов натрия (Na^+). Физиологические исследования выявили роль *SKC1* в поддержании гомеостаза ионов калия (K^+) и натрия (Na^+) при воздействии солевого стресса. Данные результаты указывают на потенциальную возможность использования *SKC1* для повышения устойчивости риса к засолению (Ren et al., 2005).

Ученые выделили ряд QTL с меньшим эффектом на концентрацию Na^+ в побегах (*SNC*), *SKC* и соотношение Na^+/K^+ в побегах (*SNKR*). Эти QTL локализованы на коротком плече хромосомы 1 у риса, преимущественно в одной и той же области, что и *Saltol* и *SKC1* (Koyama et al., 2001; Pandit et al., 2010; Zheng et al., 2015; Азарин и др., 2016 б) (рисунок 6).

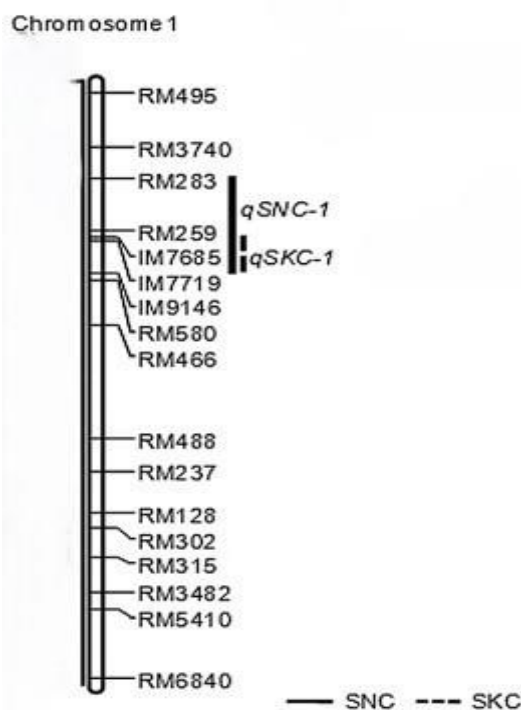


Рисунок 6 – SSR-маркеры, расположенные на 1-й хромосоме риса, ответственные за концентрацию K^+ в побегах (*SKC*) и концентрацию Na^+ в побегах (*SNC*) (Jing et al., 2017).

Несмотря на то, что эти основные и второстепенные гены, связанные с концентрацией Na^+ и K^+ , а также соотношением Na^+/K^+ , предположительно локализованы в соседних или даже идентичных хромосомных областях, установить их принадлежность к одному и тому же локусу пока затруднительно. Это связано с тем, что большинство из них были картированы только методом предварительного QTL-анализа.

Доноры толерантности к хлоридному засолению (Pokkali, Nova Vokra, Moroberikan, Bhura Ratha, R21(IR86385-117-3-1-B), R26(IR86385-248-1-B), R20(IR86385-111-1-1-B), R17(IR86385-87-1-1-B), IR74099-3R-3-3, FL-478 и другие) выведены из ограниченного числа устойчивых линий, в скрещивание которых были привлечены дикие виды. R. Singh с соавторами (2021) провели исследование и выяснили, что среди диких видов для создания толерантных к хлоридному засолению сортов широко используется *O. rufpogon*, поскольку имеет высокую совместимость с *O. sativa*. R. Quan с соавторами (2018) заявляют, что при скрещивании *O. rufpogon* и *O. sativa* получили линии с девятью QTL, контролирующими устойчивость к хлоридному засолению на стадии проростков. M. Prusty с соавторами (2018) выяснили, что есть и другие дикие виды, толерантные к солевому стрессу, такие как *O. coarctata*, *O. latifolia*, *O. alta*.

1.3 ДНК-маркеры в селекции риса

Маркеры представляют собой специфические участки ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности, идентичные фрагментам генов или расположенные в непосредственной близости от них (Канукова и др., 2019). В области генетики и селекции под маркером понимается ген с точно установленным местоположением в геноме, который позволяет идентифицировать и локализовать другие гены (Конарев, 1998; Чесноков,

2013). ДНК–маркеры или молекулярные маркеры, являются генетическими метками в геноме, которые исследуются на уровне нуклеиновых кислот. В качестве такого маркера может выступать любой фрагмент ДНК, находящийся в тесной генетической связи с изучаемым геном (Хлёткина, 2013; Сухарева, Кулуев, 2018).

ДНК–маркеры играют ключевую роль в исследовании генетической структуры всех организмов, в частности растений риса. Их применение особенно важно при оценке исходного и селекционного материала, так как они позволяют эффективно контролировать передачу желательных и нежелательных генетических признаков от родительских форм к вновь создаваемым сортам и гибридным линиям. В современной селекции риса ДНК–маркеры предоставляют ряд возможностей для повышения эффективности и точности отбора ценных генотипов (Dubina et al., 2020).

Маркеры позволяют оценить генетическое разнообразие сортов риса, т.е. идентифицировать и отслеживать необходимые гены в процессе селекции; проводить паспортизацию и классификацию сортов; картировать гены, отвечающих за устойчивость к различным абиотическим и биотическим стресс-факторам; интегрировать новые гены в программы селекции; проводить генетический мониторинг передачи генов в гибридные генотипы (Супрун и др., 2019; Tang et al., 2022). Применение ДНК–маркеров в селекции риса получило название MAS (marker–assisted selection), что переводится как «маркер–вспомогательная селекция» или «селекция с использованием молекулярных маркеров» (Леонова, 2013).

В области генетики и селекционного процесса риса значительный успех достигнут за счет использования разнообразных систем молекулярной маркировки на уровне ДНК. В своих исследованиях R. Aggarwal с соавторами (1999) провели скрининг 77 образцов из 23 видов рода *Oryza* с помощью AFLP–маркеров и выяснили распространение типов риса в пути эволюции в пределах рода и степень родства в генетическом отношении. Сходные исследования японских ученых с применением микросателлитных

локусов у 40 образцов различных видов рода *Oryza* позволили четко различить типы геномов в пределах данного рода (Nishikawa et al., 2003). Значимыми в области генетики риса являлись исследования таких ученых, как Y. Sato с соавторами (2003), посвящённых изучению предковых форм подвида *japonica*; M. Logiex с соавторами (2000) по исследованию образцов *O. glaberrima* с использованием микросателлитных маркеров; S. McCouch с соавторами (2001), по анализу образцов ароматического риса и представителей подвида *japonica* из различных географических регионов. В рамках масштабных исследований, посвященных изучению мировых коллекций риса, такими учеными, как H. Feyt с соавторами (2001), C. Luce с соавторами (2000), C. Sun с соавторами (2002), J. Zhu с соавторами (1998) и других проведена оценка коллекций генетических ресурсов подвидов *O.sativa indica* и *japonica* методами RAPD, AFLP, SSRP.

При изучении и оценке генетического родства между близкородственными видами наиболее точными и достоверными маркерами считаются SSR–маркеры (Powell et al., 1996; Супрун и др., 2019). SSR–маркеры позволяют обнаруживать высокий уровень полиморфизма, благодаря чему являются ценным инструментом для генетической оценки сортов риса и проведения быстрой, точной идентификации генов (Blair et al., 1999).

Технология молекулярного маркирования, используемая для локализации генов устойчивости, обеспечивает эффективный отбор растений риса с необходимыми генами (Dubina et al., 2020). На сегодняшний день, методы молекулярных маркеров считаются наиболее прогрессивными инструментами для точного переноса целевого гена в желаемый сорт риса с заданной комбинацией признаков. Интеграция широко распространенных молекулярных методов в селекционные программы открывает новые возможности для повышения эффективности выращивания риса и сокращения сроков создания новых сортов (Das et al., 2017).

Идентификация генов с ценными агрономическими характеристиками позволит повысить урожайность современных сортов риса. Секвенирование генома выявило потенциальные гены, способные увеличить урожайность (Jena, Kim, 2020). За последние десятилетия применение технологии маркер ассоциированной селекции (MAS) дает преимущество в быстром решении сложившихся проблем и является мощным инструментом для определения генетических вариаций в сортах. Совершенно очевидно, что молекулярные маркеры в отличие от морфологических признаков, идентифицируют большие различия между генотипами на уровне ДНК, что является эффективным и надежным инструментом, не зависящим от окружающей среды (Singh, Sengar, 2015). Для переноса генов в современные сорта риса необходимо брать в скрещивания родительские растения–доноры и использовать соответствующие генные/аллельные маркеры для контроля (Jena, Kim, 2020).

1.4 Андрогенез *in vitro*, как метод создания селекционного материала растений

Для современной селекции создание новых гаплотипов с комплексной толерантностью к биотическим и абиотическим стресс-факторам среды является важным вектором в сохранении и повышении продуктивности и качества семенного материала (Гончарова, 2012). Внедрение в классическую селекцию биотехнологических методов позволяет решать поставленные задачи в более короткий срок (Савенко, Коротенко, 2016). Поэтому, в дополнение к классическим методам создания новых сортов применяют не только молекулярно-генетические, но и биотехнологические, такие как андрогенез и гаплоидия (Черткова и др., 2022). Рисосеющие страны мира в селекционной работе давно пользуются методом андрогенеза *in vitro*,

который является обыденным методом при получении гаплоидных и дигаплоидных растений риса (Гончарова, 2012).

История развития биотехнологических методов связана с попытками культивирования тканей растений известными немецкими исследователями, такими как Г. Хаберландт, Г. Фёхтинг, К. Рехингер (1892–1902 гг.). Ученые проводили эксперименты по культивированию различных видов растительных тканей в растворе сахарозы. В результате исследований удалось получить первичный каллус из сегментов стеблей одуванчика и тополя, а также определить минимальный размер фрагмента, способного к образованию каллуса. Несмотря на отсутствие ожидаемых результатов, выдвинутые исследователями идеи и гипотезы получили подтверждение в последующих работах. Эти исследования заложили начало первого этапа развития биотехнологических методов.

На втором этапе развития (1902–1922 гг.) были разработаны первые питательные среды для культивирования тканей животных, основанные на плазме крови и зародышевой жидкости. Параллельно проводимые попытки культивирования изолированных растительных тканей на искусственных средах не увенчались успехом ввиду использования клеток и тканей высших растений, не обладающих достаточной ростовой активностью для данных экспериментов.

Третий этап (1922–1932 гг.) связан с исследованиями американского ученого В. Робинса и немецкого ученого В. Котте, которые независимо друг от друга продемонстрировали возможность выращивания меристемы корней томатов и кукурузы на твердых питательных средах. Существенное продвижение в развитии метода культуры тканей растений произошло с 1932 года.

Четвертый этап (1932–1940 гг.) развития культуры тканей растений связан с работами французского ученого Р. Готре. Он продемонстрировал возможность длительного культивирования растительных тканей *in vitro*

посредством периодической пересадки их на свежую питательную среду. Это открытие стало катализатором для дальнейшего развития исследований в области культуры тканей и привело к успешному внедрению всё большего количества новых растительных объектов.

На пятом этапе исследований (1940–1960 гг.) было установлено, что открытый в 1955 году новый класс фитогормонов – цитокинины (кинетин), способны стимулировать деление клеток в образцах паренхимы табака. В зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было как усиливать деление клеток в культуре (экспланте), так и поддерживать рост недифференцированной ткани или индуцировать её дифференциацию (морфогенез). В этот период были подтверждены положительные эффекты использования натуральных эксплантов (эндосперм кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений).

На шестом этапе (1960–1975 гг.) развития биотехнологии в растениеводстве произошло несколько значимых открытий. Профессор Ноттингемского университета Э. Коккинг разработал метод ферментативного выделения изолированных протопластов из корней и плодов томата, что позволило культивировать их в контролируемых условиях. Ученые из Японии Н. Niizeki, R. Oono (1968, 1971) впервые добились культивирования пыльцевых зёрен риса *in vitro* и получили регенерантные растения. Авторы также установили, что наилучшие результаты по образованию каллусов наблюдаются на стадии одноядерной пыльцы. Впоследствии, в 1970 году, в той же лаборатории под руководством Дж. Пауэра был осуществлен искусственный синтез протопластов, открывший новые возможности для создания соматических гибридов. Также в этот период был разработан метод микроразмножения растений *in vitro* на основе меристемной культуры, первоначально предложенный французским ученым Ж. Морелем для получения здорового посадочного материала орхидей. В Советском Союзе применение культуры пыльников было

внедрено в 1974 году. Первые сорта риса, полученные с помощью метода регенерации, были выведены Всесоюзным научно-исследовательским институтом риса в 1975 году (Харченко, Кучеренко, 1977; Гончарова, 2012).

С 1975 года наблюдался стремительный прогресс в области *in vitro* технологий, достигнуто понимание биологических процессов в культивируемых объектах, усовершенствуются методы клеточной селекции для получения гаплоидных растений. В этом же году, через культуру пыльников, в Китае получены первые сорта риса (Шевелуха и др., 2003). К 1983 году с использованием данного метода было выведено и районировано 28 новых сортов (Xin-xiu, Wan-keng, Nan-hua 5, Nan-hua 11, Nan-hua 22, Shan-hua 7701, Shan-hua 78-1791, Shan-hua 7706, Yin-hia и др.) (Chen, 1983; Chen, 1986).

Главным преимуществом внедрения биотехнологических методов является получение гомозиготных линий с важнейшими генетическими и фенотипическими особенностями, резистентных к различным жестким условиям окружающей среды, включая засуху, засоление почвы, экстремальные температуры и болезни (Maharani et al., 2020). Андрогагенез *in vitro* – это трудоемкий процесс, требующий стерильных условий. Применение метода андрогагенеза *in vitro* в селекции позволяет сократить селекционный процесс на несколько лет и получить уникальный исходный материал для генетики (Gao et al., 2024). Использование культуры пыльников для получения гомозиготных линий существенно сокращает временные затраты по сравнению с традиционными методами селекции. В то время как последние требуют 5–7 поколений, культура пыльников позволяет достичь результата всего за два поколения. Помимо этого, данный метод повышает эффективность селекционного процесса благодаря тому, что отбор осуществляется в гомозиготных линиях. Это гарантирует соответствие фенотипа полученных линий генотипу регенерантов. Кроме того, культура пыльников облегчает выявление рецессивных генов и мутаций, поскольку они не маскируются доминантными аллелями. Вследствие этого, в

популяции дигаплоидов наблюдается значительный разброс по признакам, которые контролируются рецессивными генами (Nagai, 1959; Гончарова, 2012). Успешное использование метода культуры пыльников в селекции риса зависит от некоторых эндогенных и экзогенных факторов, таких как невосприимчивость генотипа, стадии развития микроспор, холодовой и обеззараживающей предобработки метелки, состава питательных сред для индукции каллуса и регенерации проростков, высокой частоты образования растений-альбиносов (Nurhasanah et al., 2016). Gueye, Ndir (2010) проводившие исследования на разных видах и подвидах риса выяснили, что *O. glaberrima* более отзывчивый вид в отношении образования каллусов и регенерации, чем *O. sativa*. Talebi с соавторами (2007) считают, что типы *japonica* более чувствительны к эмбриогенезу микроспор, чем типы риса *indica*, а так же, что пыльники первичных побегов обычно более отзывчивы, чем с вторичных побегов (Maharani et al., 2020).

В научном сообществе вопрос о том, какое стоит использовать поколение гибридов для введения его в культуру *in vitro*, до сих пор не имеет четкого ответа. По литературным данным следует отметить утверждение о том, что целесообразней использовать гибриды первого или второго поколения, так как следующие поколения проходят несколько этапов рекомбинации. Многие ученые используют гибриды F₁ по следующим причинам: 1) гибриды унаследовали в равном объеме генетическую информацию от обеих родительских форм; 2) получение гомозиготного материала; 3) гибриды F₁ сокращают селекционный процесс. Однако гибриды F₁ иногда недостаточно отзывчивы и неспособны образовывать каллус, поэтому используют гибриды следующих поколений (Илюшко, Ромашова, 2019).

Метод пыльников *in vitro* состоит из двух взаимосвязанных этапов: 1) появление каллуса, 2) регенерация зеленых или альбиносных растений. Показатели регенерационной способности сильно изменяются в зависимости от гибрида и от генотипа, т.е. даже в пределах одной гибридной комбинации

разные растения обеспечивают различную интенсивность каллусообразования и регенерации зеленых растений (от очень низкой до очень высокой) (Илюшко, 2019). В ходе своих исследований Н. Sasaki (1986) установил, что отзывчивость на андрогенез *in vitro* у растений риса варьирует в зависимости от сорта, вида и подвида. Наибольшую отзывчивость среди культурных сортов продемонстрировал клейкий рис. За ним следуют: подвид *japonica*, гибриды *japonica/indica*, гибриды *indica/japonica* и подвид *indica*. При этом внутри каждого подвида также наблюдаются существенные различия в этой характеристике. Например, у диких видов риса (*O.perennis*) частота образования каллуса ниже, чем у культивируемых видов (*O.sativa*) (Woo et al., 1978). Содержание и соотношение эндогенных гормонов у сортов риса оказывают решающее влияние на их способность к регенерации (Sasaki, 1986). Высокий процент образования зеленых почек и проростков в большей степени зависит от компонентов, входящих в состав питательных сред для индукции каллуса и регенерации растений. Состав питательных сред для культивирования пыльников и каллусов риса достаточно хорошо изучен, но для того, чтобы добиться высокого процента выхода зеленых растений ученые продолжают поиск оптимальных сред (Гончарова, Малюченко, 2017; Илюшко, 2019).

По мнению ученых, плохая отзывчивость видов и подвидов риса может быть усилена холодной предобработкой метелки, а также изменением концентрации компонентов в питательной среде, необходимых для культивирования пыльников риса (Nurhasanah et al., 2016). Другие исследователи сообщили, что на индукцию микроспор у многих видов оказывает влияние тепловая и холодная обработка пыльников, которая может вызвать стресс (Datta et al., 2005; Kaushalet al., 2014). Низкотемпературный стресс является лучшим способом предварительной обработки для улучшения андрогенной реакции у зерновых культур. Такой стресс приводит к задержке старения пыльцы, стенок пыльника и может влиять на образование эмбрионов/каллусов (Nurhasanah et al., 2016).

Следовательно, целесообразно проводить скрининг исходных сортов и линий, а также вовлекать в скрещивания наиболее подходящие образцы с хорошей отзывчивостью к андрогенезу *in vitro*. Использование культуры пыльников в селекционной работе позволяет быстро получить гомозиготные растения, резистентные к различным жестким условиям природы, включая засуху, засоление почвы, экстремальные температуры и болезни. Культивирование пыльников на искусственной питательной среде позволяет получить гаплоиды, а из них гомозиготные дигаплоиды риса за 1–2 года.

Гаплоиды – это растения, генотип которых характеризуется одинарным набором хромосом, которые при удвоении сразу дают чистые, полностью гомозиготные формы. Дигаплоиды (удвоенные гаплоиды) – это генетически уникальные растения, имеющие двойной набор хромосом, которые открывают путь для отбора образцов с высоким потенциалом урожайности и устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессам (Илюшко, Ромашова, 2019). Создание двойных гаплоидов, с комплексом хозяйственно ценных признаков, очень трудоемкий процесс, который основан на большой выборке исследуемого материала (Гончарова, 2012). Многие линии, полученные с помощью метода культуры пыльников, уступают по комплексу хозяйственно ценным признакам родительским сортам, а выделяются только единицы (Савенко и др., 2022).

Обширная работа по использованию методов культуры пыльников *in vitro* ведется в ФГБНУ «АНЦ «Донской» (Черткова и др., 2022; Kostylev et al., 2023), в ФГБНУ «ФНЦ риса» (Мальшева, 2012; Бушман, Верещагина, 2013; Савенко и др., 2016) и Приморском НИИСХ (Гученко, 2016; Илюшко, 2019).

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полевые исследования и отбор селекционного материала проводили на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Аграрный научный центр «Донской» (ФГБНУ «АНЦ «Донской») в лаборатории селекции и семеноводства риса ОП «Пролетарское» (Ростовская область, г. Пролетарск). Молекулярно–генетические исследования осуществляли в лаборатории молекулярной генетики Южного Федерального Университета Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского (г. Ростов–на–Дону). Биотехнологические и лабораторные опыты проводили в лаборатории клеточной селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» (Ростовская область, г. Зерноград).

2.1 Объекты исследований

В качестве исходного материала в исследовании использовались коллекционные образцы риса, любезно предоставленные ФГБНУ «АНЦ «Донской» (г. Зерноград), ФГБНУ «ФНЦ риса» (г. Краснодар) и Институтом сельскохозяйственной генетики, Ханой, Вьетнам (Agricultural Genetics Institute, Hanoi, Vietnam). В качестве источников потенциально важных гаплотипов в работе были исследованы зарубежные сорта, устойчивые к глубоководному затоплению и хлоридному засолению (таблица 1).

Таблица 1 – Донорные линии из коллекции Института сельскохозяйственной генетики, Вьетнам (AGI)

№	Линия	Гены устойчивости	Страна происхождения
1	IR-64	<i>Sub1A</i>	Филиппины
2	BR-11	<i>Sub1A</i>	Бангладеш
3	Swarna	<i>Sub1A</i>	Китай
4	TDK-1	<i>Sub1A</i>	Лаос
5	Khan Dan	<i>Sub1A</i>	Индонезия

Продолжение таблицы 1

6	Inbara-3	<i>Sub1A</i>	Индонезия
7	CR-1009	<i>Sub1A</i>	Индия
8	Kharsu 80A	<i>SNORKEL, AG1, AG2</i>	Пакистан
9	Khao Hlan On	<i>SNORKEL, AG1, AG2</i>	Мьянма
10	Mazhan Red	<i>SNORKEL, AG1, AG2</i>	Китай
11	IR527132B-8-2B-1-2	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
12	IR74099-3R-3-3	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
13	R17(IR86385-87-1-1-B)	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
14	R20(IR86385-111-1-1-B)	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
15	R21(IR86385-117-3-1-B)	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
16	R26(IR86385-248-1-B)	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
17	FL-478	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам
18	Pokkali	<i>Saltol, SNC, SKC1</i>	Вьетнам

В качестве исходных форм при интрогрессии локусов глубоководного затопления и солеустойчивости, использовали высокоурожайные, скороспелые, районированные сорта отечественной селекции, отобранные по комплексу хозяйственно ценных признаков: Новатор, Контакт, Магнат, Кубояр, Боярин, Бахус, Южанин, Степняк, Командор, Кубань–3.

Растительный материал (метелки риса) для введения в культуру пыльников *in vitro* отбирали у гибридов риса второго поколения (F_2) в полевых условиях (рисунок 7).



Рисунок 7 – Отбор метелок риса в рисовых чеках для введения в культуру пыльников *in vitro*

Гибриды получены путем скрещивания высокопродуктивных отечественных сортов с зарубежными сортами, несущими гены устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Молекулярно–генетические методы

Выделение геномной ДНК из растительной ткани. Геномную ДНК выделяли из высечек молодых листьев, срезанных в полевых условиях (не пораженные болезнями), а также из 8–10 дневных проростков. Образцы проращивали в чашках Петри по Межгосударственному стандарту ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести». Для этого семена селекционных образцов и сортов в количестве 5 шт. помещали на фильтровальную бумагу и заливали дистиллированной водой. В одной чашке Петри проращивали 4 образца. На 10 дней помещали в термостат при температуре от +20 до +30°C. Молодые побеги срезали и измельчали в пробирках типа Eppendorf (рисунок 8).

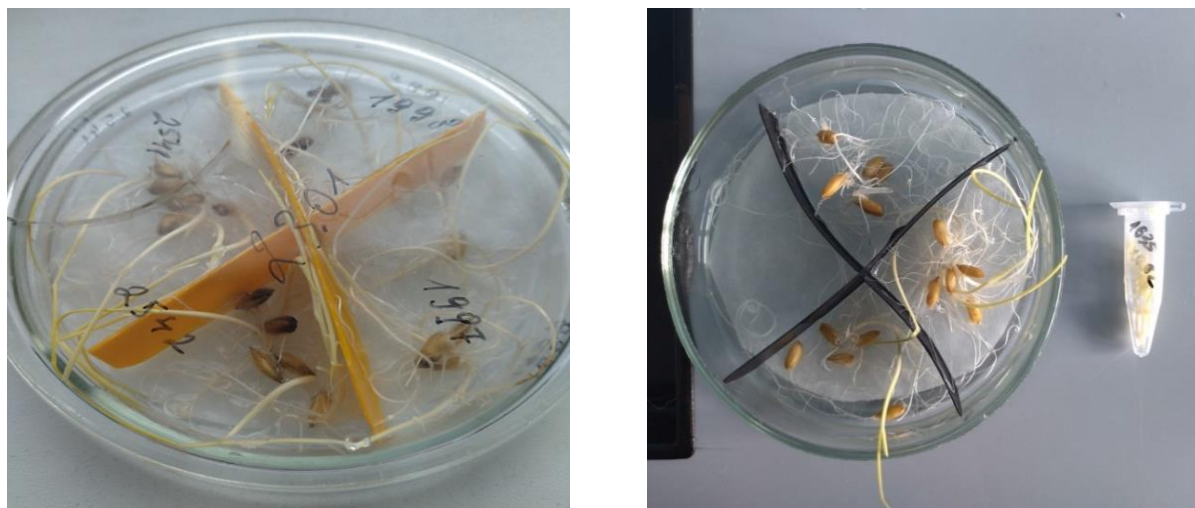


Рисунок 8 – Молодые побеги растений риса

Геномную ДНК выделяли с помощью детергента СТАВ (*cetyl trimethyl ammonium bromid*), который хорошо растворяет и лизирует клеточную мембрану, а также эффективно разрушает ДНК–белковые комплексы и полисахариды. СТАВ позволяет получать чистую для полимеразной цепной реакции растительную ДНК. Метод является модификацией метода М. Murray и W. Thompson (1980) и может быть использован для аналитического выделения при скрининге большого количества проб и для препаративного выделения геномной ДНК из растительного материала. Процесс выделения ДНК состоял из следующих фаз: лизирование клеток, распад РНК, депротеинизация, экстракция ДНК под действием хлороформа и выпадения нуклеиновых кислот в виде осадка, благодаря действию изопропанола. Измельченные высечки молодых листьев риса помещали в пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл и добавляли 500 мкл лизирующего буфера (СТАВ – 2 %, трис-НСl (рН 8,0) – 100 мМ, ЭДТА – 20 мМ, NaCl – 1,4 М) добавлением 80 мкл β–меркаптоэтанола (рисунок 9).

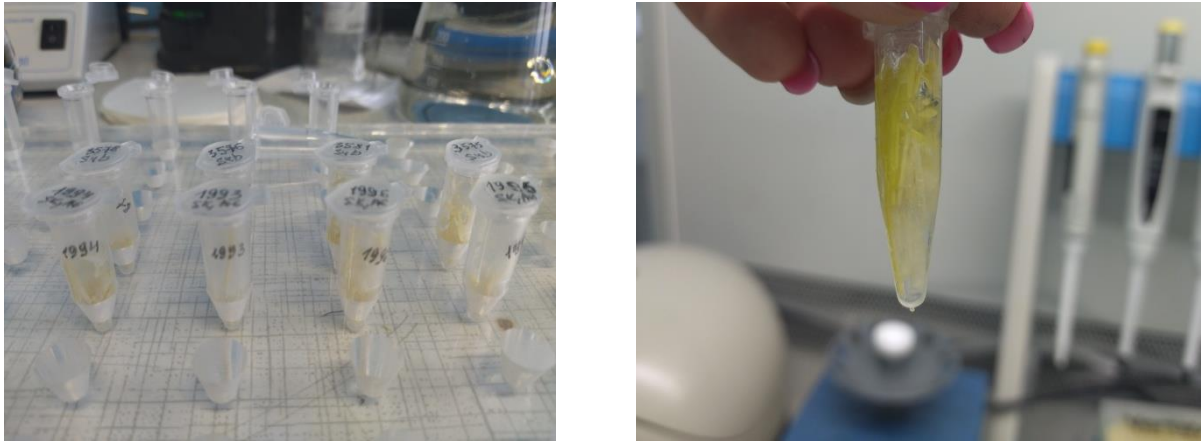


Рисунок 9 – Лизирование растительного материала

Затем содержимое пробирок перемешивали на вортексе FV–2400 (Bio San, Латвия) и отправляли инкубироваться в термошейкер при температуре 55–65°C в течение 45–60 мин. После этого пробирки центрифугировали 15 сек. При 14800 об/мин для осаждения растительных остатков в центрифуге Centrifuge 5417R (Eppendorf AG, Германия). Пипеткой отбирали 400 мкл окрашенного буфера в пробирки объемом 1,5 мл и добавляли 400 мкл хлороформа, тщательно перемешивали на вортексе (важно максимально отделить ДНК от белков) и центрифугировали при 14800 об/мин 15 мин (разделение органической и водной фаз). Верхнюю водную фракцию примерно 400 мкл переносили в чистую 1,5 мл пробирку, содержащую равный объем (400 мкл) холодного изопропанола (+4°C) и тщательно перемешивали на вортексе (спирт осаждает ДНК из раствора при тщательном перемешивании). Затем пробирки в штативе помещали в морозильную камеру (Sanyo ultra low, Япония) на 20 мин при температуре –80°C или на ночь. После холодной обработки пробирки центрифугировали 15 мин при 14800 об/мин и осторожно сливали надосадочную жидкость. Добавляли в пробирку с осадком ДНК 500 мкл 70% этанола и тщательно перемешивали, чтобы осадок плавал в спирте. Затем повторяли центрифугирование в течение 15 мин при 14800 об/мин и надосадочную жидкость аккуратно сливали. Осадок ДНК не сушили, а сразу растворили в 80 мкл TE буфера (10

мМ Трис–HCl, рН 8.0 1мМ ЭДТА) и перемешивали на вортексе. ДНК хранили при температуре –20°C (длительное хранение) или при +4°C (при частом использовании).

Оценка количества и качества выделенной ДНК. Качество выделенной геномной ДНК оценивали на спектрофотометре (Implen Nanophotometr NP80, Германия). Прибор на экран выводит рассчитанные показатели количества и качества оцениваемой ДНК образца. Качество выделенной ДНК определяется по соотношению A280/A230. Коэффициент должен находиться в пределах 1,7–2,2. В случае значений ниже или выше диапазона – ДНК из образца выделялась повторно.

Условия проведения ПЦР–анализа. При проведении полимеразной цепной реакции использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 5 мкл Sybr Green или MasterMix (5x; Евроген, Россия), 1мкл прямого праймера, 1мкл обратного праймера (общая концентрация праймеров в конечной реакционной смеси 0,4 мкМ), 15 мкл деонизированной воды и 3 мкл ДНК (с концентрацией 100 нг). Пробы помещали в пробирки объемом 0,2 мл в асептических условиях стерильного потока ламинарного бокса (Aurabi et al., 2014.).

Амплификация осуществлялась в 96-луночных планшетах в термоциклере Rotorgene 6000 (Corbett Research, Австралия) и C1000 Touch (Thermal Cycler, США). Оптимальные реакции ПЦР для праймеров имели 35 циклов при соблюдении температурно–временного режима, представленного в таблице 2.

Таблица 2 – Условия ПЦР для оптимальной амплификации с использованием локус–специфических маркеров

Параметр	Температура, °С	Продолжительность
Начальный нагрев	94	3 мин.
Начальная денатурация	94	2 мин.
Отжиг праймеров	55–65	25 сек.
Элонгация	72	30 сек.
Денатурация	94	10 сек.
Финальная элонгация	70	3 мин.

Амплификационные продукты подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле (горизонтальный электрофорез). Агарозный гель включал в себя следующие компоненты: трис–боратный буфер (1x) 150 мл, 5 мл бромистого этидия (1 мкг/мл) (применяемый для визуализации ПЦР продукта), 2,25 г агарозы. Проамплифицированные образцы наносили в лунки застывшего агарозного геля индивидуальными наконечниками и проводили электрофорез (рисунок 10).

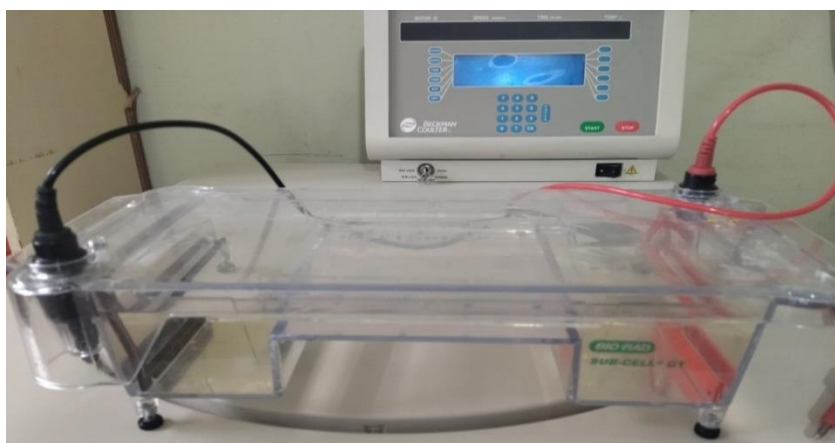


Рисунок 10 – Процесс электрофореза образцов ДНК

Длительность электрофореза варьировала от 30 минут до 2 часов, в зависимости от предполагаемого размера амплификатов.

Гель фотодокументировали в трансиллюминаторе под УФ–светом с помощью видеосистемы GelDoc 2000 (BioRad, США). Электрофореграммы анализировали при помощи программы Bio-Rad ImageLab 6.0. Оценку размеров полученных ампликонов осуществляли путём сопоставления их расположения в геле с расположением маркеров молекулярного веса, размеры которых известны. В качестве молекулярного маркера для определения размера ПЦР фрагментов использовали маркер длин ДНК 50+bp DNALadder (Евроген, Россия).

Молекулярные маркеры, используемые в исследовании. Для проведения молекулярно-генетического анализа были отобраны 40 праймерных пар маркеров с последовательностями олигонуклеотидов, комплементарные участкам генов *Sub1*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2* устойчивости к

глубоководному затоплению и *Saltol*, *SKC1*, *SNC* устойчивости к хлоридному засолению. Отбор сиквенсов маркеров проводили по литературным данным и базы данных www.ncbi.nih.gov (Xu et al., 2006; Hattori et al., 2009; Niroula et al., 2012; Oe et al., 2021). Праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (г. Москва). Последовательности маркеров представлены в таблице 3-4.

Таблица 3 – Маркеры генов устойчивости к глубоководному затоплению

Sub1, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2*

Ген	Маркер	Последовательность (5'-3')	Размер ампликона, пн
<i>Sub1A</i>	3F	GATGTGTGGAGGAGAAGTGA	1015
	3R	GGTAGATGCCGAGAAGTGTA	
	2F	ATATTCACCTGCTCACTAGTAAC	1040
	2R	GTTTGTGGCCTTTGAGTAAG	
	1F	AGGTGAAAATGATGCAGG	596
	1R	TGTTTTGGTGGATCGATGGG	
	Sub1A203 F*	CGGCCTCATCACAATCGGAG	203
Sub1A203 R*	ATGTCCATGTCCATATGTTCGTCG		
<i>Sub1A</i>	RM 7481 F*	CGACCCAATATCTTTCTGCC	95
	RM 7481 R*	ATTGGTTCGTGCTCAACAAG	
	RM519 F	AGAGAGCCCCTAAATTTCCG	122
	RM519 R	AGGTACGCTCACCTGTGGAC	
<i>Sub1A-1</i>	F	AGGCGGAGCTACGAGTAC	231
	R	GCAGAGCGGCTGCGA	
<i>Sub1C</i>	Sub1C173F	AACGCCAAGACCAACTTCC	173
	Sub1C173R	AGGAGGCTGTCCATCAGGT	
<i>Sub1B</i>	F	GGACGCCACAACGAAGATGAAG	133
	R	AGAAGGGAACATGGAAACGCC	
<i>SK1</i>	1F*	ATGTGCGGAGGTTGTCTCAT	743
	1R*	TCGTAGCGACAGCCGTA CTG	
	1F	CCAGCTTGTCTCGTCTCGAT	280
	1R	TTAGGCGCTTGTCTCGTGT	
	2F	GCTACCGGTTTTAGCATTTCATAC	332
	2R	TCGTCCTTGTCTGTTCTCCTG	
	2F*	ACGGTATCCCTGAACTACTG	210
	2R*	TCGTAGCGACAGCCGTA CTG	
	3F	ACGGTATCCCTGAACTACTG	294
3R	GATACTCCATTGGGACGGGC		
<i>SK2</i>	1F	AACACCACACTCCCGGCCAAAG	1485
	1R	TAAAAGGACCAGAGGCAGC	
	1F	GGCCGAAATTAGGGACAACA	227
	1R	CCGGCTTCTTGCTCTTACTG	
	2F*	CCCCTTGCTTGCTCTTGC	305
	2R*	GAGTGTGGTGTTCGTCAG	

Продолжение таблицы 3

<i>SK2</i>	2F	CACTGGAGGCAACGAATG	190
	2R	TAAAAGGACCAGAGGCAGC	
	3F	CACTGGAGGCAACGAATG	263
	3R	CTACTGATCATGGTTGGCGC	
<i>AG1</i> (qAG9-2)	RM 24161 F*	GTATGGCGAGACCCTACAGACC	235
	RM 24161 R*	GACCCACTTAATGTGTCACAAGG	
	RM44 F	ACGGGCAATCCGAACAACC	99
	RM44 R	TCGGGAAAACCTACCCTACC	
	RM144 F	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	237
	RM144 R	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTG	
<i>AG2</i> (qAG7-1)	RM 478 F*	GGGTGGAGTGTAATAATAGCAAG C	400
	RM 478 R*	AACACGTCCAAAGTCACAGAGC	
	RM541 F	TATAACCGACCTCAGTGCCC	158
	RM541 R	CCTTACTCCCATGCCATGAG	
	RM171 F	AACGCGAGGACACGTACTIONTAC	290
	RM171 R	ACGAGATACGTACGCCTTTG	

Примечание: * – информативные маркеры

Таблица 4 – Маркеры генов устойчивости к хлоридному засолению

Saltol, *SKC1* и *SNC*

<i>Saltol</i>	RM493 F*	TAGCTCCAACAGGATCGACC	211
	RM493 R*	GTACGTAAACGCGGAAGGTG	
	RM237 F	CAAATCCCGACTGCTGTCC	130
	RM237 R	TGGGAAGAGAGCACTACAGC	
	RM253 F	TCCTTCAAGAGTGCAAAACC	155
	RM253 R	GCATTGTCATGTCTGAAGCC	
	RM336 F	CTTACAGAGAAACGGCATCG	195
	RM336 R	GCTGGTTTGTTCAGGTTCG	
	RM585 F	CAGTCTTGCTCCGTTTGTTG	215
	RM585 R	CTGTGACTGACTTGGTCATAGG	
	RM3412 F	TGATGGATCTCTGAGGTGTAAAGAG C	115
	RM3412 R	TGCACTAATCTTTCTGCCACAGC	
	RM5711 F	GTCCATGCATCCATCTCTAG	150
	RM5711 R	ACGGAAGGAATACGTCTGTA	
	RM7075 F	TATGGACTGGAGCAAACCTC	165
	RM7075 R	GGCACAGCACCAATGTCTC	
	RM10793 F	GACTTGCCAACTCCTTCAATTCG	150
	RM10793 R	TCGTCGAGTAGCTTCCCTCTCTACC	
<i>SKC1</i>	DQ148410F*	ACGACGACGAGGCTACTGAT	170
	DQ148410R*	GTCGAGACGACGGTGAAGAT	
	RM327 F	CTACTCCTCTGTCCCTCCTCTC	213
	RM327 R	CCAGCTAGACACAATCGAGC	
	RM514 F	AGATTGATCTCCATTCCCC	259
RM514 R	CACGAGCATATTACTIONTGG		

<i>SNC</i>	qSNC3F*	CCTTGCTGTTATTGCTC	200
	qSNC3R*	GAGGAGGGGCGAAGATTGA	
	RM307 F	GTACTACCGACCTACCGTTTAC	174
	RM307 R	CTGCTATGCATGAACTGCTC	
	RM122 F	GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC	227
	RM122 R	CTGCTATGCATGAACTGCTC	

Примечание: * – информативные маркеры

2.2.2 Определение устойчивости селекционных образцов риса к глубоководному затоплению в лабораторных опытах и оранжерейных экспериментах

Морфологический и физиологический скрининг устойчивости к глубоководному затоплению селекционных образцов риса, проводили в лабораторных опытах и оранжерейных условиях, с помощью метода проращивания зерен риса в пробирках под слоем дистиллированной воды (15 см) 14 дней (Manangkil et al., 2008; Костылев и др., 2022; Kostylev et al., 2023). Семена в количестве 5 шт. помещали в стеклянную пробирку (2,5 см в диаметре и 15 см в высоту) с дистиллированной водой и инкубировали в культуральной комнате при температуре 26–28°C (рисунок 11).

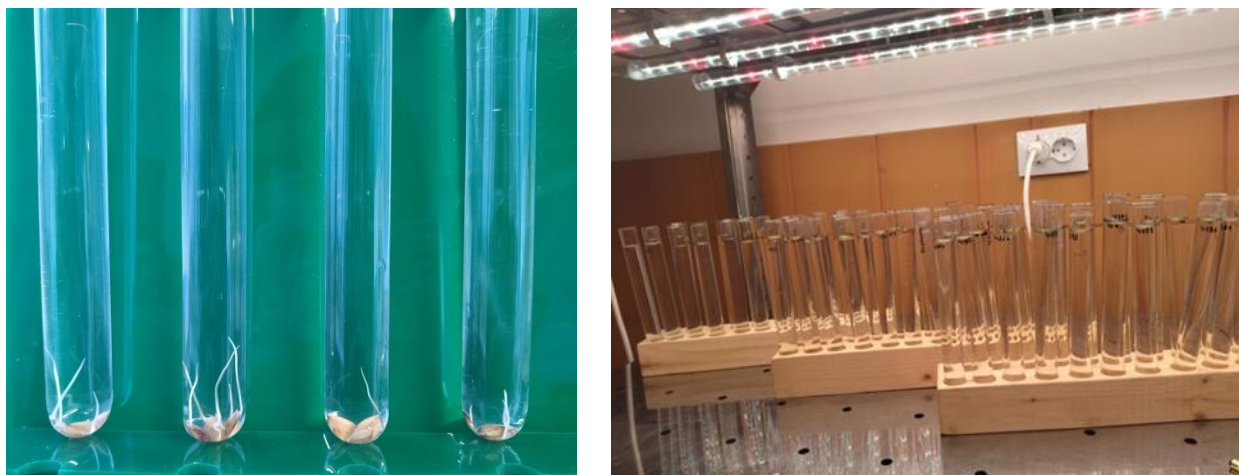


Рисунок 11 – Проращивание зерен риса в пробирках

Динамику роста проростков определяли измерением их длины на 5–е, 7–е, 9–е, 12–е и 14–е сутки (рисунок 12).



Рисунок 12 – Измерение длины проростков риса

Для оценки устойчивости прорастания риса при воздействии стрессовых факторов был проведен эксперимент по проращиванию растений риса в аквариуме с высотой стенок 50 сантиметров. Набухшие семена (предварительно вымоченные в воде в течение 12 часов) высевали во влажную почву и проводили затопление дистиллированной водой (рисунок 13).



Рисунок 13 – Оценка устойчивости растений риса к глубоководному затоплению

Примечание: 1 – отечественный сорт Контакт; 2 – зарубежный сорт Khao Hlan On; 3-8 – гибридные линии Контакт x Khao Hlan On

Контрольная группа растений культивировалась в стандартных физиологических условиях (рисунок 14).



Рисунок 14 – Контрольная группа растений риса в условиях теплицы

Через 7 и 21 суток была измерена длина проростков и рассчитана выживаемость в процентах.

2.2.3 Определение солеустойчивости селекционных образцов риса в лабораторных опытах

В лабораторных условиях оценку устойчивости к хлоридному засолению селекционного материала риса проводили способом проращивания зерен в растворе воды с добавлением соли (NaCl). Воздушно-сухие семена замачивали в дистиллированной воде в течение 12 ч, после помещали в контейнеры с растворами хлорида натрия в концентрации 1,0% и 1,5% (рисунок 15).

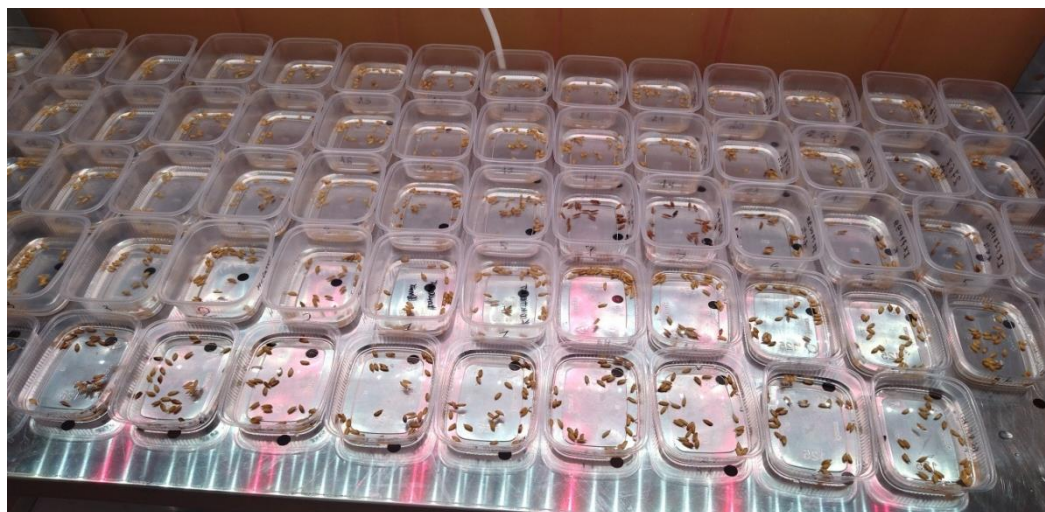


Рисунок 15 – Опыт по определению солеустойчивости линий риса

Контрольные образцы проращивали в стандартных физиологических условиях с использованием дистиллированной воды. Все образцы проращивали в трехкратной повторности в условиях культуральной комнаты при фотопериоде 15 ч/9 ч, освещенности 3000 Лк и температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ (рисунок 16).

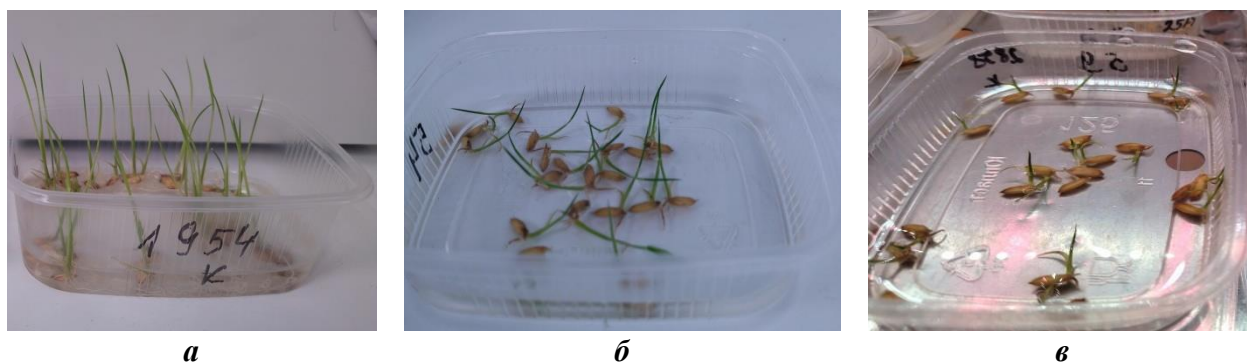


Рисунок 16 – Опыт по определению солеустойчивых генотипов риса (14 дней в условиях хлоридного стресса)

Примечание: *a* – контроль; *б* – опыт с концентрацией 1,0% NaCl; *в* – опыт с концентрацией 1,5% NaCl

Через 14 дней проводили измерение длины корней и ростков, а также рассчитывали показатель скорости роста и всхожесть зерен.

2.2.4 Андрогенез *in vitro*

Метод культуры пыльников *in vitro* основывается на выращивании растений из пыльцы. Отбор растительного материала (метелок риса с главных побегов растений) проводили на полях лаборатории селекции и семеноводства Обособленного подразделения «Пролетарское» АНЦ «Донской» (Пролетарск, Ростовская область) в утренние часы и ясную погоду, так как после дождя метелки могут быть инфицированы. По методическим данным рекомендуется отбирать метелки, находящиеся в стадии одноядерной пыльцы, которые заключены в листовую оболочку флагового листа, когда расстояние между флаговым и вторым листом составляет от 5 до 10 см. Визуально это соответствует расположению метелки на уровне 5–10 см от выхода из трубки флагового листа (рисунок 17).



Рисунок 17 – Метелки риса в фазе одноядерной пыльцы

Отобранные метелки перед извлечением колосков подвергали поверхностной стерилизации, т.е. обработке 96% спиртом в течение 3 минут

для удаления патогенов. Затем проводили холодовую предобработку метелок воздействием низких положительных температур 3–5°C в течение 7–10 дней.

На 7 день метелки вынимали из влагалища флагового листа, разрезали на фрагменты и стерилизовали в 5% растворе гипохлорита натрия или хлорки (1:1) в течении 10–15 минут и трижды промывали стерильной дистиллированной водой (рисунок 18).



Рисунок 18– Стерилизация растительного материала

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей (выделение пыльников, пересадка каллусов и растений–регенерантов) является соблюдение строгой стерильности, поэтому все манипуляции проводили в ламинарном боксе под стерильным потоком воздуха и предварительно простерилизованными в сухожаровом шкафу инструментами (при температуре 140°C в течение 4 часов) (Binder 420, Германия). Правила стерильности для культивирования изолированных органов и тканей применяли по методике Бутенко Р.Г. (1964).

Инокулирование пыльников риса проводили на оптимизированную авторами агаризованную индукционную питательную среду Блейдса (рисунок 19).

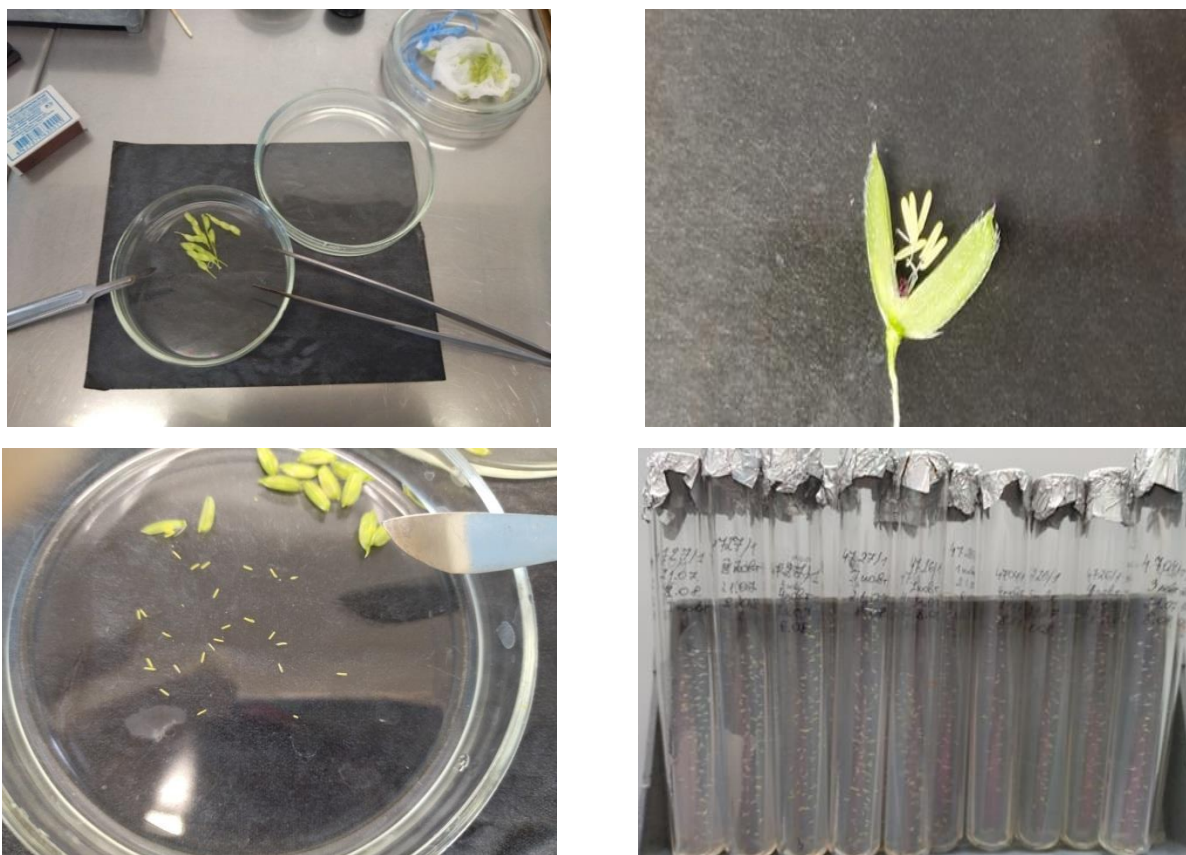


Рисунок 19 – Инокулирование пыльников риса в стерильных условиях на питательную среду Блейдса

Питательную среду предварительно автоклавировали в пробирках (Tuttnauer, Израиль) при температуре 121°C в течение 15 минут и давлении 0,9–1,0 атмосфер (таблица 5).

Таблица 5 – Состав оптимизированной питательной среды для индукции каллуса по Блейдсу (Blaydes, 1966)

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
Макросоли	
NH_4NO_3	1000
KNO_3	1000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	347
KH_2PO_4	300
KCl	65
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	35
Микросоли	
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,5
H_3BO_3	1,6
KI	0,8
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	4,4
Источник железа	
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,8
Витамины	
Никотиновая кислота (PP)	0,5
B_1 (тиамин)	0,5
B_6 (пиридоксин)	0,5
Другие компоненты	
Глицин	2
Агар, г/л	8
Сахароза, г/л	30
Мезоинозит	100
Регуляторы роста	
2,4-D	2

В пробирку инокулировали до 30 пыльников, затем закрывали ее колпачком из фольги и помещали в термостат (Binder, Германия) с температурой $27\pm 2^\circ\text{C}$ и влажностью 50% в темноте. В таких условиях пыльники буреют, лопаются в продольном направлении и внутри него образуются эмбриоподобные структуры (калусы) (рисунок 20).



Рисунок 20 – Калусные структуры на пыльниках риса

Андрогенез *in vitro* состоит из двух последовательных этапов: 1) получение каллусов (новообразований) в темноте из микроспор, пассированных на индукционной среде, в состав которой входят регуляторы роста; 2) появление (при освещении) из каллусов целых растений, проростков, корней на среде для регенерации. Каллусом называют тотипотентные клетки, из которых могут образовываться целые растения.

Каждую неделю делали осмотр пробирок под микроскопом для фиксации появившихся каллусов и их количества, а также проводили браковку зараженных инфекцией пробирок. Каллусы размеров 1-3 мм переносили на оптимизированную авторами регенерационную среду Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением сахарозы – 20 г/л, агара – 8 г/л, НУК – 1 г/л и кинетина – 5 мг/л (Бушман и Верещагина, 2013) (таблица 6).

Таблица 6 – Состав оптимизированной питательной среды Мурасиге и Скуга для культивирования проростков риса (Muraschige T., Skoog F., 1964)

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
Макросоли	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	440
KH_2PO_4	170
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	370
Микросоли	
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	1,6
KI	0,83
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	6,92
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025
Источник железа	
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,2
Витамины	
Никотиновая кислота (PP)	0,5
B_1 (тиамин)	0,5
B_6 (пиридоксин)	0,5
Другие компоненты	
Мезоинозит	100
Агар, г/л	8
Сахароза, г/л	30
Глицин	2

Регуляторы роста	
Нафтилуксусная кислота	1
Кинетин	5

Пробирки с каллусами инкубировали в культуральной комнате роста при фотопериоде 16ч/8 ч, с контролем температуры $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ и освещенностью 3000 Лк (рисунок 21).



Рисунок 21 – Каллусные структуры на среде дифференцирования и регенерации растений

Для оценки эффективности культуры пыльников проводили учет по показателям: число новообразований (эмбриоподобных структур и каллусов) на 100 пыльников; число всех регенерантов на 100 пыльников; число всех регенерантов на 100 новообразований.

Из морфогенных каллусов образовались зеленые и альбиносные растения–регенеранты. Зеленые растения–регенеранты с хорошо развитой корневой системой и 2–3 листьями пересаживали в сосуды с стерилизованным грунтом и 25 дней выращивали в условиях световой комнаты, а альбиносные выбраковывали (рисунок 22).



Рисунок 22 – Регенеранты риса в условиях световой комнаты

Стерилизация грунта проходила при температуре 140°C в течение 4 часов в сушильном шкафу (Binder, Германия). Полив растений–регенерантов осуществляли дистиллированной или дождевой водой. Затем окрепшие растения переносили в теплицу, где они развивались до цветения и созревания зерен (Черткова и др., 2022).

2.2.5 Полевые эксперименты и характеристика гибридов риса по комплексу хозяйственно ценных признаков

Посев селекционных образцов риса. Посев риса осуществляли в коллекционном, гибридном и селекционном питомниках вручную под маркер с междурядьями 30 см. Площадь делянки составляла 0,6 м², норма высева 120–150 зерен, глубина заделки 0,5–1 см и через 20 номеров размещали стандарт (Костылев П.И., 2011). Всходы получали по обычной технологии. Фенологические наблюдения и оценку морфо–биологических признаков и свойств растений проводили по методическим указаниям ВИР и классификатору рода *Oryza* L. (1982) (Костылев П.И., 2011).

Гибридизация селекционных образцов риса. Гибридизация растений риса проводилась в условиях пленочной теплицы с контролем температуры воздуха (не выше 25–30°C) и относительной влажностью 80–90%. Кастрировали цветки риса в утренние часы (Ерыгин П.С., 1968). С метелки удаляли верхние и нижние веточки, оставляя центральные, на которых удаляли верхние и нижние колоски. С помощью ножниц с каждого колоска срезались верхушки цветковых чешуй (на 1/3 или 1/4 длины) диагональным разрезом и удаляли пыльники вакуумным носом «Vakuumpumpe DS-8» оборудованного стеклянными пипетками с резиновыми трубками (рисунок 23).



Рисунок 23 – Кастриция рисовых метелок в теплице

Все кастрированные метелки изолировали пергаментным изолятором для предотвращения высыхания цветковых чешуй и пестика, а также опыления пылью с других растений (рисунок 24).



Рисунок 24 – Изоляция метелок риса

Опыление проводилось «Твелл-методом», т.е. встряхиванием пыльцы с отцовских растений в верхнюю часть изолятора в период с 13 до 14 часов (время массового пыления) (Лось Г.Д., 1987).

Уборка и оценка селекционных образцов по комплексу хозяйственно ценных признаков. Уборку растений проводили ручным способом в фазу полного созревания зерна (рисунок 25).



Рисунок 25 – Уборка растений риса

Морфометрическую оценку растений проводили по методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1963).

После обмолота метелок и просушивания зерен образцы направляли в лабораторию клеточной селекции, для дальнейших исследований по устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному затоплению.

2.2.6 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office, анализ корреляционных и регрессионных методов, построение гистограмм в программном пакете STATISTICA 6. Рассчитывали показатели стандартного отклонения выборки, по формуле:

$s = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)}$, где: s – стандартное отклонение выборки; x_i – величина отдельного значения выборки; \bar{x} – среднее арифметическое выборки; n – размер выборки.

Коэффициент вариации, который показывает, сколько единиц среднего квадратического отклонения приходится на единицу среднего значения признака, рассчитывали по формуле: $C_v = s / m \times 100\%$, где: s – среднее квадратическое отклонение; m – среднее значение изучаемого признака. Принято считать, что если коэффициент вариации менее 33%, то совокупность данных является однородной, если более 33% – то неоднородной. Расчет стандартной ошибки средней ($\pm SEM$) для определения содержания ядерной ДНК в популяции регенерантов риса проводили, по формуле: $SEM = S / \sqrt{n}$, где: S – стандартное отклонение данных; n – количество наблюдений. Достоверные отличия по сравнению с контролем при уровне значимости $p < 0,05$ рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента. Частоту рекомбинации (R_f), которая позволяет теоритически оценить сцепленность маркера с геном устойчивости, рассчитывали по формуле: $R_f = (N \text{ рекомбинантов} / \text{Общ. Число растений}) * 100\%$.

Чем меньше частота рекомбинации, тем ближе расположены локусы. Эффективно применять маркеры, расположенные в пределах 5 сМ от целевого гена.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Отбор исходного материала риса для скрещивания и ДНК–маркеров устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению

При внедрении в классическую селекцию молекулярно–генетических методов первостепенное значение имеет оценка информативности отобранных ДНК–маркеров, ассоциированных с устойчивостью к абиотическим факторам среды и отбор исходного материала из коллекционных образцов с различной степенью полиморфизма (Хавкин, 2003; Jena et al., 2003; Kumar, Bhagwat, 2012; Чесноков, 2018). Для проведения молекулярно–генетического анализа были отобраны 40 праймерных пар маркеров с последовательностями олигонуклеотидов, комплементарные участкам генов *Sub1*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2* устойчивости к глубоководному затоплению и *Saltol*, *SKC1*, *SNC* устойчивости к хлоридному засолению. Отбор сиквенсов маркеров проводили по литературным данным и и базы данных Национального центра биотехнологической информации (www.ncbi.nih.gov) (Xu et al., 2006; Hattori et al., 2009; Niroula et al., 2012; Oe et al., 2021).

Отбор исходного материала риса проводили по результатам массового скрининга коллекционных образцов в количестве 989 шт. по комплексу хозяйственно ценных признаков: вегетационный период, высота растения, длина метелки, число зерен с 1 метелки, масса 1000 зерен. Коллекция представлена чистыми линиями, происходящими из Европы, Азии, Африки, Америки и Австралии и различающимися по морфофизиологическим признакам.

Поскольку рис относится к культурам, которые чувствительны к продолжительности дня, в нашем регионе согласно методическим указаниям и классификатору рода *Oryza sativa* L. (1982) приоритетнее выращивать сорта с вегетационным периодом 110–120 дней (Дубина и др., 2015; Зеленский,

1993, 2016; Черткова и др., 2023). Коллекционные образцы условно разделили на 4 группы спелости, что позволило дать характеристику продолжительности их периода вегетации применительно к агроклиматическим условиям Ростовской области. Это позволяет более целенаправленно вести подбор исходного материала с различной длиной вегетационного периода при вовлечении его в селекционный процесс. Изучаемая коллекция состояла из сортов риса, различающихся по периоду вегетации: от раннеспелых – до позднеспелых (95–159 дней до созревания). В результате исследования основная часть коллекции представлена образцами с вегетационным периодом от 110 до 120 дней, что составило 60,6%. (рисунок 26).

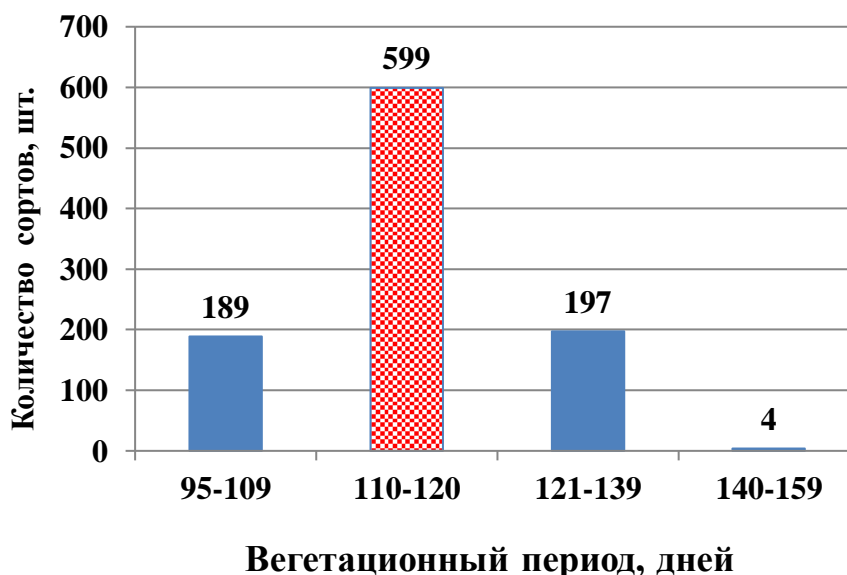


Рисунок 26 – Вегетационный период коллекционных образцов риса

Для дальнейшего исследования группы с периодом вегетации менее 110 и более 120 дней были исключены.

Высота растений риса является важным морфологическим признаком, определяющим его устойчивость к полеганию и, следовательно, влияющим на объём урожая зерна. В течение последних трёх десятилетий выведенные сорта риса характеризуются короткими и крепкими стеблями, что способствует увеличению урожайности, повышению сопротивляемости к

воздействию абиотических и биотических факторов и улучшению качества зерна (Скаженник и др., 2019). Модельный сорт риса, выращиваемый в условиях Ростовской области, должен иметь высоту растения от 90 до 110 см. Биометрический анализ показал, что коллекция риса была разнообразна по высоте растений – от 40 до 149 см (рисунок 27).

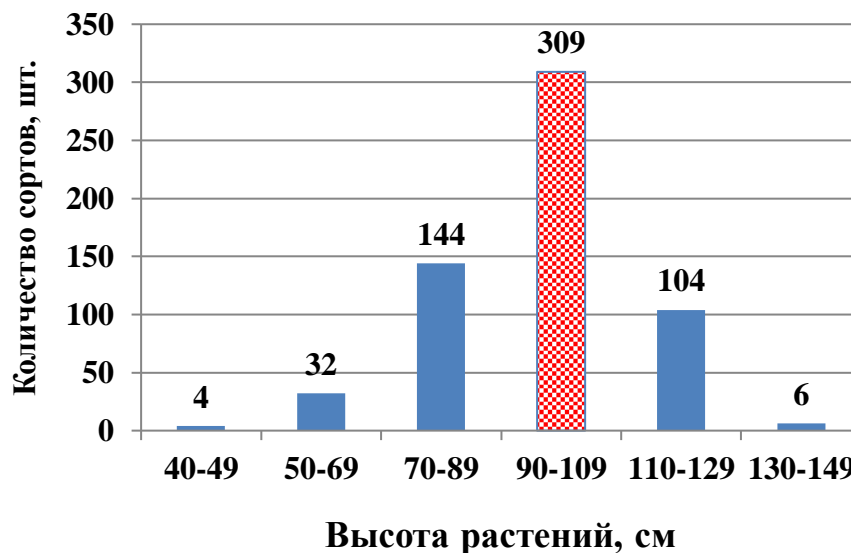


Рисунок 27 – Высота растений коллекционных образцов риса

В изучаемой коллекции преобладали формы со средней высотой растений от 70 до 129 см в количестве 557 образцов. Провели отбор коллекционных образцов с высотой растений 90–109 см оптимальной для комбайнированной уборки, их количество составило 309 шт., а остальные исключили из исследования.

Формирование репродуктивных органов (колосков) является важнейшим этапом у растений риса. Длина и плотность метелки имеют решающее значение при формировании зерновой продуктивности растения риса (Костылев и др., 2019). Метелки образцов риса в коллекции существенно различались между собой по размерам, форме, числа колосков на боковых ветвях. Длина метелок отобранных образцов варьировала от 11,0 до 28,9 см. Преобладали образцы с длинной метелки 14,1–19,9 см, что составило 76,4% (рисунок 28).

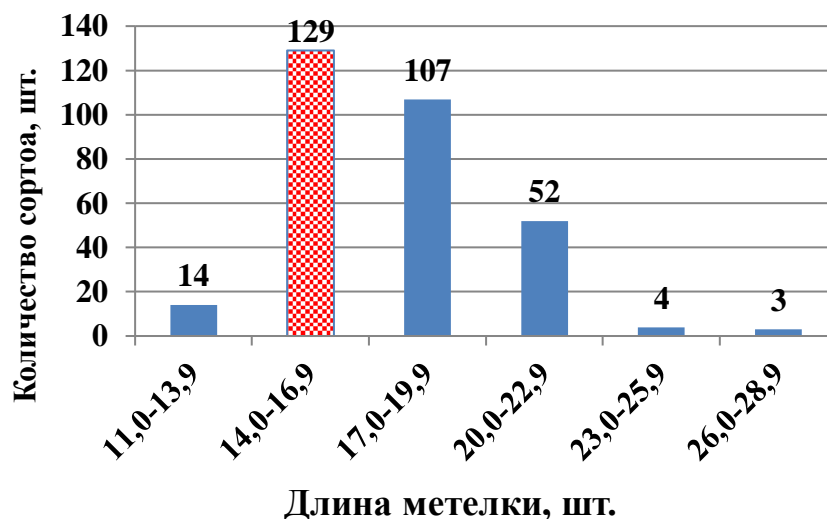


Рисунок 28 – Длина метелки коллекционных образцов риса

Наибольшую ценность для селекции представляют сорта с плотной метелкой длиной 14–17 см, по этому критерию было отобрано 129 образцов.

Показатель «количество зерен с 1 метелки» – один из главных элементов продуктивности риса, который зависит от признаков «общее число колосков» и «число стерильных колосков» (AL–Tam et al., 2013). Увеличение количества зерен в метелке может привести к наличию большого количества стерильных колосков и уменьшению крупности семян, что снижает массу 1000 и урожайность. По этому признаку варьирование составило от 50 до 289 шт. (рисунок 29).

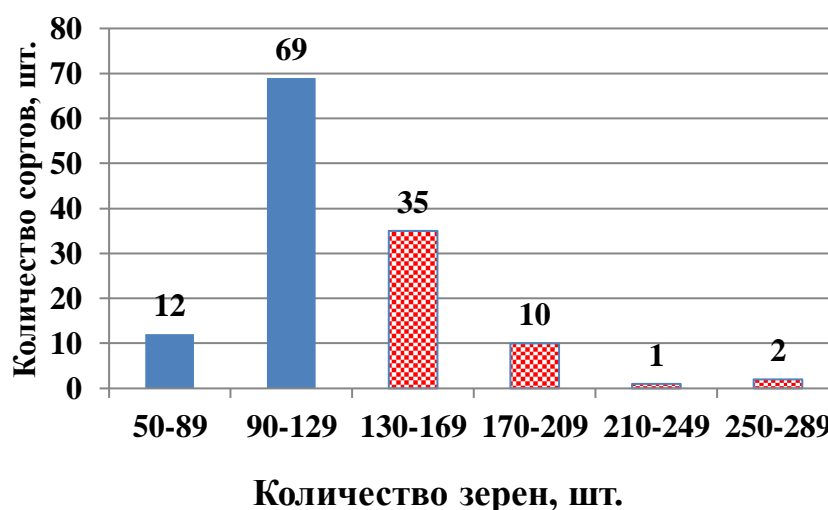


Рисунок 29 – Количество зерен с 1 метелки у коллекционных образцов риса

В общей сложности было отобрано 48 образцов риса с оптимальным количеством зерен от 130 до 289 шт.

Крупность зерна риса является важным экономическим показателем, оказывающим прямое влияние на урожайность за счет массы зерен в метелке. Крупное зерно обеспечивает более высокое качество крупы и ее больший выход (Parida et al., 2022). Кривая распределения частот у сортов варьировала от 20,1 до 32,0 г (рисунок 30).

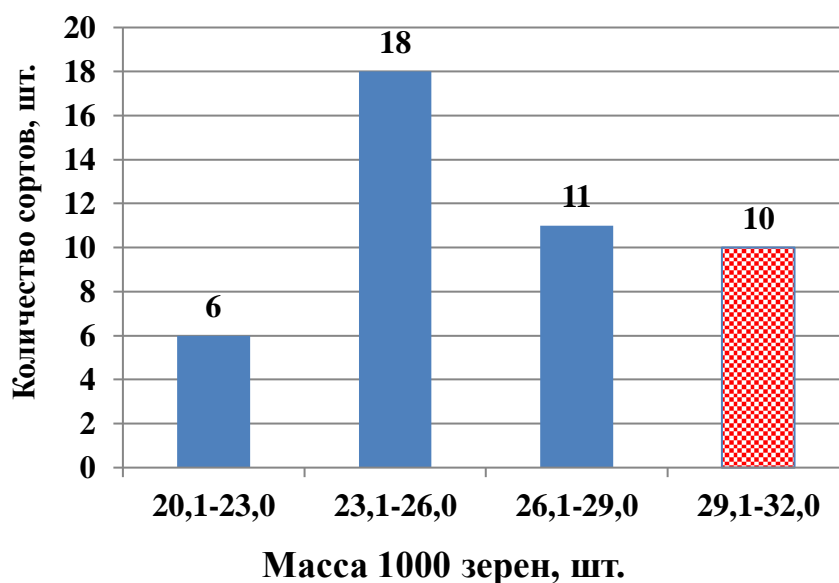


Рисунок 30 – Масса 1000 зерен коллекционных образцов риса

В общей сложности по изученным параметрам модельного сорта из коллекции отобрали 10 образцов риса с массой 1000 зерен 29,1–32,0 г, которые удовлетворяют всем требованиям для культивирования их в агроклиматической зоне Юга России. В таблице 7 представлена характеристика отобранных высокопродуктивных образцов риса в качестве исходных форм для гибридизации.

Таблица 7 – Характеристика высокопродуктивных сортов риса селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» и ФГБНУ «ФНЦ риса» по хозяйственно ценным признакам

№	Сорт	Вегетационный период, дней	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерен в метелке, шт.	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, т/га
1	Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9	6,8±0,9
2	Боярин	118,5±3,5	95,2±5,6	14,8±1,4	148,2±10,4	30,9±0,9	7,2±0,6
3	Бахус	115,5±2,9	100,2±6,1	15,0±1,1	144,3±9,5	30,1±1,3	7,9±0,8
4	Южанин	120,2±2,5	99,3±2,9	14,5±1,3	145,5±8,4	29,7±1,7	7,4±0,8
5	Магнат	112,5±5,1	100,2±5,1	15,0±0,5	149,3±10,2	29,9±0,9	6,7±0,9
6	Степняк	113,5±3,5	99,1±3,3	14,7±0,9	147,2±9,6	29,8±1,1	6,7±0,7
7	Кубояр	115,3±2,8	97,4±4,5	14,9±1,2	140,1±9,2	29,6±1,2	7,1±0,8
8	Командор	115,5±2,9	100,2±6,1	15,0±1,1	144,3±9,5	30,1±1,3	6,9±1,1
9	Кубань-3	112,5±4,2	98,2±3,5	14,5±1,3	147,3±8,4	29,7±1,4	6,7±1,4
10	Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6	7,1±0,9

По результатам полевых испытаний можно заключить, что по всем изученным признакам у данных образцов наблюдается хорошая однородность, что имеет ключевое значение при их дальнейшей гибридизации.

Зарубежные сорта–доноры устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению в отличие от сортов отечественной селекции считаются позднеспелыми с вегетационным периодом от 145 до 160 дней, что является препятствием для выращивания их в условиях Ростовской области. При культивировании, сорта–доноры риса зацветали в сентябре и не успевали созреть. В таблице 8 представлены важнейшие хозяйственно ценные признаки зарубежных сортов риса устойчивых к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

Таблица 8 – Характеристика сортов–доноров риса Института сельскохозяйственной генетики (Ханой, Вьетнам) по хозяйственно ценным признакам

№	Сорт	Вегетационный период, дней	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерен в метелке, шт	Масса 1000 зерен, г
1	IR-64 (<i>Sub1A</i>)	140,2±4,6	110,2±4,7	25,7±1,1	98,2±10,3	28,3±3,0
2	TDK-1 (<i>Sub1A</i>)	144,1±5,9	107,2±4,5	23,7±1,9	67,5±12,1	28,8±1,1
3	Khan Dan (<i>Sub1A</i>)	149,3±5,3	106,2±5,3	23,3±1,7	97,3±12,5	19,3±1,9
4	BR-11 (<i>Sub1A</i>)	140,4±5,9	110,4±4,8	20,9±1,1	74,3±10,4	27,4±2,0
5	Swarna (<i>Sub1A</i>)	135,3±5,4	106,2±5,3	22,4±1,8	85,2±11,4	27,6±1,8
6	Inbara-3 (<i>Sub1A</i>)	140,3±6,5	100,3±5,2	25,2±1,6	95,2±12,1	25,5±1,1
7	CR-1009 (<i>Sub1A</i>)	145,4±4,9	103,2±6,4	22,8±1,9	68,3±10,2	29,4±1,3
8	Mazhan Red (<i>SK1,2, AG1,2</i>)	142,2±5,4	134,1±6,7	22,7±1,7	99,2±10,3	27,3±2,0
9	Kharsu 80A (<i>SK1,2, AG1,2</i>)	140,2±4,4	130,3±5,4	22,4±1,6	68,2±11,1	28,1±1,5
10	Khao Hlan On (<i>SK1,2, AG1,2</i>)	145,2±5,3	124,2±5,3	18,3±1,5	108,2±11,3	25,5±1,2
11	IR74099 (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	150,1±5,4	122,1±4,2	20,5±1,7	95,2±13,4	21,4±1,9
12	R21(IR86385) (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	149,2±4,3	86,2±5,2	19,5±1,3	75,4±10,3	24,5±1,8
13	R26(IR86385) (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	140,3±5,8	84,2±5,1	16,3±1,5	89,2±9,8	22,2±1,6
14	R20(IR86385) (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	142,2±4,4	79,2±6,2	16,5±1,6	77,3±10,2	26,4±2,0
15	R17(IR86385) (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	148,1±6,4	77,3±5,1	18,6±1,7	76,3±11,2	25,7±1,5
16	FL-478 (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	138,3±4,3	70,3±4,1	21,5±1,1	104,2±10,7	25,5±1,5
17	IR527132B (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	148,2±6,1	113,2±5,3	21,3±1,9	49,4±10,2	20,0±1,4
18	Pokkali (<i>Saltol, SNC, SKC1</i>)	143,1±5,3	135,3±5,2	16,5±1,9	77,4±10,1	25,9±2,1

В среднем у сортов–доноров продолжительность вегетационного периода составила 143 дня, варьируя от 135 до 150 дней. По высоте растений

варьирование составило от 70 (FL-478) до 135 см (Pokkali). Сорты с генами *SNORKEL* и *AG* устойчивости к глубоководному затоплению были более высокорослые в сравнении с донорами солеустойчивости. Сорты-доноры имели длинные метелки в среднем 21 см, варьируя от 16,5 (Pokkali) до 25,7 см (IR-64), что неблагоприятно сказывается на количестве зерен. Выход зерен с 1 метелки был низким и в среднем у сортов составил 83 зерна, варьируя от 49 (IR527132B) до 108 шт. (Khao Hlan On). По массе 1000 зерен максимальные значения наблюдались у сортов CR-1009 (29,4 г), TDK-1 (28,8 г), IR-64 (28,3 г) и Kharsu 80A (28,1 г).

3.2 Определение информативности ДНК-маркеров устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению

В ходе предварительного исследования коллекционных и вьетнамских гаплотипов риса было оценено 40 пар специально подобранных праймеров, ассоциированных с устойчивостью у растений риса к глубоководному затоплению и хлоридному засолению.

Идентификация в родительских сортах риса генов устойчивости к глубоководному затоплению. Анализ 25 пар праймеров, ассоциированных с устойчивостью у риса к глубоководному затоплению, показал, что лишь 7 пар (Sub1A203, RM 7481, SK1(1F1R), SK1(2F2R), SK2(2F2R), RM 24161, RM 478) обеспечили специфическую и стабильно воспроизводимую амплификацию продукта ДНК ожидаемого размера. Данное условие является обязательным для проведения последующего молекулярно-генетического анализа.

Для наглядности на рисунках 31–35 представлены результаты ПЦР анализа по некоторым маркерам. На электрофореграмме отчетливо показано отсутствие у отечественных сортов искомого гена *Sub1A*. Ампликон молекулярной массой 203 пн, определяющий доминантную аллель гена

Sub1A визуализировался только в зарубежных сортах – Khan Dan, Inbara–3, BR-11, Swarna, CR–1009, TDK–1, IR–64 (рисунок 31).

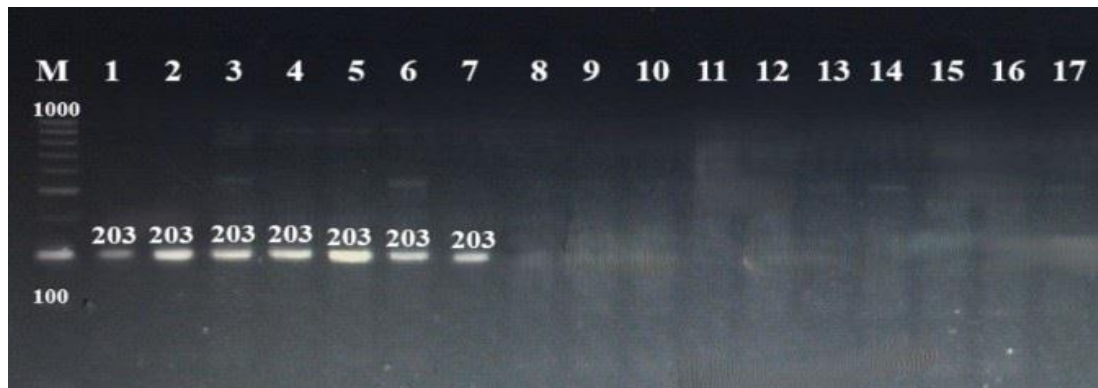


Рисунок 31 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером Sub1A203 (ген *Sub1A*)

М – маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Khan Dan; №2–Inbara–3; №3–BR–11; №4–Swarna; №5–CR–009; №6–TDK–1; №7–IR–64; №8–Новатор; №9–Контакт; №10–Боярин; №11–Бахус; №12–Южанин; №13–Магнат; №14–Степняк; №15–Кубояр; №16–Командор; №17–Кубань–3

Ампликон молекулярной массой 95 пн, идентифицирующий доминантную аллель гена *Sub1A* был определена в 3–х зарубежных генотипах (Khan Dan, Inbara-3, BR-11), а в 5–ти отечественных сортах бэнд искомого размера отсутствовал, визуализировалась рецессивная аллель размером 80 пн (рисунок 32).

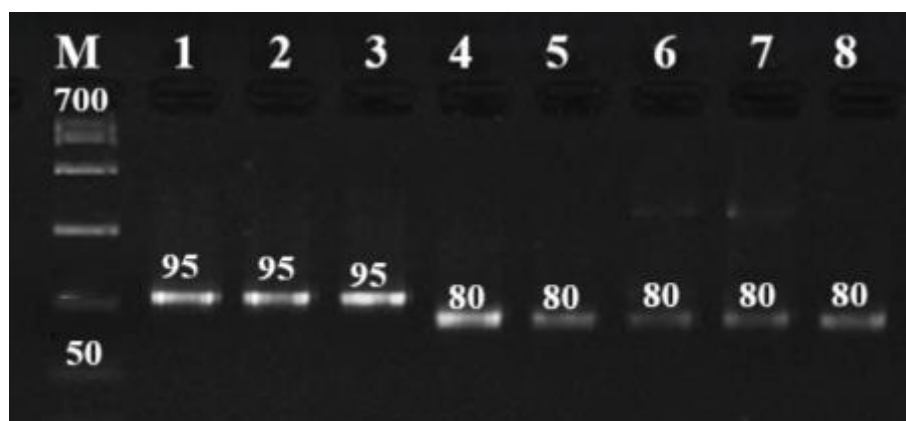


Рисунок 32 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером RM 7481 (ген *Sub1A*)

М – маркер молекулярного веса (50–700 пн); №1–Khan Dan; №2–Inbara–3; №3–BR–11; №4–Новатор; №5–Контакт; №6–Боярин; №7–Степняк; №8–Магнат

ПЦР–анализ по маркеру гена *SK2* с размером ампликона 305 пн идентифицировали в зарубежных сортах №1–Mazhan Red, №2–Khao Hlan On, №3–Kharsu 80A, а в отечественных высокопродуктивных сортах №4–13 искомый ген отсутствовал (рисунок 33).

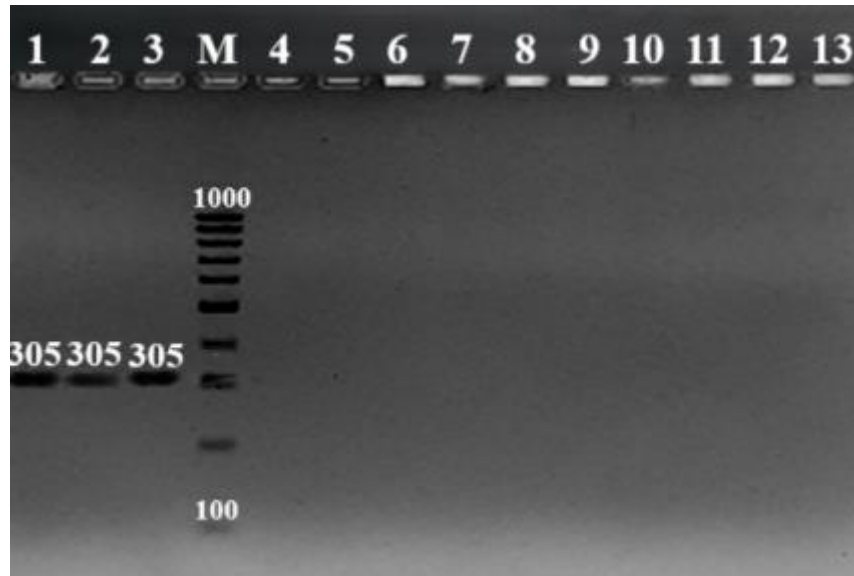


Рисунок 33 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером *SK2* (2F2R) (ген *SK2*)

М – маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Mazhan Red; №2–Khao Hlan On; №3–Kharsu 80A; №4– Новатор; №5–Контакт; №6–Боярин; №7–Бахус; №8–Южанин; №9–Магнат; №10–Степняк; №11–Кубояр; №12–Командор; №13–Кубань–3

Маркер гена *SK1* с размером ампликона 210 пн отчетливо визуализировался только в зарубежных сорта №2–Khao Hlan On и №3–Mazhan Red, устойчивых к глубоководному затоплению (рисунок 34).

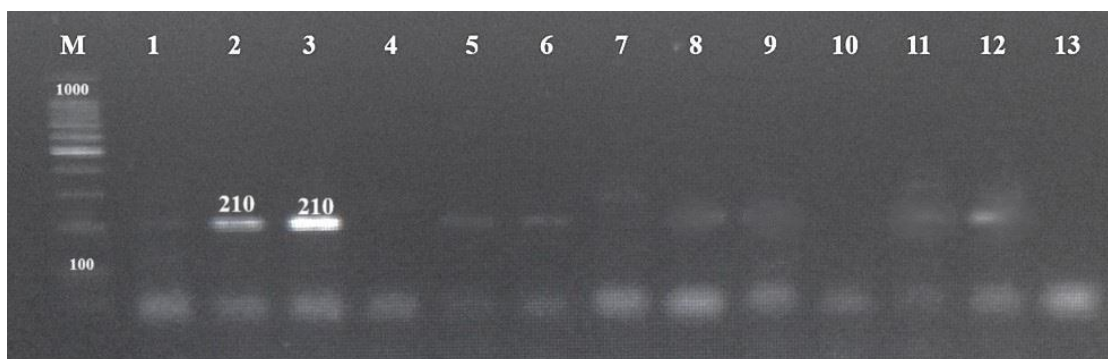


Рисунок 34 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером *SK1*(2F2R) (ген *SK1*)

М – маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1– Kharsu 80А; №2–Khao Hlan On; №3– Mazhan Red; №4– Новатор; №5–Контакт; №6–Боярин; №7–Бахус; №8–Южанин; №9–Магнат; №10–Степняк; №11–Кубояр; №12–Командор; №13–Кубань–3

Доминантная аллель гена *SK1* с размером ампликона 743 пн визуализировалась только в зарубежных сортах №1–Mazhan Red, №2–Khao Hlan On и №3–Kharsu 80А, а в отечественных высокопродуктивных сортах отсутствовала (рисунок 35).

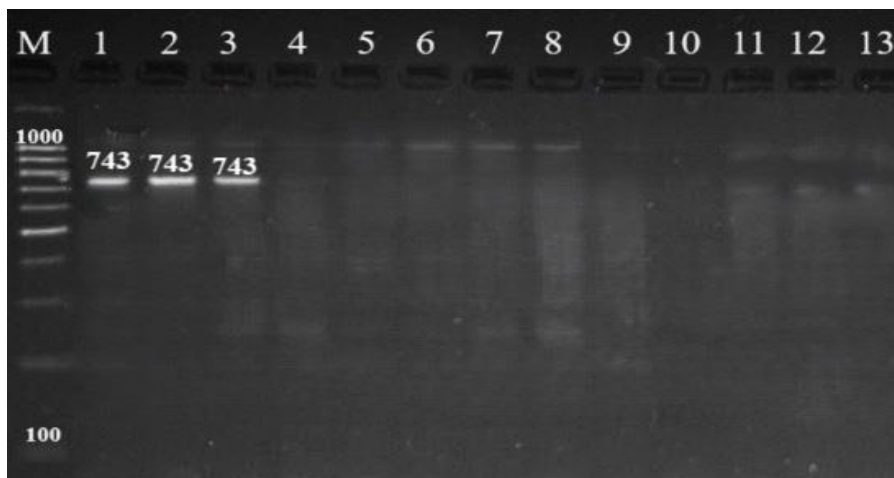


Рисунок 35 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером SK1(1F1R) (ген *SK1*)

М – маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Mazhan Red; №2–Khao Hlan On; №3–Kharsu 80А; №4–Новатор; №5–Контакт; №6–Боярин; №7–Бахус; №8–Южанин; №9–Магнат; №10–Степняк; №11–Кубояр; №12–Командор; №13–Кубань–3

Таким образом, по результатам ДНК–типирования отобранных родительских образцов риса гены *Sub1*, *SK1*, *SK2*, *AG1* и *AG2*, ассоциированные с устойчивостью к глубоководному затоплению, были идентифицированы только в зарубежных сортах.

Идентификация в родительских сортах риса генов устойчивости к хлоридному засолению. Молекулярно-генетический анализ по 15 молекулярным маркерам устойчивости к хлоридному засолению показало

следующие результаты, представленные на рисунках 36–38. В результате ДНК–типирования образцов риса информативными оказались всего лишь 3 пары маркеров (RM493, DQ148410, qSNC3), которые могут представлять особый интерес в маркер–вспомогательной селекции. Использование остальных опробованных маркеров привело к неспецифической амплификации.

Доминантную аллель гена *Saltol* с размером ампликона 211 пн идентифицировали в 5–х зарубежных сортах №1–Pokkali, №3–R17, №4–FL–478, №7–IR52132B, №8–IR74099, из 8–ми отобранных для исследования. У сортов №9–Новатор и №11–Боярин визуализировалась рецессивная аллель размером 170 пн (рисунок 36).

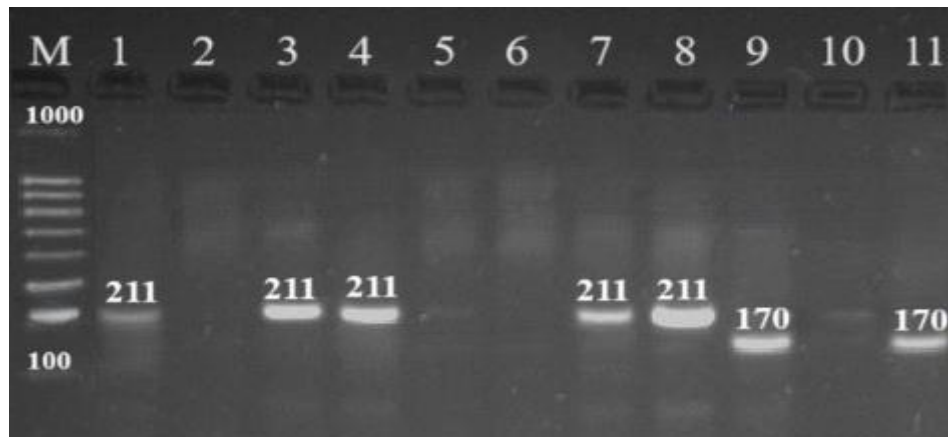


Рисунок 36 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером RM493 (ген *Saltol*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Pokkali; №2–R20; №3–R17; №4–FL–478; №5–R20; №6–R21; №7–IR52132B; №8–IR74099; №9–Новатор; №10–Контакт; №11–Боярин

ПЦР–анализ с маркером DQ148410 гена *SKC1* длиной ампликона 170 пн идентифицировали во всех зарубежных сортах – №4–Pokkali, №5–IR74099, №6–R17, №7–R26, №8–IR52132B, №9–FL–478, №10–R20, №11–R21, а у отечественных сортов №1–Новатор, №2–Контакт, №3–Боярин визуализировалась рецессивная аллель размером 150 пн (рисунок 37).

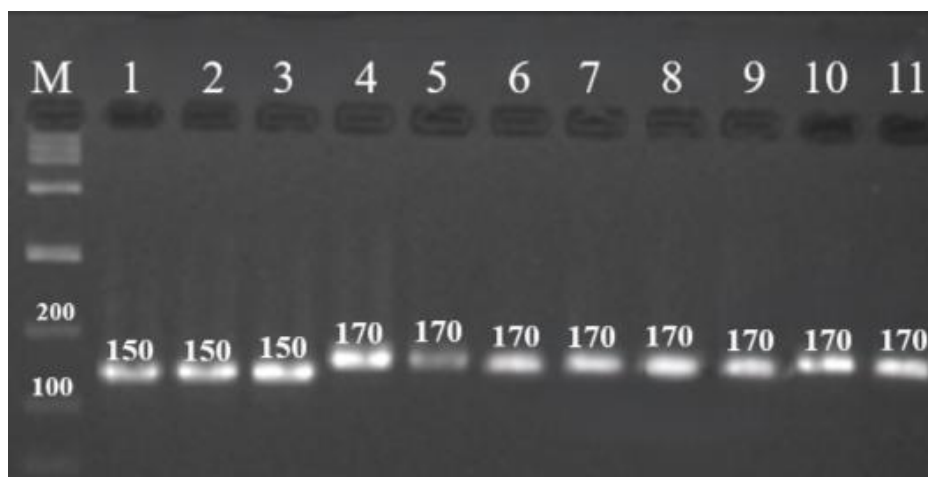


Рисунок 37 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркером DQ148410 (ген *SKC1*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Новатор; №2–Контакт; №3–Боярин; №4–Роккали; №5–IR74099; №6–R17; №7–R26; №8–IR52132В; №9–FL–478; №10–R20; №11–R21

Маркер гена *SNC* с размером ампликона 200 пн идентифицировали в зарубежных сортах №3–R17 и №4–IR74099 (рисунок 38).

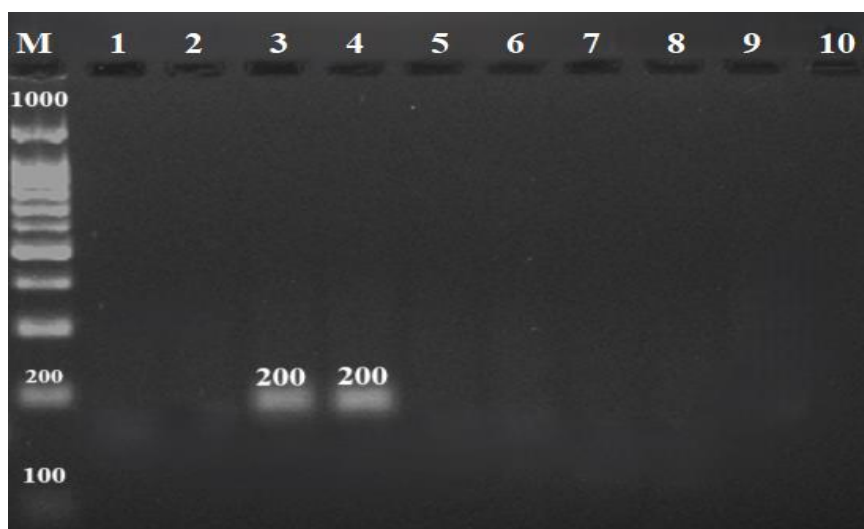


Рисунок 38 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК зарубежных и отечественных сортов риса с маркер qSNC3 (ген *SNC*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Роккали; №2–R20; №3–R17; №4–IR74099; №5–FL–478; №6–IR52132В; №7–R26; №8–Новатор; №9–Контакт; №10–Боярин

Таким образом, по результатам ДНК–типирования отобранных родительских образцов риса гены *Saltol*, *SKC1* и *SNC*, ассоциированные с устойчивостью к хлоридному засолению, были идентифицированы только в зарубежных сортах.

В целях подтверждения информативности системы отобранных генетических маркеров и создание новых сортов риса, устойчивых к глубоководному затоплению и хлоридному засолению, на основе отечественных высокопродуктивных сортов была проведена гибридизация с зарубежными сортами.

3.3 Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК гибридных генотипов риса

3.3.1 Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК гибридного материала риса по устойчивости к глубоководному затоплению

Гибридные растения поколения F_1 имели высокую степень стерильности, поэтому их использовали для получения гибридов следующих поколений, из которых проводили отбор образцов по фенотипическим признакам: скороспелость, не осыпаемость зерен, выполненность метелки и другие. Отбирались растения, максимально близкие по морфологическим признакам к рекуррентной форме и обладающие, помимо этого, гомозиготным доминантным состоянием генов устойчивости к глубоководному затоплению. Растения, которые по фенотипу имели признаки донорных сортов, были исключены из дальнейшего рассмотрения.

Для подтверждения наличия или отсутствия интродуцируемых генов унаследованных от доноров, отобранные растения проанализировали методом ПЦР–анализа. Для наглядности на рисунке 39 представлены результаты молекулярно–генетического анализа с маркером Sub1A203,

ассоциируемого с устойчивостью к глубоководному затоплению у растений риса и контролируемой геном *Sub1A*.

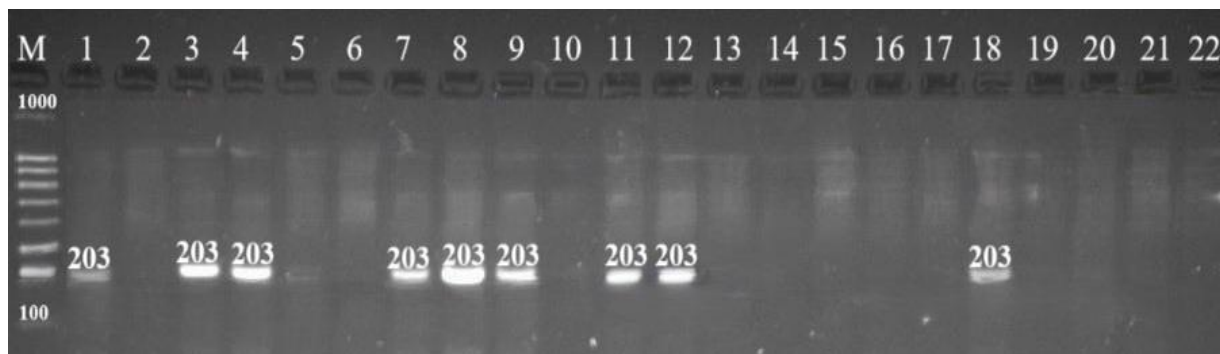


Рисунок 39 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных образцов риса с маркером Sub1A203(ген *Sub1A*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Inbara–3 (положительный контроль); №2–Новатор (отрицательный контроль); №3–22 – исследуемые гибридные образцы риса Inbara–3 x Новатор; №3–3121, №4–3122, №7–3123, №8–3124, №9–3125, №11–3126, №12–3130, №18–3131 – с геном *Sub1A*

Доминантная аллель родительской линии №1–Inbara–3 выявлена у образцов № 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 18. Гибридные образцы под № 5, 6, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22 унаследовали рецессивную аллель от сорта Новатор.

Молекулярно–генетический анализ 386 отобранных из F₅ поколения гибридных образцов, родительские линии которых имели гены устойчивости к глубоководному затоплению, показал следующие результаты, представленные на электрофореграммах. На рисунке 40 представлены результаты маркер контроля, демонстрирующие наследование целевых генов устойчивости к глубоководному затоплению в гибридных комбинациях риса.

Доминантная аллель родительской линии №1–IR–64 и №18–BR–11 выявлена также в гомозиготном состоянии у гибридных образцов №4, 7, 29, 30 и 32. Маркер Sub1A 203 демонстрировал доминантный тип наследования гена устойчивости к глубоководному затоплению (рисунок 40).

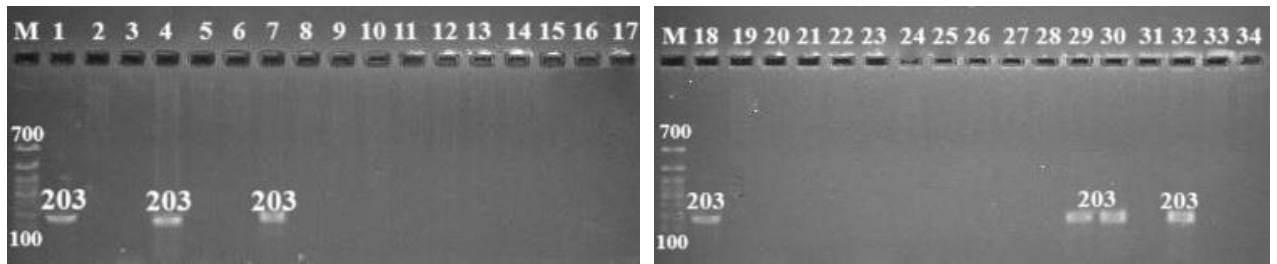


Рисунок 40 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных образцов риса с маркером Sub1A 203(ген *Sub1A*)

М–маркер молекулярного веса (100–700 пн); №1–IR–64 (положительный контроль); №18–BR–11 (положительный контроль); №2–Боярин (отрицательный контроль); №3–34–исследуемые гибридные образцы риса; №4–5578/3(IR–64 x Боярин), №7–5579/2 (IR–64 x Боярин), №29–5618/1(BR–11 x Новатор), № 30–5618/2(BR–11 x Новатор), №32–5618/4(BR–11 x Новатор) – с геном *Sub1A*

Расчет частоты рекомбинации показал значение 2,8% (менее 20%), что свидетельствует о том, что сила сцепления маркера с признаком составляет 2,8 сМ, т.е. сцепленное наследование данного маркера с признаком.

Маркер RM7481 инициировал амплификацию фрагментов молекулярной массы порядка 95 пн, что соответствует доминантной аллели зарубежного сорта №1–Swarna, устойчивого к глубоководному затоплению (рисунок 41). Частота рекомбинации имела значение 1,2%.

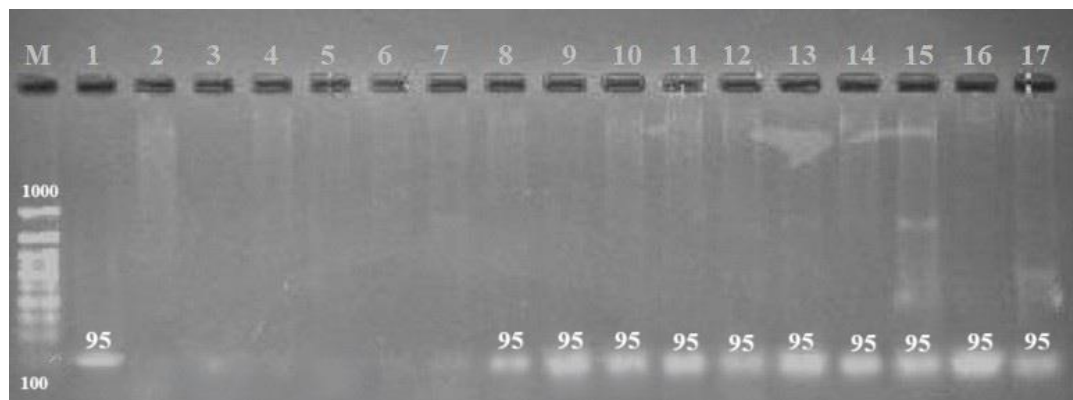


Рисунок 41 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных образцов риса с маркером RM7481 (ген *Sub1A*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Swarna (положительный контроль); №2–Новатор (отрицательный контроль); №3–Магнат (отрицательный контроль); №4–17 – исследуемые гибридные образцы риса; №8–4144(Swarna x Новатор), №9–4142(Swarna x Новатор), №10–4191(Swarna

х Магнат), №11–4192(Swarna х Магнат), №12–4193(Swarna х Магнат), №13–4195(Swarna х Магнат), №14–4141(Swarna х Новатор), №15–4196(Swarna х Магнат), №16–4198(Swarna х Магнат), №17–4195(Swarna х Магнат) – с геном *Sub1A*

На рисунке 42 доминантная аллель сорта №2–Kharsu 80A гена *SK1* не визуализируется у отечественного сорта №1–Контакт и гибридных образцов риса под № 4, 10, а остальные изученные гибриды унаследовали доминантную аллель гена *SK1*. Частота рекомбинации составила 2,3% (2,3 сМ).

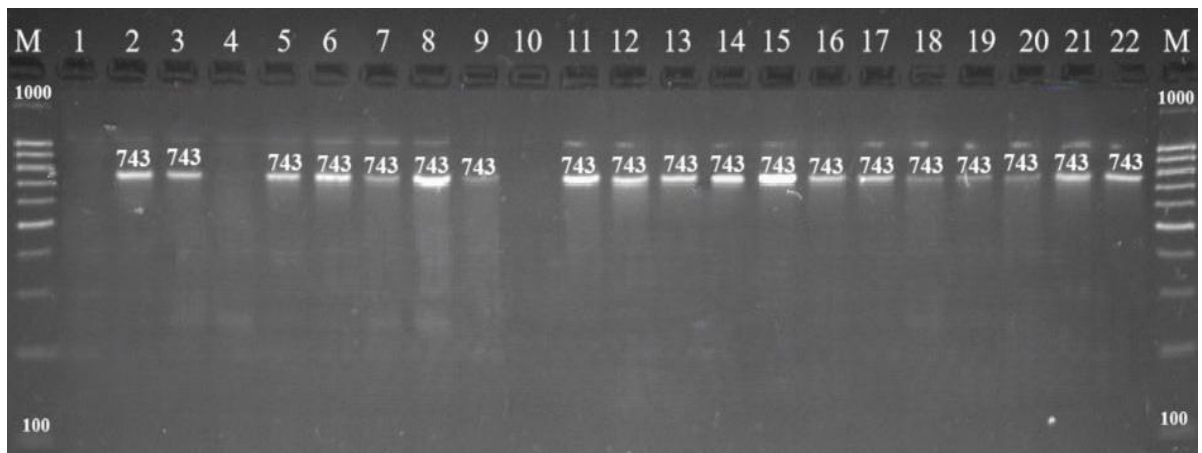


Рисунок 42 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных образцов риса с маркером SK1(1F1R) (ген *SK1*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Контакт (отрицательный контроль); №2–Kharsu 80A (положительный контроль); №3–22 – исследуемые гибридные образцы риса; №3–4381(Kharsu 80A х Контакт), №5–4389(Kharsu 80A х Контакт), №6–4390(Kharsu 80A х Контакт), №7–4391(Kharsu 80A х Контакт), №8–4392(Kharsu 80A х Контакт), №9–4393(Swarna х Магнат), №11–4395(Kharsu 80A х Контакт), №12–44396(Kharsu 80A х Контакт), №13–4397(Kharsu 80A х Контакт), №14–4398(Kharsu 80A х Контакт), №15–4401(Kharsu 80A х Контакт), №16–4402(Kharsu 80A х Контакт), №17–4792(Kharsu 80A х Контакт), №18–4798(Kharsu 80A х Контакт), №19–4794(Kharsu 80A х Контакт), №20–4283(Контакт х Kharsu 80A), №21–4284(Контакт х Kharsu 80A), №15–4401(Кубояр х Kharsu 80A) – с геном *SK1*

Гибридные линии под №3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 17 в комбинации скрещивания Контакт х Khao Hlan On унаследовали доминантную аллель гена *SK2* от зарубежного сорта №2–Khao Hlan On (рисунок 43).

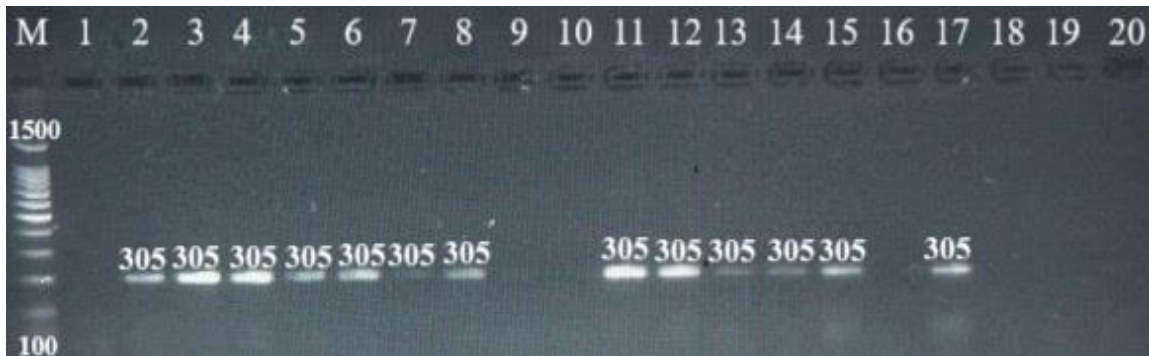


Рисунок 43 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных образцов риса с маркером SK2(2F2R) (ген SK2)

М–маркер молекулярного веса (100–1500 пн); №1–Контакт (отрицательный контроль); №2–Khao Hlan On (положительный контроль); №3–20 – исследуемые гибридные образцы риса Контакт x Khao Hlan On; №3–4351, №4–4352, №5–4353, №6–4354, №7–4355, №8–4356, №11–4361, №12–4362, №13–4363, №14–4364, №15–4744/2, №17–4744 – с геном SK2

Расчет частоты рекомбинации показал значение 2,5%, что свидетельствует о том, что сила сцепления маркера с признаком составляет 2,5 сМ.

На рисунке 44 в качестве рекуррентного родителя использовался сорт риса №2–Контакт, в комбинации скрещивания Контакт x Khao Hlan On. Доминантная аллель гена AG2 визуализировалась в гибридных генотипах №3, 4, 7, 8, 9, 11, 18 и у зарубежного сорта №1–Khao Hlan On. Частота рекомбинации составила 2,2%.

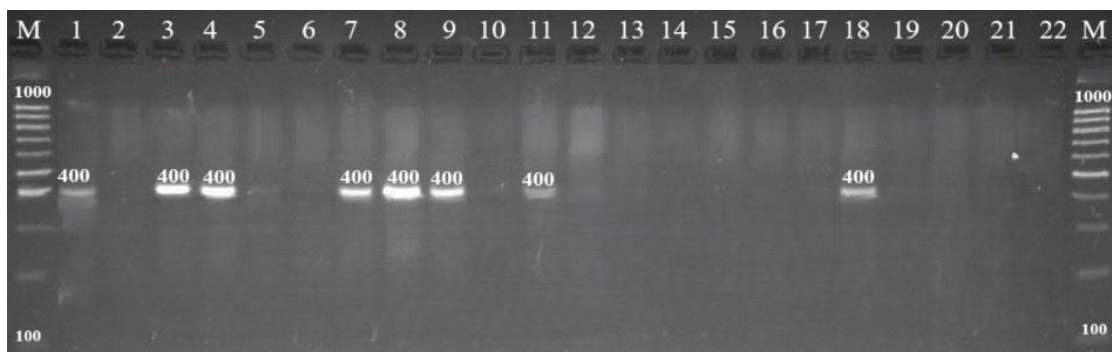


Рисунок 44 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридных образцов риса с маркером RM478 (ген AG2)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Khao Hlan On (положительный контроль); №2–Контакт (отрицательный контроль); №3–22 – исследуемые гибридные образцы риса; №3–4351; №4–4352, №7–4355, №8–4356, №9–4357, №11–4361, №18–4365 – с геном AG2

По результатам скрининга, основанном на ПЦР анализе, выявлены гибриды, которые унаследовали доминантные аллель генов *Sub1A*, *SK1*, *SK2*, *AG1* и *AG2*, ассоциированные у риса с устойчивостью к глубоководному затоплению. В общей сложности из 386 гибридных линий риса 222 образца имели доминантные аллели генов устойчивости к глубоководному затоплению, что составляет 57,5% от количества изученных. Доминантную аллель гена *Sub1A* унаследовали 42,2% образцов, а генов *SK1*, *SK2*, *AG1* и *AG2* – 14,5%. При этом некоторые гибридные образцы риса унаследовали доминантные аллели нескольких генов: *SK1*, *AG1* и *AG2* – №4284, 4397(Контакт х Kharsu 80A), №4381(Kharsu 80A х Контакт), №4357, 4262, 4363(Контакт х Khao Hlan On), №4384, 4385, 4386, 4387(Khao Hlan On х Кубояр), №4376(Кубояр х Mazhan Red); *AG1* и *AG2* – №4366, 4367, 4368, 4369, 4370, 4371, 4375(Кубояр х Kharsu 80A), №4394(Kharsu 80A х Контакт), №4383(Khao Hlan On х Контакт), №4378(Кубояр х Mazhan Red); *SK1* и *AG2* – №4390, 4398(Kharsu 80A х Контакт), №4365(Контакт х Khao Hlan On); *SK1* и *AG1* – №4392, 4393, 4396(Kharsu 80A х Контакт); *SK2* и *AG2* – №4351, 4356(Контакт х Khao Hlan On); *SK2*, *AG1* и *AG2* – №4352, 4365, 4361(Контакт х Khao Hlan On), №4388(Khao Hlan On х Кубояр), №4377(Кубояр х Mazhan Red); *SK2* и *AG1* – № 4354, 4364(Контакт х Khao Hlan On) (приложение А).

3.3.2 Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК гибридного материала риса по устойчивости к хлоридному засолению

Растения поколения F₁ имели высокую степень стерильности, поэтому их использовали для получения гибридов последующих поколений, из которых проводили отбор по фенотипическим признакам: скороспелость, неосыпаемость зерен, выполненность метелки и другие. Отбирались растения, демонстрирующие максимальное морфологическое сходство с отечественными высокопродуктивными сортами и унаследовавшие

доминантные аллели генов, ассоциированных с устойчивостью у риса к хлоридному засолению. Растения, показывающие фенотипические признаки донорных сортов, подвергались браковке из дальнейшего исследования. Отобранные гибридные образцы характеризовались ранним созреванием, хорошо развитой метелкой и отсутствием осыпаемости зерен. Для подтверждения наличия или отсутствия интродуцируемых аллелей унаследованных от зарубежных солеустойчивых сортов, отобранные гибридные растения проанализировали методом ПЦР–анализа.

Для наглядности на рисунке 45 представлены результаты молекулярно–генетического анализа с маркером DQ148410, ассоциируемого с устойчивостью у растений риса к хлоридному засолению. Доминантную аллель гена *SKC1* от зарубежного сорта №2–IR52713 унаследовали гибридные образцы под № 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13. Образец №11 являлся гетерозиготным, а №3 и 5 унаследовали рецессивную аллель от отечественного сорта №1–Новатор.

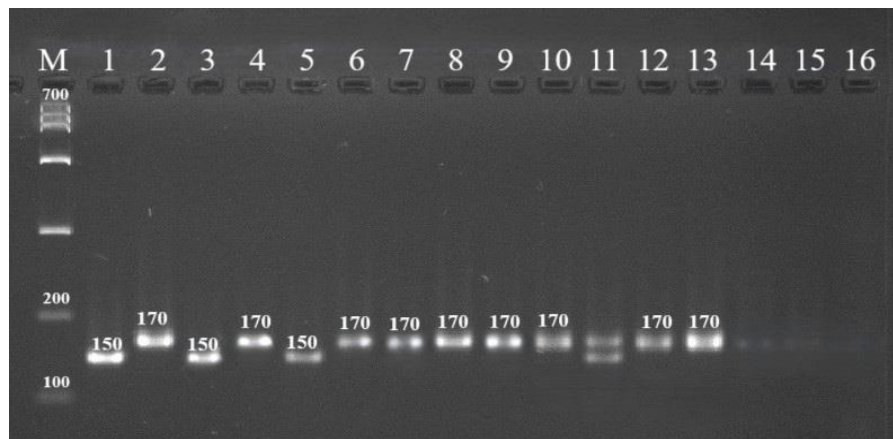


Рисунок 45 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридов риса с маркером DQ148410 (ген *SKC1*)

М–маркер молекулярного веса (100–700 пн); №1–Новатор (отрицательный контроль); №2–IR52713 (положительный контроль); №3–16 – исследуемые гибридные образцы риса IR52713 x Новатор

Молекулярно–генетический анализ 99 отобранных гибридных образцов из F₅ поколения, родительские линии, которых имели гены

солеустойчивости, показал следующие результаты, представленные на электрофореграммах.

Донорная аллель гена *Saltol* сорта №2–IR74099 идентифицирована в гибридных образцах под №3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 22 (рисунок 46).

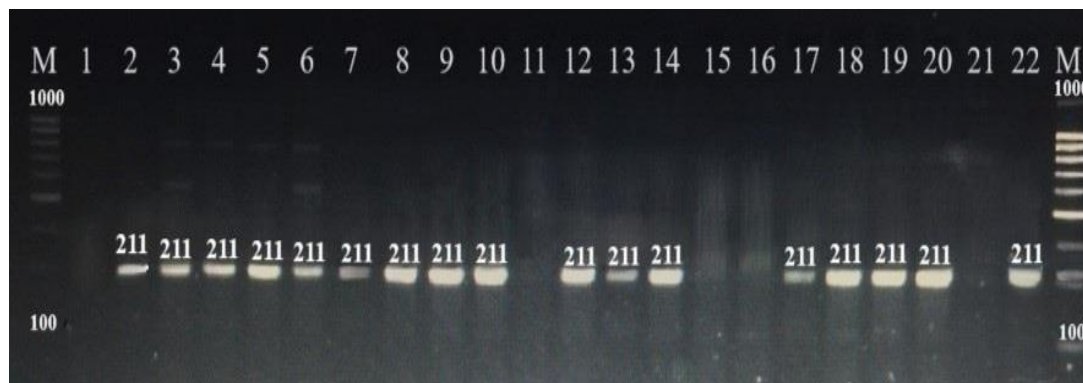


Рисунок 46 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридов риса с маркером RM493 (ген *Saltol*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Контакт (отрицательный контроль); №2–IR74099 (положительный контроль); №3–22 – исследуемые гибридные образцы риса IR74099 x Контакт; №3–623; №4–624; №5–3214; №6–3251; №7–3136; №8–2770; №9–2772; №10–2773; №12–1956; №13–2520; №14–1960; №17–2774; №18–2771; №19–2767; №20–1957; №22–1955 – с геном *Saltol*

Расчет частоты рекомбинации показал значение 1,8% (менее 20%), что свидетельствует о том, что сила сцепления маркера с признаком составляет 1,8 сМ, т.е. сцепленное наследование данного маркера с признаком.

На рисунке 47 представлены результаты ПЦР–анализа гибридных генотипов риса при скрещивании солеустойчивого зарубежного сорта IR52713 с отечественным высокопродуктивным сортом Новатор. Доминантная аллель гена *SKC1* визуализировалась у сорта №1–IR52713 и у селекционных образцов под № 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20. Частота рекомбинации составила 1,5%.



Рисунок 47 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридов риса с маркером DQ148410 (ген *SKC1*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–IR52713 (положительный контроль); №2–Новатор (отрицательный контроль); №3–22 – исследуемые гибридные образцы риса IR52713 x Новатор; №3–3137; №4–3143; №5–3177; №6–3181; №7–3192; №8–3194; №9–3198; №10–3212; №11–1657; №13–4383; №14–4448; №15–2776; №17–1964; №18–1961; №19–1658; №20–1958 – с геном *SKC1*

Доминантная аллель гена *SNC*, ассоциированная с устойчивостью у растений риса к хлоридному засолению, визуализировалась у зарубежного сорта №2–R17(IR86385-87-1-1-B) и у гибридных линий под №3, 5, 10, 21, 22, 23, а остальные образцы унаследовали рецессивную аллель от отечественного сорта №1–Боярин (рисунок 48). Частота рекомбинации составила 1,4%.



Рисунок 48 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК гибридов риса с маркером qSNC (ген *SNC*)

М–маркер молекулярного веса (50–1000 пн); №1–Боярин (отрицательный контроль); №2–R17(IR86385-87-1-1-B) (положительный контроль); №3–23–исследуемые гибридные образцы риса R17 x Новатор; №3–2010; №5–1959; №10–2519; №21–1963; №22–1962; №23–2775 – с геном *SNC*

По результатам скрининга, основанном на ПЦР анализе маркеров, отобраны гибридные образцы риса, несущие доминантные аллели генов *Saltol*, *SKC1* и *SNC*. Функциональные гены были идентифицированы в 45 гибридных образцах из 99 изученных, что составляет 45,5% (приложение Б). При этом некоторые образцы унаследовали доминантные аллели нескольких генов: *Saltol* и *SKC1* – №1657, 3137, 3143, 3177, 3181, 3192, 3194, 3198, 3212, 4383, 4448(IR52713 x Новатор) и №2032(R20(IR86385-111-1-1-B) x Контакт)); *Saltol* и *SNC* – №2010(R17 x Боярин)).

3.4 Оценка гибридных образцов риса на устойчивость к абиотическим факторам среды

3.4.1 Определение устойчивых к глубоководному затоплению гибридных образцов риса

Способность растений к восстановлению после затопления на различных стадиях развития, известна как устойчивость к глубоководному затоплению или анаэробная устойчивость. Подобная устойчивость связана с рядом факторов и процессов, происходящих в организме, таких как: высокий начальный уровень углеводов, повышенное содержание хлорофилла, минимальные темпы роста в условиях затопления. Данное свойство является генетически детерминированным и проявляется под воздействием множества неконтролируемых факторов окружающей среды (Костылев и др., 2022).

В целях оценки устойчивости к затоплению у риса разработаны специальные методики, такие как метод регенерации проростков (Xu, Mackill, 2006) и метод появления всходов (Yamauchi, Winn, 1999). Благодаря наличию обширных генетических ресурсов риса есть

возможность, провести отбор перспективных генотипов с желаемыми характеристиками устойчивости к затоплению.

В рамках контроля наследования генов устойчивости к глубоководному затоплению провели оценку гибридных генотипов риса в условиях анаэробного прорастания посредством проращивания семян в пробирках под слоем воды. Динамику роста контролировали на 5–е, 7–е, 9–е, 12–е и 14–е сутки (рисунок 49).

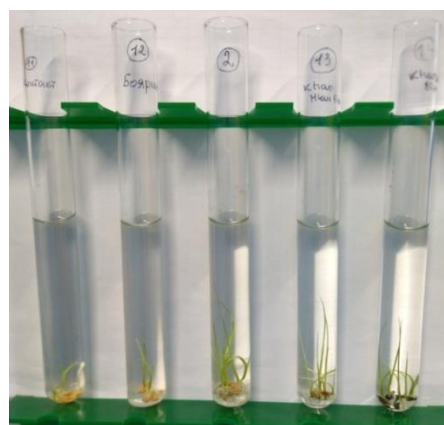
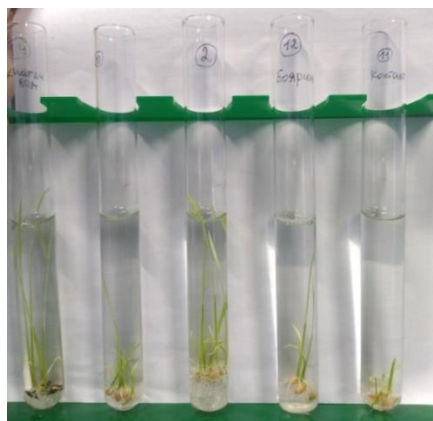
*a**б**в**г*

Рисунок 49 – Проращивание зерен риса в условиях водного стресса

Примечание: *a* – 5-е сутки проращивания, *б* – 7-е сутки, *в* – 9-е сутки, *г* – 14-е сутки

Всхожесть у семян 386 отобранных гибридных образцов варьировала от 80 до 100%. При анаэробном прорастании на 5 сутки большинство изучаемых образцов (71%) имели среднюю длину ростка от 0,1 до 2,0 см,

только 6% обладали максимальной средней длиной ростков от 3,0 до 4,0 см (рисунок 50).

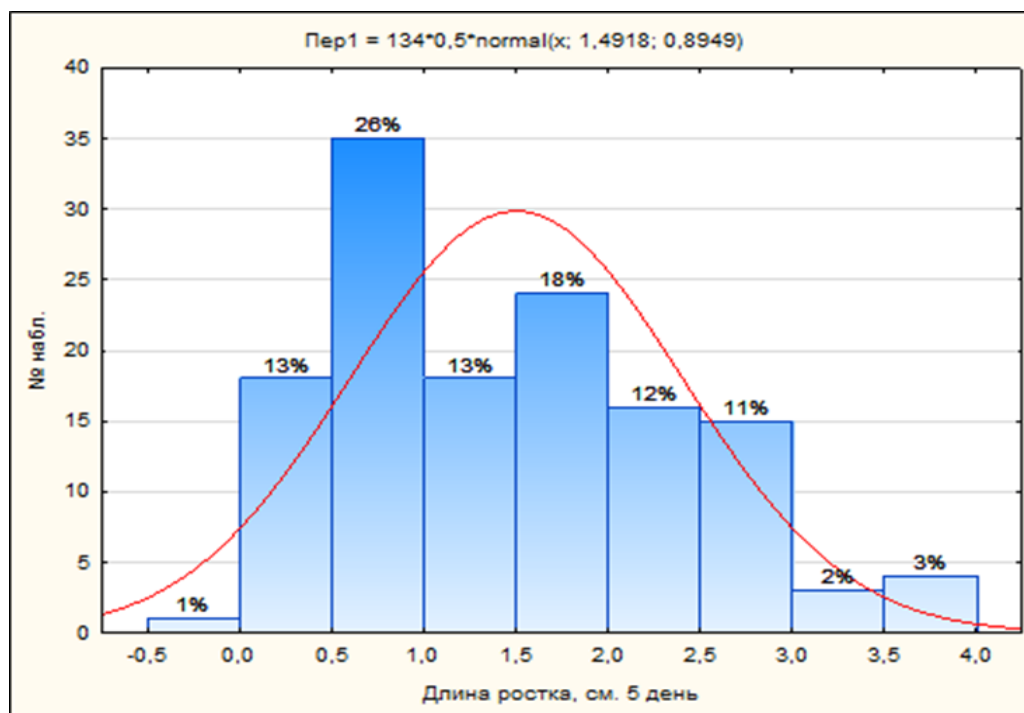


Рисунок 50 – Распределение сортов и линий риса по средней длине проростка при анаэробном прорастаннии

Максимальное значение средней длины ростка в интервале от 3,0 до 4,0 см наблюдали у 14 линий, что составляет 5%: №346((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), №873(KD(Khan Dan) x Боярин), №1665(Swarna x Новатор), №347, №348((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), №1334((BR–11 x Новатор) x Кубань–3), №4178(BR–11 x Кубань–3), №4144(Swarna x Новатор), №4215(Inbara–3 x Новатор), №4335(TDK–1 x Новатор), №4171/1(CR-1009 x Новатор) x Магнат), №1336((BR–11 x Новатор) x Кубань–3), №1176((Inbara–3 x Новатор) x Контакт) и №1337((BR–11 x Новатор) x Кубань–3). Большинство образцов не имели корней. Только у трех линий был обнаружен проросший корешок, его длина составила от 2–3 мм.

Известно, что при аноксии проросток риса удлиняет междоузлие и формирует в первую очередь росток более длинный, чем при аэробном прорастаннии, этим и обуславливается незначительное развитие или отсутствие корешка у большинства растений риса. В процессе исследования

39 гибридов риса слабо проросли в пробирках, от 0,1 до 0,5 см, что связано с действием гена *Sub1A*.

По данным изменения величины прироста образцов можно судить о наличии или отсутствии гена *Sub1A*. Через 2 дня, т.е. на 7 день роста в пробирках длина проростка у образцов варьировала от 0,9 до 6,4 см, в среднем – 2,2 см (рисунок 51).

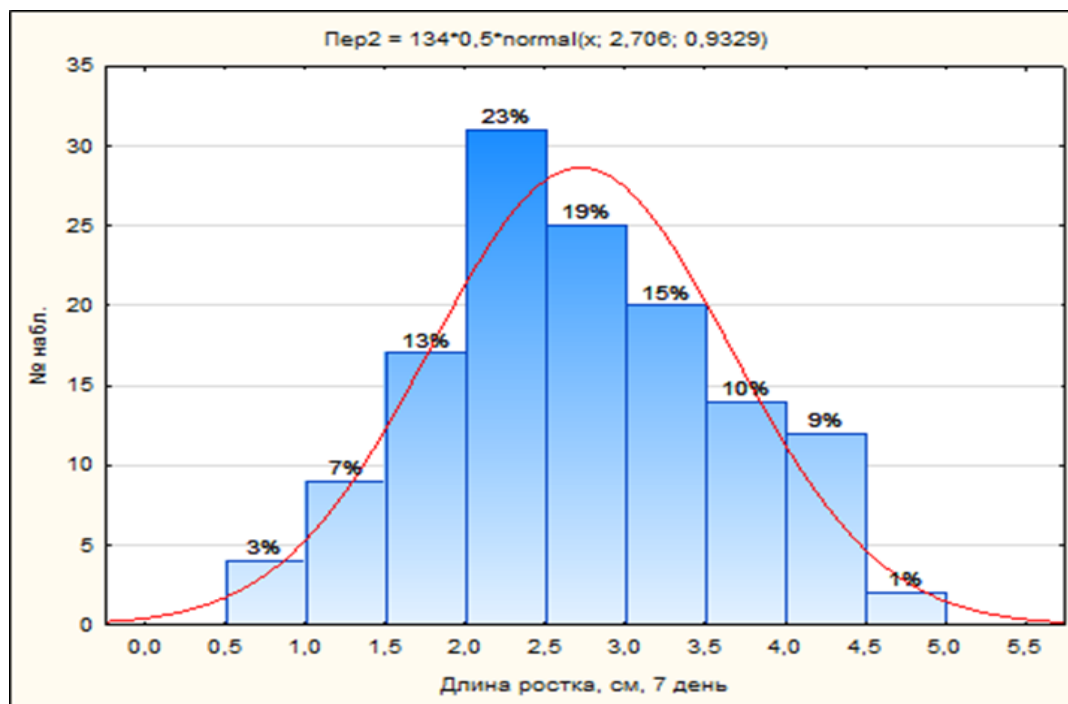


Рисунок 51 – Распределение сортов и линий риса по средней длине проростка при анаэробном прорастании на 7 день

Минимальный прирост длины проростка (0,2–0,5 см) был отмечен у образцов: №1177((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), №3137(Inbara–3 x Степняк), №2407(Бахус x Inbara–3), №1337(BR–11 x Новатор) x Кубань–3), №1176((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), №767(Inbara–3 x Контакт). У большинства из них в родословной имеется сорт Inbara–3, несущий в своем генотипе ген *Sub1A*.

На 9–ый день длина проростка варьировала от 1,4 до 8,6 см, в среднем 3,4 см. Наименьшая длина (1,4–2,2 см) отмечена у 9 образцов: №766(Inbara–3 x Контакт); №3137(Inbara–3 x Степняк); №2407(Бахус x Inbara–3); №111(Боярин x BR–11); №4147(Inbara–3 x Новатор); №4243((BR–11 x

Новатор) х (Бахус х Боярин)); №4402 (Kharsu 80А х Контакт); №4401(Kharsu 80А х Контакт); №4212(Inbara–3 х Новатор) (рисунок 52).

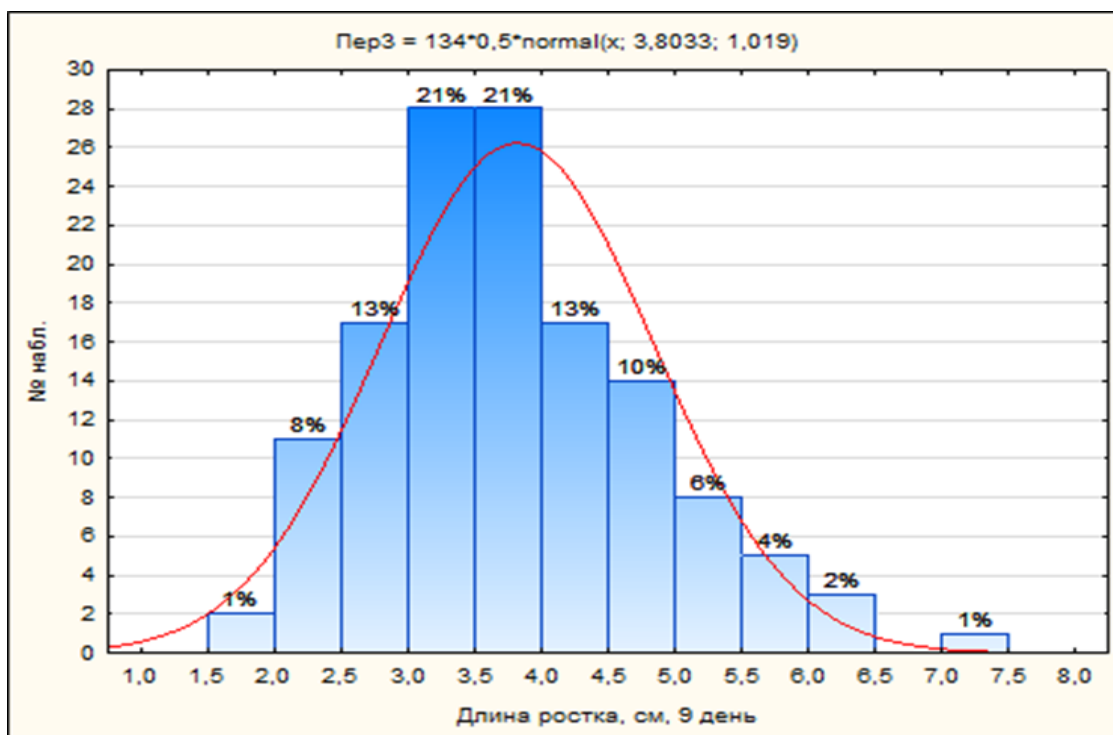


Рисунок 52 – Распределение сортов и линий риса по средней длине проростка при анаэробном прорастании на 9 день

Гибридные образцы, в количестве 53 шт., имели длину проростка до 3 см. Часть гибридов слабо формировали хлорофилл (т.е. были альбиносными) имели беловатую окраску проростков. Чтобы они не погибли, уровень воды был снижен до 1 см, что положительно повлияло на их дальнейший рост и развитие. В их клетках активизировались аэробные процессы, нормализовался синтез ауксинов и гиббереллинов, в результате чего растения продолжили нормальный рост. На 12–ые сутки длина проростка у образцов варьировала от 1,6 до 13,2 см, в среднем 4,8 см (рисунок 53).

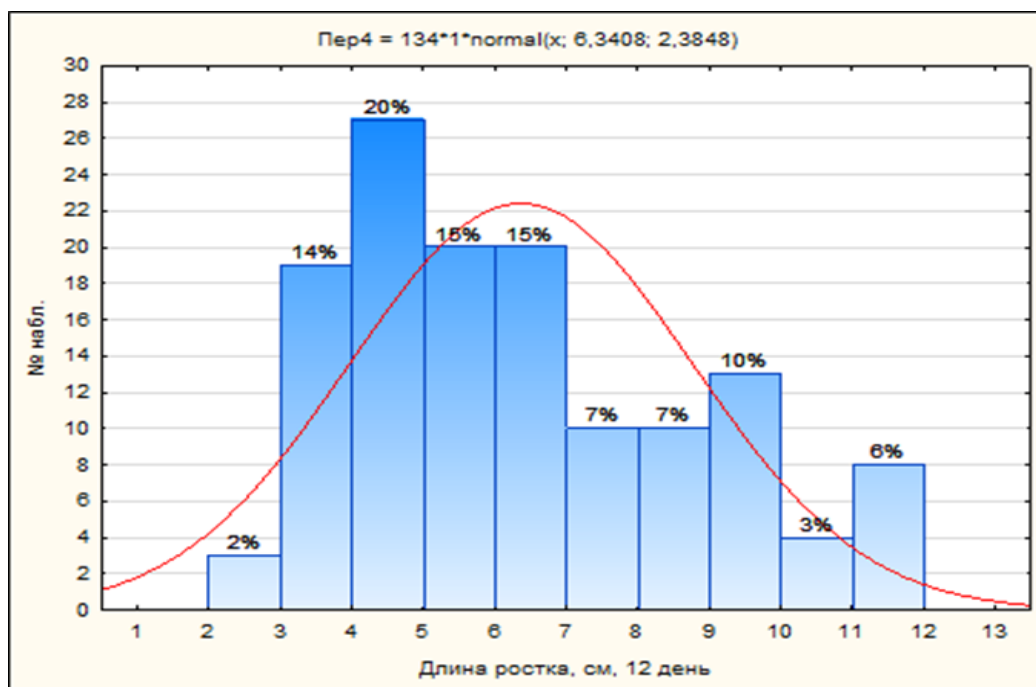


Рисунок 53 – Распределение сортов и линий риса по средней длине проростка при анаэробном прорастании на 12 день

Преобладали образцы с длиной 3–7 см, их было 64%. Около 6% гибридов быстро росли и преодолели слой воды в пробирке, выйдя на воздух. Это такие гибридные комбинации, как №4351 (Контакт x Khao Hlan On), №1191 ((Inbara–3 x Контакт) x (Khao Hlan On x Кубояр), №4798(Kharsu 80A x Контакт), №4794(Kharsu 80A x Контакт); №4351(Контакт x Khao Hlan On), №4374(Кубояр x Kharsu 80A), №4396(Kharsu 80A x Контакт), №4395(Kharsu 80A x Контакт), №4784(Khao Hlan On x Кубояр), №4792(Kharsu 80A x Контакт), №4398(Kharsu 80A x Контакт), №4773(Кубояр x Kharsu 80A), №4787(Khao Hlan On x Кубояр), №4786(Khao Hlan On x Кубояр). Длина их coleoptile составила 11,3; 11,3; 11,3; 11,3; 11,4; 11,5; 12,2; 11,5; 11,9; 12,0; 12,0; 12,6; 12,6 и 13,2 см, соответственно. По данным изменения величины прироста длины coleoptile у гибридов можно судить о наличии или отсутствии гена *SNORKEL* и *AG*.

Через 2 недели средняя длина проростков составила 6,2 см, варьируя от 1,8 до 18,5 см. Самым высокорослым оказался образец №4402(Kharsu

80А x Контакт) – 18,5 см, а низкорослым №4262((BR–11 x Новатор) x Боярин) – 1,8 см (рисунок 54).

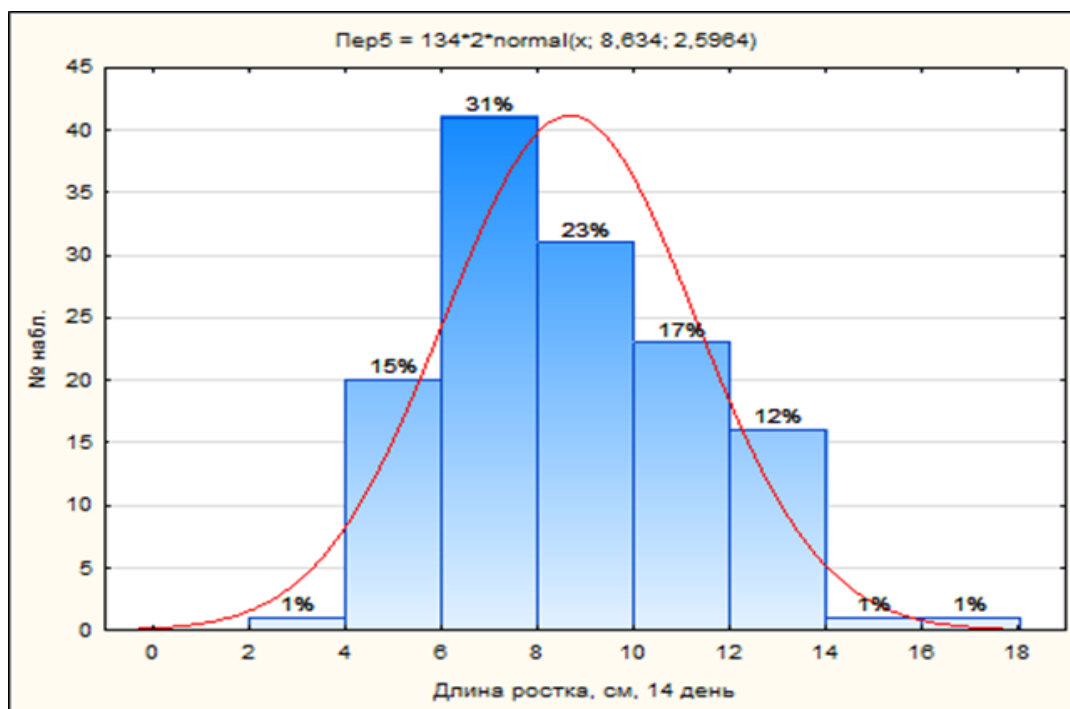


Рисунок 54 – Распределение сортов и линий риса по средней длине проростка при анаэробном прорастании на 14 день

В результате проведенного исследования коллекционные сорта отечественной селекции Контакт, Боярин, Новатор, Магнат, Степняк, Кубань–3, Бахус, Южанин, Кубояр и Командор, а также некоторые гибриды, которые унаследовали от доноров гены *Sub1A*, значительно отставали в росте. Для примера на рисунке 55 представлены значения длины проростка некоторых гибридных и родительских образцов.

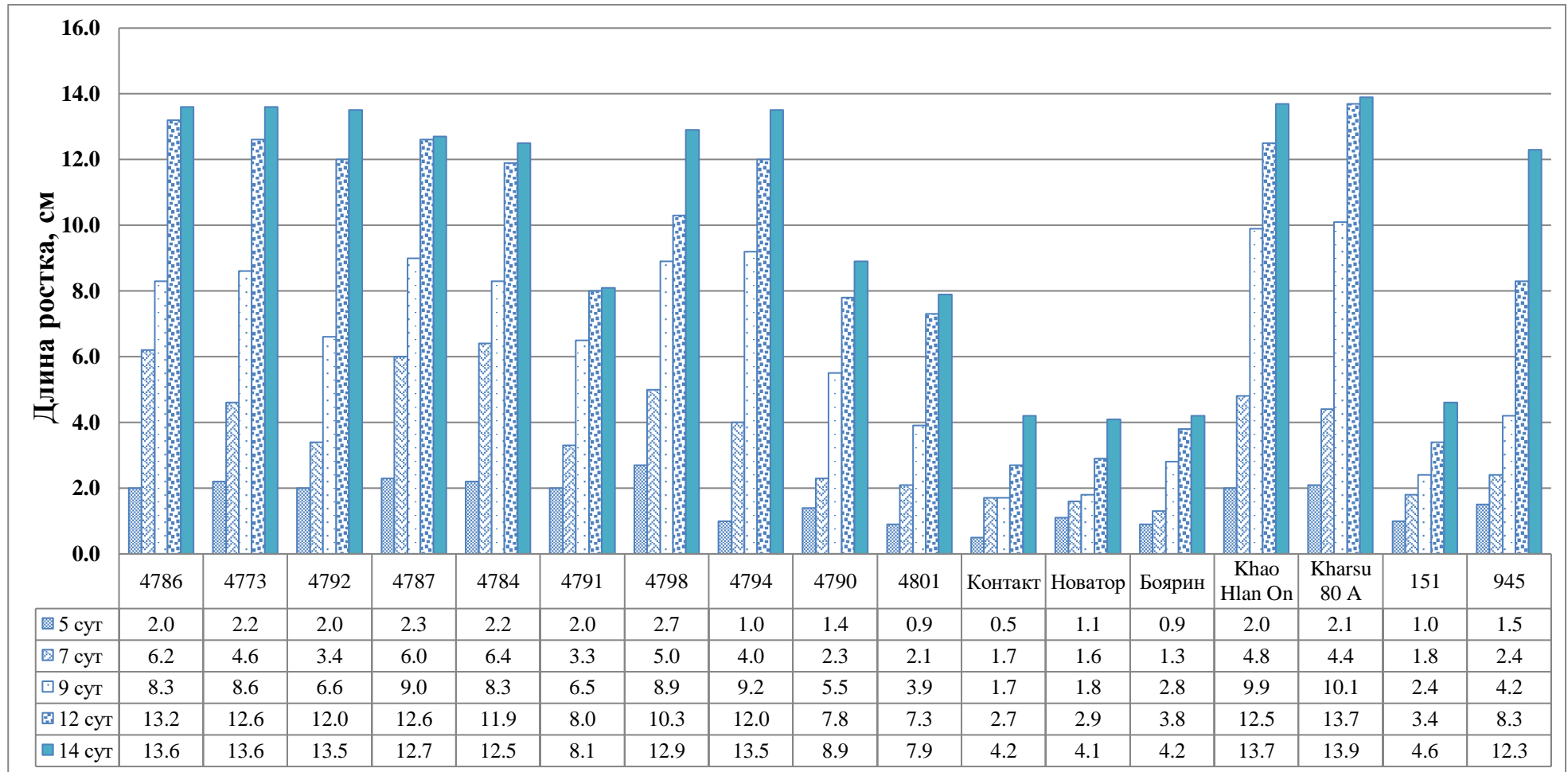


Рисунок 55 – Динамика роста растений риса в условиях затопления

Так, например на 14 сутки гибриды №4786(Khao Hlan On x Кубояр), №4773(Кубояр x Kharsu 80A), №4792(Kharsu 80A x Контакт), №4794(Kharsu 80A x Контакт) имели длину проростка примерно такую же, как у донорных сортов Khao Hlan On и Kharsu 80A, при этом по результатам молекулярно–генетического исследования они унаследовали доминантные аллели генов *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2*. В ходе эксперимента были выявлены образцы риса, демонстрирующие сопоставимые значения длины coleoptиле с донорными растениями. Значение коэффициента вариации всех отобранных гибридных образцов по показателю динамики роста составило 69,7% на 5 сутки, 39,6% на 7, 44,4% на 9, 50,6% на 12 и 50,9% на 14 (таблица 9).

Таблица 9 – Статистические показатели динамики роста гибридных образцов риса

Статистические показатели	Динамика пророста				
	Время проращивания, день				
	5	7	9	12	14
\bar{x} , см	1,2	2,2	3,4	4,8	6,2
Max, см	2,2	3,2	5,1	8,4	8,6
s, см	0,8	0,9	1,5	2,4	3,1
C_v , %	69,7	39,6	44,4	50,6	50,9

Следует заметить, что гибридный материал отличался неоднородностью, поэтому есть возможность отбора лучших образцов по динамике роста и наличием генов устойчивости к глубоководному затоплению.

3.4.2 Определение солеустойчивых гибридных образцов риса

Тестирование генотипов на толерантность к засолению в ранние стадии развития является эффективным и широко распространённым методом, основанным на простых критериях оценки. Исследования показали, что в начальной фазе вегетации длина корневой системы, стебля и всхожесть семян могут служить потенциальными индикаторами устойчивости к

воздействию повышенной концентрации соли (Ali et al., 2014; Mardani et al., 2014).

Проведен опыт по выявлению толерантных и неустойчивых к хлоридному засолению образцов риса. Анализ всхожести контрольных образцов выращенных в дистиллированной воде не выявил достоверных отличий между изученными гибридами. Всхожесть составила от 93 до 100%, в среднем 98%. В качестве примера в таблице 10 представлены показатели всхожести некоторых гибридных образцов.

Таблица 10 – Показатели всхожести образцов риса через 14 дней прорастания в условиях хлоридного засоления (1% NaCl)

№	Название комбинации	Всхожесть, %		
		Контроль	Опыт	О/К, %
1	Контакт	100	80	80
2	Новатор	97	80	82
3	Боярин	96	83	86
4	R17(IR86385)	97	85	88
5	IR527132B	97	85	88
6	IR74099	97	85	88
7	FL-478	97	83	86
1647	(IR52713 x Новатор) x Контакт	100	85	85
1650	(IR52713 x Новатор) x Контакт	100	80	80
1956	IR74099 x Контакт	100	80	80
1957	IR74099 x Контакт	93	80	86
1961	(IR52713 x Новатор) x Контакт	97	85	88
2032	R26(IR86385) x Контакт	100	80	80
2363	R20(IR86385) x Контакт	100	85	85
2517	FL-478 x Контакт	95	80	84
3137	IR52713 x Новатор	100	80	80
2525	(Pokkali x Новатор) x Аметист	97	80	82
2723	(Pokkali x Новатор) x Аметист	100	80	80
2767	IR74099 x Новатор	97	65	67
2770	IR74099 x Новатор	100	85	85
2776	IR52713 x Новатор	97	80	82
2861	IR52713 x Новатор	100	85	85
2863	IR52713 x Новатор	95	80	84

Анализ ростовых характеристик у контрольных образцов показал незначительное варьирование, так максимальное значение длины ростка составило 12,7 см у зарубежного сорта IR74099, а минимальное 8 см –

№2769(IR74099 х Новатор) и №2773(IR74099 х Новатор); максимальное значение длины корня составило 12,9 см – №1644((IR52713 х Новатор) х Айсберг), а минимальное 8,1 см – №1955(IR74099 х Контакт) (таблица 11).

Таблица 11 – Изменчивость признака длина ростка и длина корня через 14 дней прорастания в условиях хлоридного засоления (1% NaCl)

№	Название комбинации	Длина ростка, см			Длина корня, см		
		Контр.	Опыт	О/К, %	Контр.	Опыт	О/К, %
1	Контакт	8,4±1,2	3,4±1,3	40,5	9,6±1,7	2,9±1,3	30,2
2	Новатор	8,1±1,2	3,3±1,4	39,5	10,2±2,1	3,1±1,2	30,4
3	Боярин	9,7±2,3	3,5±1,3	36,1	11,1±1,9	3,2±1,1	28,8
4	R17(IR86385)	10,8±1,8	6,0±1,3	55,6	10,9±1,5	3,6±2,1	33,0
5	IR527132B	9,9±1,9	6,6±1,2	66,7	10,2±1,4	3,5±2,2	34,3
6	IR74099	12,7±1,6	5,7±1,2	44,9	11,9±1,7	3,4±2,1	28,6
7	FL-478	11,9±1,4	6,9±1,4	58,0	11,4±1,6	3,4±2,1	29,8
1647	(IR52713 х Новатор) х Контакт	10,0±1,3	5,0±1,4	50,0	8,6±1,6	3,5±2,1	40,7
1650	(IR52713 х Новатор) х Контакт	11,2±1,0	4,6±1,8	41,1	9,8±2,7	3,3±2,2	33,7
1956	IR74099 х Контакт	10,1±1,7	6,7±1,2	66,3	8,7±1,3	3,3±2,2	37,9
1957	IR74099 х Контакт	8,7±1,0	5,5±1,3	63,2	8,5±1,9	4,2±2,1	49,4
1961	(IR52713 х Новатор) х Контакт	9,1±2,8	4,6±1,6	50,5	8,8±2,9	3,2±1,4	36,4
2032	R26 х Контакт	9,7±1,3	5,9±1,3	60,8	8,5±1,7	4,4±2,1	51,8
2363	R20х Контакт	9,3±2,0	5,1±1,4	54,8	10,2±2,0	4,1±1,8	40,2
2517	FL-478 х Контакт	9,6±1,7	4,9±1,4	51,0	11,9±3,1	3,4±2,1	28,6
3137	IR52713 х Новатор	9,0±2,0	5,8±1,5	64,4	9,2±2,7	4,3±2,1	46,7
2525	(Роккалi х Новатор) х Аметист	10,7±2,1	5,3±1,7	49,5	8,9±2,3	4,3±2,1	48,3
2723	(Роккалi х Новатор) х Аметист	10,6±2,1	4,7±1,5	44,3	10,6±2,3	4,4±1,9	41,5
2767	IR74099 х Новатор	11,1±1,1	6,1±1,8	55,0	8,5±1,4	4,6±2,2	54,1
2770	IR74099 х Новатор	9,4±0,9	4,8±1,4	51,1	10,6±1,4	3,3±1,2	31,1
2776	IR52713 х Новатор	9,6±2,0	5,1±1,2	53,1	8,9±1,6	4,5±2,1	50,6
2861	IR52713 х Новатор	10,8±1,8	4,9±1,6	45,4	8,5±1,5	3,4±1,2	40,0
2863	IR52713 х Новатор	10,9±2,6	4,7±1,2	43,1	9,4±1,7	3,3±1,1	35,1

Анализ ростовых характеристик при проращивании риса в 1% растворе NaCl показал значительное варьирование в зависимости от генотипа. Так длина растения у гибридных линий варьировала от 22,8% (№1648(IR52713 х Новатор) х Контакт) до 66,3% (№1956(IR74099 х Контакт)), относительно

контроля. Наибольшее снижение длины корня в сравнении с контрольными значениями наблюдалось у №2362(R20 x Контакт), почти на 52%, что соответствует результатам молекулярно–генетического анализа, а у остальных гибридных комбинаций и родительских линий в среднем на 30%. Наилучшими показателями длины проростка при 1% засолении характеризовались зарубежные сорта, такие как R17 (6,0±1,3 см), IR52713 (6,6±1,2 см) и FL–478 (6,9±1,4 см), а у гибридных комбинаций лучшими были №1957(IR74099 x Контакт) (6,7±1,2 см), №2767(IR74099 x Новатор) (6,1±1,8 см), №2032(R26 x Контакт) (5,9±1,3 см) и №3137 (IR52713 x Новатор) (5,8±1,5 см), в которых идентифицировали гены *Saltol* и *SKC1*. Отечественные сорта (Контакт, Новатор и Боярин) по ростовым характеристикам проростка и корня, значительно отставали от донорных сортов.

Иные результаты были получены при исследовании действия NaCl в концентрации 1,5% на селекционные образцы риса. Повышение концентрации соли до 1,5% достоверно снижало всхожесть семян и интенсивность роста проростков. Всхожесть варьировала от 40 до 75%, в среднем 59% (таблица 12).

Таблица 12 – Показатели всхожести образцов риса через 14 дней прорастания в условиях хлоридного засоления (1,5% NaCl)

№		Всхожесть, %		
		Контроль	Опыт	О/К, %
1	Контакт	100	75	75
2	Новатор	97	75	77
3	Боярин	96	73	76
4	R17	97	75	77
5	IR52713	97	75	77
6	IR74099	97	75	77
7	FL–478	97	73	75
3143	IR52713 x Новатор	100	70	70
1657	(IR52713 x Новатор) x Контакт	100	75	75
1656	IR74099 x Контакт	97	70	72
1656	IR74099 x Контакт	97	70	72
1658	IR74099 x Контакт	97	70	72

Продолжение таблицы 12

1955	IR74099 x Контакт	100	70	70
1956	IR74099 x Контакт	100	70	70
2032	R20(IR86385) x Контакт	100	70	70
2517	FL-478 x Контакт	95	70	73
3137	IR52713 x Новатор	100	70	70
2723	(Pокkali x Новатор) x Аметист	100	70	70
2767	IR74099 x Новатор	97	75	77
2770	IR74099 x Новатор	100	75	75
2776	IR52713 x Новатор	97	70	72
2861	IR52713 x Новатор	100	75	75
2863	IR52713 x Новатор	95	70	73

Анализ морфологических признаков, связанных с ростом, выявил существенные различия в зависимости от генетической принадлежности. Длина проростков относительно контроля варьировала от 12,9% у №1648((IR52713 x Новатор) x Контакт) до 36,4% у зарубежного сорта IR52713. Лучшие показатели длины ростка были у солеустойчивого сорта IR52713 ($3,6 \pm 0,2$ см), а также у гибридных линий – №3143(IR52713 x Новатор) ($3,3 \pm 0,3$ см), №2767(IR74099 x Новатор) ($3,1 \pm 0,8$ см), №2776(IR52713 x Новатор) ($3,1 \pm 0,2$ см) и №1657(IR52713 x Новатор) x Контакт ($3,0 \pm 0,4$ см) (таблица 13).

Таблица 13 – Изменчивость признака длина ростка и длина корня через 14 дней прорастания в условиях хлоридного засоления (1,5% NaCl)

№	Название комбинации	Длина ростка, см			Длина корня, см		
		Контр.	Опыт	О/К, %	Контр.	Опыт	О/К, %
1	Контакт	$8,4 \pm 1,2$	$1,4 \pm 0,3$	16,7	$5,6 \pm 1,7$	$0,1 \pm 0,1$	1,8
2	Новатор	$8,1 \pm 1,2$	$1,3 \pm 0,4$	16,0	$10,2 \pm 2,1$	$0,1 \pm 0,2$	1,0
3	Боярин	$9,7 \pm 2,3$	$1,5 \pm 0,3$	15,5	$11,1 \pm 1,9$	$0,2 \pm 0,1$	1,8
4	R17(IR86385)	$10,8 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,3$	27,8	$10,9 \pm 1,5$	$0,6 \pm 0,1$	5,5
5	IR52713	$9,9 \pm 1,9$	$3,6 \pm 0,2$	36,4	$10,2 \pm 1,4$	$0,5 \pm 0,2$	4,9
6	IR74099	$12,7 \pm 1,6$	$2,7 \pm 0,2$	21,3	$11,9 \pm 1,7$	$0,4 \pm 0,2$	3,4
7	FL-478	$11,9 \pm 1,4$	$2,9 \pm 0,4$	24,4	$11,4 \pm 1,6$	$0,4 \pm 0,1$	3,5
3143	IR52713 x Новатор	$9,6 \pm 1,8$	$3,3 \pm 0,3$	34,4	$8,6 \pm 1,2$	$0,5 \pm 0,1$	5,8
1657	(IR52713 x Новатор) x Контакт	$10,0 \pm 1,3$	$3,0 \pm 0,4$	30,0	$8,6 \pm 1,6$	$0,5 \pm 0,1$	5,8
1656	IR74099 x Контакт	$8,8 \pm 1,3$	$3,0 \pm 0,3$	34,1	$9,0 \pm 1,5$	$0,6 \pm 0,1$	6,7
1656	IR74099 x Контакт	$11,5 \pm 1,3$	$2,9 \pm 0,3$	25,2	$8,2 \pm 1,7$	$0,3 \pm 0,2$	3,7
1658	IR74099 x Контакт	$10,9 \pm 2,5$	$2,8 \pm 0,3$	25,7	$8,2 \pm 2,1$	$0,3 \pm 0,1$	3,7

Продолжение таблицы 13

1955	IR74099 x Контакт	9,2±1,6	2,7±0,2	29,3	7,1±1,2	0,3±0,2	4,2
1956	IR74099 x Контакт	10,1±1,7	2,7±0,2	26,7	4,7±1,3	0,3±0,2	6,4
2032	R20x Контакт	9,7±1,3	2,9±0,3	29,9	7,5±1,7	0,4±0,1	5,3
2517	FL-478 x Контакт	9,6±1,7	2,9±0,4	30,2	11,9±3,1	0,4±0,1	3,4
3137	IR52713 x Новатор	9,0±2,0	2,8±0,5	31,1	9,2±2,7	0,3±0,1	3,3
2723	(Pookali x Новатор) x Аметист	10,6±2,1	2,7±0,5	25,5	10,6±2,3	0,4±0,1	3,8
2767	IR74099 x Новатор	11,1±1,1	3,1±0,8	27,9	8,5±1,4	0,4±0,2	4,7
2770	IR74099 x Новатор	9,4±0,9	2,8±0,4	29,8	10,6±1,4	0,3±0,2	2,8
2776	IR52713 x Новатор	9,6±2,0	3,1±0,2	32,3	7,9±1,6	0,5±0,1	6,3
2861	IR52713 x Новатор	10,8±1,8	2,9±0,6	26,9	8,5±1,5	0,2±0,1	2,4
2863	IR52713 x Новатор	10,9±2,6	2,7±0,2	24,8	7,4±1,7	0,3±0,1	4,1

Следует отметить, что гибридные линии №3143 и 1657 унаследовали гены солеустойчивости *Saltol* и *SKC1*, №2767 – *Saltol*, №2776 – *SKC1*. При наличии двух генов существенной разницы по ростовым характеристикам не наблюдали.

Длина корешков, как у родительских, так и гибридных образцов была низкой от 0,1 до 0,6 см. Отечественные сорта (Контакт, Новатор и Боярин) по ростовым характеристикам проростка и корня значительно отставали от донорных сортов и гибридов с генами устойчивости к хлоридному засолению.

3.5 Создание дигаплоидных генотипов риса с помощью метода андрогенеза *in vitro*

3.5.1 Получение дигаплоидов риса с генами глубоководного затопления

Одним из способов ускорения селекционного процесса является андрогенез *in vitro*, который позволяет получить гомозиготные линии от гибридов второго поколения. Особенности андрогенеза в гибридных комбинациях риса изучались при культивировании пыльников, на

оптимизированной по уровню гормонов для наших генотипов, индукционной среде Блейдса.

Из 26 комбинаций скрещивания отобрали 69 гибридных метелок риса. Выделили и пассировали на питательную среду 12604 пыльника. Максимальное количество пыльников было высажено в комбинации №5029 ((CR–1009 x Новатор) x Контакт) – 990 шт., а минимальное – №4526(Inbara–3 x Новатор) – 80 шт. (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты культивирования пыльников риса

№ образца	Гибридная комбинация	Количество отобранных растений, шт.	Инокулировано пыльников, шт.	Количество каллусов, шт.	Количество морфогенных каллусов, шт.
5022	TDK–1 x Новатор	3	610	4	0
5103	TDK–1 x Новатор	3	614	22	4
5007	(Inbara–3 x Новатор) x Контакт	3	480	0	0
5005	(CR–1009 x Новатор) x Контакт	3	610	38*	3
5029	(CR–1009 x Новатор) x Контакт	4	990	2	0
5006	(Inbara–3 x Новатор) x Контакт	3	586	0	0
5093	CR–1009 x Контакт	3	548	1	0
5019	TDK–1 x Новатор	3	666	12	4
5003	(BR–11 x Новатор) x (Бахус x Боярин)	2	564	1	0
5009	(Inbara–3 x Новатор) x Контакт	3	609	96*	17*
5010	(Inbara–3 x Новатор) x Контакт	2	460	94*	7*
5011	(IR74099 x Новатор) x (CR–1009 x Новатор)	2	457	0	0
5008	(Inbara–3 x Новатор) x Контакт	3	549	24	0
5020	TDK–1 x Новатор	3	500	39*	11*
5018	TDK–1 x Новатор	3	727	29*	4
4565	IR–64 x Магнат	3	522	134*	6*
4773	Кубояр x Kharsu 80A	3	220	5	0
5016	TDK–1 x Новатор	3	675	1	0
4758	Контакт x Khao Hlan On	1	209	4	2
5021	TDK–1 x Новатор	3	500	65*	27*
4641	(Inbara–3 x Контакт) x Khao Hlan On	2	387	74*	22*
5017	TDK–1 x Новатор	3	501	48*	7*
4526	Inbara–3 x Новатор	1	80	10	7*
4688	BR–11 x Новатор	3	259	0	0
4617	Inbara–3 x Контакт	1	83	1	0
4585	BR–11 x Новатор	2	198	0	0

Продолжение таблицы 14

Σ	69	12604	704	127
\bar{x}	–	484,8	27,1	4,9
s	–	208,7	36,9	7,2

Примечание: * – достоверное отличие от среднего значения при $p < 0,05$

Образование каллусов началось на 30–33-й день с момента посадки пыльников на питательную среду. Величина каллусообразования в культуре пыльников значительно варьировала, как между гибридными комбинациями, так и у растений из одной гибридной комбинации, что обусловлено, по-видимому генотипическими различиями, а также действием внешних факторов (качество экспланта, условия культивирования и т.д.). Всего было получено 704 каллусов, в среднем 10 шт. на растение, с учетом неотзывчивых.

По отзывчивости к новообразованиям 1/3 объема растений (21 шт.), показали положительный результат, 29 метелок – не образовали каллусов. Самыми отзывчивыми к формированию каллусов являлись гибридные комбинации №5009((Inbara–3 x Новатор) x Контакт) – 96 шт., №5010((Inbara–3 x Новатор) x Контакт) – 94 шт., №4565 (IR–64 x Магнат) – 134 шт., №4641((Inbara–3 x Контакт) x Khao Hlan On) – 74 шт., №5021(TDK–1 x Новатор) – 65 шт. У этих же образцов проявилась способность к морфогенезу, остальные комбинации образовали неморфогенный каллус (в отдельных случаях до 100%). Комбинации №5007((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), №5006((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), №5011(IR74099 x Новатор) x (CR–1009 x Новатор), №4688(BR–11 x Новатор) и №4585(BR–11 x Новатор) показали полное отсутствие реакции на культивирование *in vitro*. Образовавшиеся каллусные структуры переносили на регенерационную среду, оптимизированную по гормонам под генотипы отечественной селекции.

Из сформированных каллусов при культивировании на регенерационной среде развивались зеленые проростки и альбиносы, также

были отмечены структуры, развивающиеся по типу ризогенеза, и структуры с отсутствием развития (рисунок 56).



Рисунок 56 – Зеленые и альбиносные растения-регенеранты *in vitro*

Способность каллусов к морфогенезу оценивали по регенерации растений. Изучаемые образцы риса сформировали 130 растений-регенерантов по 13-ти гибридным комбинациям. Из них только 30 растений были зелеными. Количество полученных растений-регенерантов, представлено на рисунке 57.

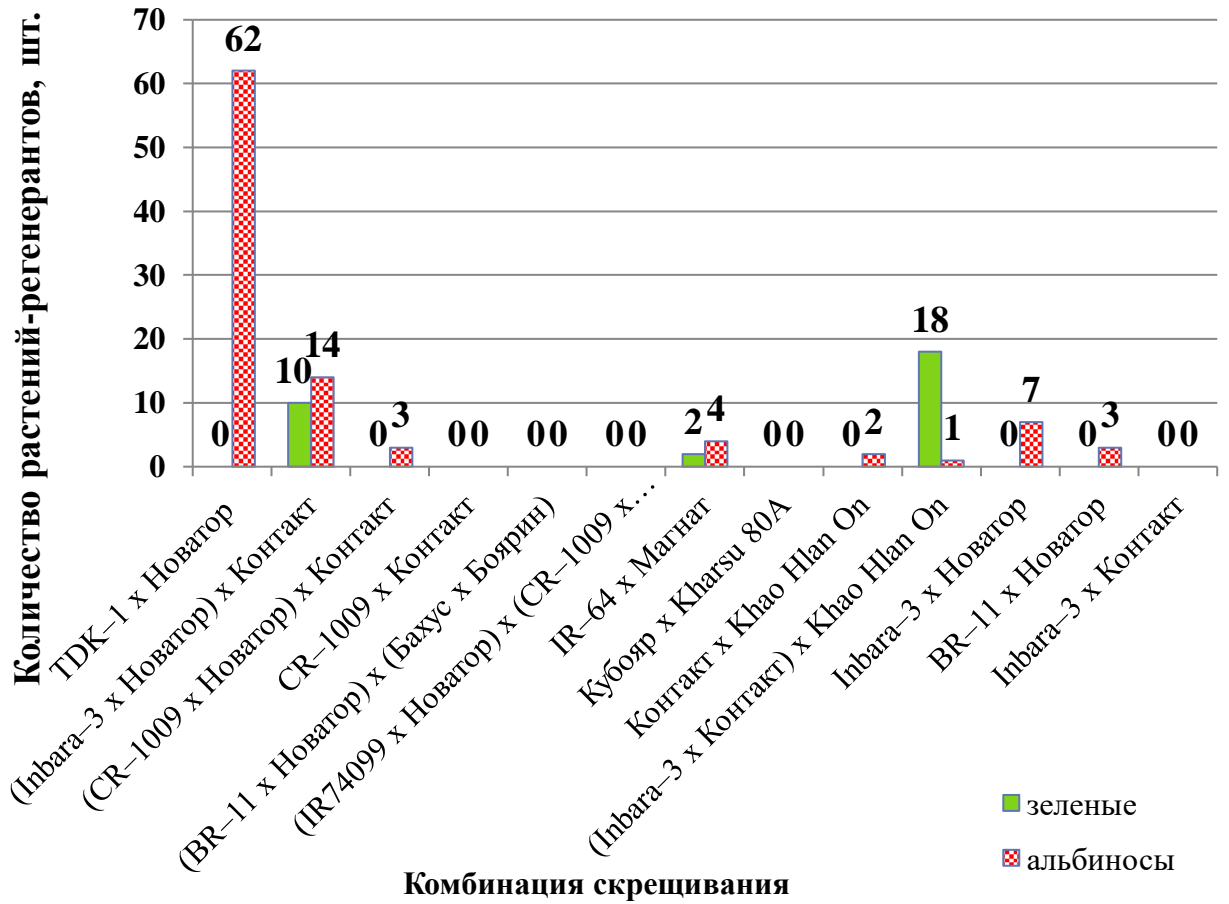


Рисунок 57 – Количество полученных растений–регенерантов

Выделились 4 образца, которые сформировали регенеранты без дефектов хлорофилла в листьях: №5009((Inbara-3 x Новатор) x Контакт) – 5 шт., №5010((Inbara-3 x Новатор) x Контакт) – 5 шт., №4565 – 2шт., №4641((Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On) – 18 шт. Растения альбиносы были летальны и погибли на ранних стадиях развития, так как не имели способности к фотосинтезу. Максимальное количество альбиносов сформировалось у образца №5021(TDK-1 x Новатор) – 27 шт.

В результате оценки эффективности культуры пыльников установлено, что наибольшее число новообразований на 100 культивируемых пыльников наблюдалось у образца №5009/2((Inbara-3 x Новатор) x Контакт), который достоверно превысил среднее значение в опыте (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты эффективности культуры пыльников риса

№ образца	№ растения	Число каллусов/на 100 пыльников	Число всех регенерантов/на 100 пыльников	Число зеленых регенерантов/на 100 пыльников	Число всех регенерантов/на 100 каллусов
5009	2	70,6*	14,3*	4,2*	20,2*
5010	2	33,9	2,5	1,8	7,5
4565	3	43,6	1,5	1,0	3,5
4641	2	35,6	10,8*	9,3*	30,4*
\bar{x}	–	45,9	7,3	4,1	15,4
s	–	17,0	6,3	3,7	12,3

Примечание: * – достоверное отличие от среднего при $p < 0,05$

Морфогенез и способность каллусов формировать проростки, включая зеленые и альбиносные, оценивали по признаку число всех регенерантов на 100 высаженных пыльников. Наибольшее число проростков регенерировало на основе гибридной комбинации №5009/2((Inbara–3 x Новатор) x Контакт), что было достоверно выше среднего значения. В целом, образцы №5009/2((Inbara–3 x Новатор) x Контакт) и №4641/2((Inbara–3 x Контакт) x Khao Nlan On) образовывали больше регенерантов – 14,3 и 10,8 соответственно.

Практический интерес представляют зеленые проростки, поэтому наиболее важным показателем культуры пыльников является признак число зеленых регенерантов на 100 выделенных пыльников. По этому признаку достоверно высокое значение было у образца 4641/2((Inbara–3 x Контакт) x Khao Nlan On) и составило 9,3. Показатели остальных комбинаций находились на уровне среднего.

Для оценки эффективности каллусов регенерировать проростки, определяли число всех регенерантов на 100 каллусов. Максимальное

значение по этому признаку было у гибридной комбинации №4641/2((Inbara–3 x Контакт) x Khao Hlan On). В среднем по генотипам, также хорошая регенерация наблюдалась у образца №5009/2((Inbara–3 x Новатор) x Контакт). Остальные комбинации сформировали проростков меньше, но в пределах среднего по опыту.

Зеленые растения–регенеранты высадили в почву и выращивали до образования семян в оранжерейных условиях (рисунок 58).



Рисунок 58 – Растения–регенеранты в условиях теплицы

У большинства растений риса, полученных путем культивирования пыльников, происходит спонтанное дублирование хромосом (Ahmadi, Ebrahimzadeh, 2020). Это подтверждено в наших исследованиях. Полученные зеленые растения–регенеранты были разделены на 3 группы в зависимости от содержания ядерной ДНК: гаплоиды, удвоенные гаплоиды и тетраплоиды (таблица 16).

Таблица 16 – Содержание ядерной ДНК в популяции регенерантов риса, полученных от гибридов второго поколения в культуре пыльников *in vitro*

Индекс	Гаплоиды	Дигаплоиды	Тетраплоиды
Количество растений, шт.	9	11	5
Содержание ДНК, пг:			
\bar{x}	0,901	1,880	3,762
$\pm SEM$	0,012	0,023	0,048
Max	0,790	1,654	3,590
Min	1,112	2,015	3,960
Cv, %	8,3	9,6	10,0

Все растения в пределах своей группы характеризовались незначительной вариабельностью содержания ДНК в клеточных ядрах. Данные сопоставимы с результатами других авторов, согласно которым содержание ядерной ДНК в основном наборе хромосом у риса *O.sativa* варьирует от 0,91 до 1,00 пг (Ahmadi, Ebrahimzadeh, 2020). Соотношение средних значений содержания ядерной ДНК у дигаплоидов и гаплоидов не было кратным двум. Это может косвенно указывать на потерю некоторых участков хромосом у гаплоидов в процессе культивирования, что приводит к изменениям морфотипа регенерантов.

В общей сложности было получено 25 растений, из которых 11 дигаплоидов, 5 тетраплоидов и 9 гаплоидов. На рисунках 59–60 представлены морфологические признаки метелок и колосков у гаплоидных, дигаплоидных и тетраплоидных растений–регенерантов.

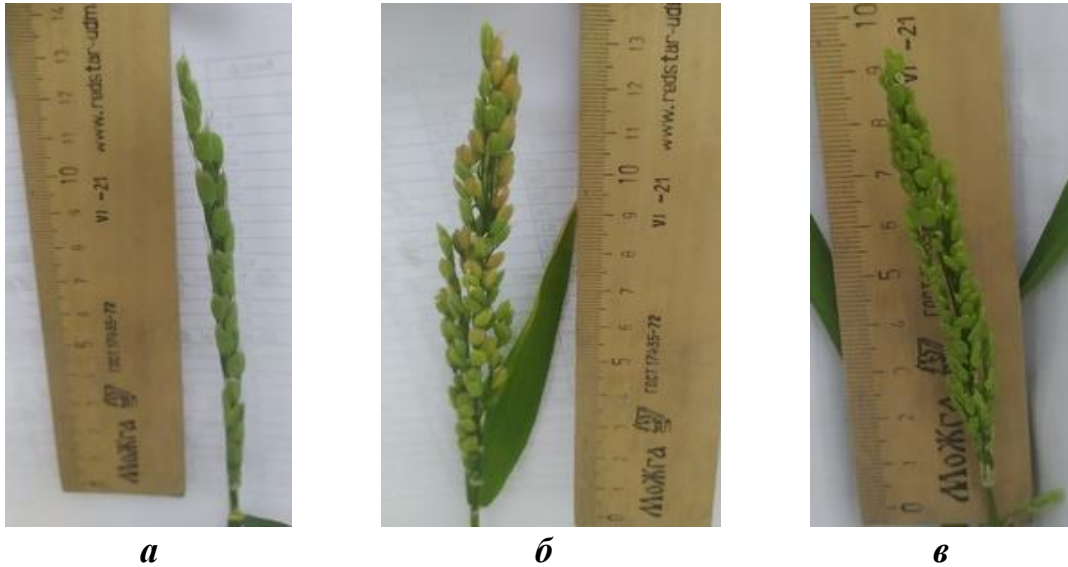


Рисунок 59 – Морфологические признаки метелок и колосков растений–регенерантов риса

Примечание: *a* – тетраплоид; *б* – дигаплоид; *в* – гаплоид

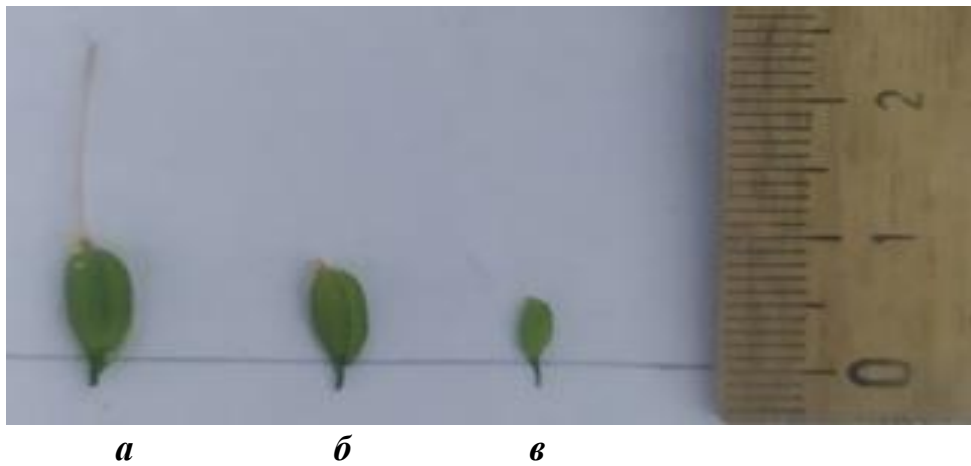


Рисунок 60 – Морфологические признаки колосков растений–регенерантов риса

Примечание: *a* – тетраплоид; *б* – дигаплоид; *в* – гаплоид

Оценку растений–регенерантов риса по уровню ploидности проводили косвенным методом, а именно по комплексу морфологических признаков (Черткова и др., 2022). Растения разделили следующим образом:

- 1) гаплоиды – это растения, которые имели мелкие цветки и пыльники, тонкий и узкий лист, не имели семян;
- 2) дигаплоиды – это растения со средними листьями и хорошо озерненными метелками;

3) тетраплоиды – это растения, которые имели широкий лист, большую метелку с очень крупными цветками, имеющими низкую фертильность, низкая завязываемость зерен.

Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК регенерантного материала риса. Регенерантные линии риса, полученные в культуре пыльников, были оценены с помощью отобранных молекулярных маркеров, идентифицирующих гены *Sub1A*, *SK1,2* и *AG1,2*.

В результате молекулярно-генетических анализов в растениях-регенерантах риса было идентифицировано наличие генов устойчивости к длительному затоплению *Sub1A*. Электрофореграммы идентификации представлены на рисунке 61. Доминантная аллель гена *Sub1A* сорта №1, 17–Inbara–3 визуализировалась в регенерантных растениях под №6, 9, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 31.

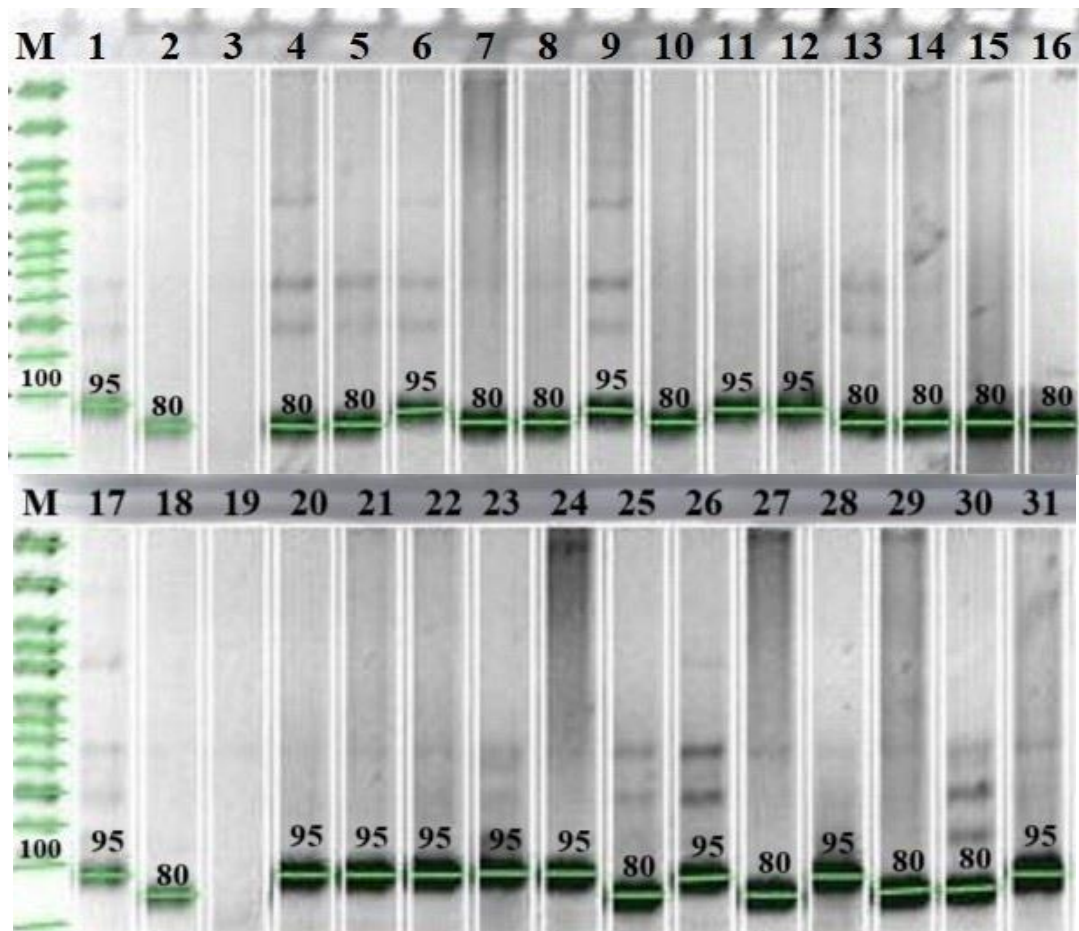


Рисунок 61 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК растений-регенерантов риса с маркером RM7481 (ген *Sub1A*)

М–маркер молекулярного веса (50–1000 пн); №1, 17–Inbara–3 (положительный контроль); №2, 18–Новатор (отрицательный контроль); №3, 19–деионизированная вода (внутренний контроль опыта), №4–16 и №20–31–исследуемые регенерантные образцы риса; №4–4641/2, №5–5010/4, №6–5010/3, №7–4641/3, №8–4641/14, №9–4641/15, №10–4565/1, №11–4565/2, №12–4641/7, №13–5009/1, №14–4641/4, №15–5009/3, №16–5010/6, №20–4641/10, №21–4641/12, №22–4641/8, №23–4641/5, №24–5010/2, №25–4641/9, №26–5010/5, №27–4641/6, №28–5010/1, №29–4641/11, №30–4641/13, №31–5009/2

Результаты молекулярного анализа продемонстрировали наличие доминантной аллели гена *SK1* в 8 регенерантных генотипах №5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 17 и в зарубежном сорте №2, 19–Khao Hlan On. В качестве примера, на рисунке 63 маркер гена *SK1* инициировал амплификацию фрагментов с молекулярной длиной ампликона порядка 743 пн (рисунок 62).

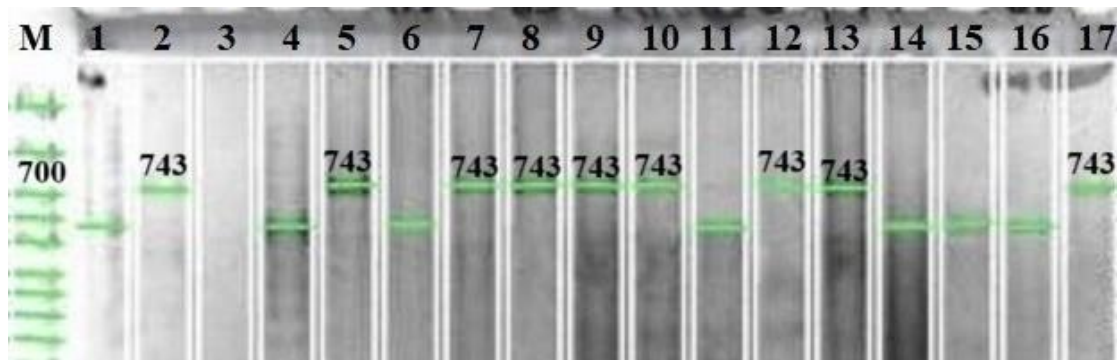


Рисунок 62 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК растений-регенерантов риса с маркером SK1(1F1R) (гена *SK1*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1, 18–Новатор (отрицательный контроль); №2, 19–Khao Hlan On (положительный контроль); №3, 20–деионизированная вода (внутренний контроль опыта); №4, 21–Контакт; №5–17 и №21–33–исследуемые регенерантные образцы риса; №5–4641/14, №7–4641/1, №8–4641/13, №9–4641/3, №10–4641/5, №12–4641/9, №13–4641/8, №17–4641/11

Частота рекомбинации изученных маркеров была менее 5% (RM7481 – 1,2%; SK1(1F1R) – 2,8%), что свидетельствует о сцепленном наследовании данного маркера с признаком. Таблица 17 демонстрирует результаты генотипирования регенерантных форм риса в отношении функциональных

аллелей генов *Sub1A*, *SK1*, *SK2*, *AG1* и *AG2*, ассоциированных с устойчивостью к глубоководному затоплению.

Таблица 17 – Оценка наличия доминантных аллелей генов устойчивости к глубоководному затоплению в регенерантных генотипов риса

Комбинация скрещивания	№ растения	<i>Sub1A</i>	<i>SK1</i>	<i>SK2</i>	<i>AG1</i>	<i>AG2</i>
4641(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	1	+	+	-	+	+
	2	-	-	-	+	+
	3	-	+	-	+	+
	4	-	-	-	+	+
	5	+	+	-	+	-
	6	-	+	-	+	+
	7	+	-	-	+	-
	8	+	+	-	+	+
	9	-	+	-	+	+
	10	+	-	-	+	+
	11	-	+	-	-	-
	12	+	+	-	-	+
	13	-	+	-	-	-
	14	-	+	-	+	-
	15	-	-	-	+	-
5010(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
5009(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	1	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
4565(IR-64 x Магнат)	1	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-

Примечание: «+» донорная аллель; «-» аллель от отечественных сортов.

По данным таблицы видно, что доминантные аллели от зарубежных сортов-доноров идентифицировали в 21 регенерантном растении. При этом два из них (№4641/1(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On и №4641/8(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On), унаследовали аллели генов *Sub1A*, *SK1*, *AG1* и *AG2*, а шесть регенерантных растений 3 аллели (№4641/3, №4641/5, №4641/6, №4641/9, №4641/10, №4641/12).

Семенной материал, полученный от растений регенерантов, был отправлен в лабораторию селекции риса ОП «Пролетарское» для внедрения в селекционный процесс.

3.5.2 Получение дигамлоидов риса с генами солеустойчивости

Из 14 комбинаций скрещивания отобрали 20 гибридных метелок риса. Выделили и пассировали на оптимизированную по уровню гормонов роста питательную среду 15897 пыльников. Максимальное количество пыльников было высажено в комбинации №2864(IR52713 x Новатор) – 1506 шт., а минимальное – №1964((IR52713 x Новатор) x Контакт) – 749 шт. (таблица 18).

Таблица 18 – Результаты культивирования пыльников риса

№	Название комбинации	Количество ПЫЛЬНИКОВ, шт	Количество калусов, шт		Количество растений, шт	
			калус	зеленый калус	альбиносы	зеленые
2361	R17x Боярин	1190*	25	21	7	1
2362	R20x Контакт	1203*	68	12	2	0
2517	FL-478 x Контакт	1430*	0	0	0	0
2525	(Pokkali x Новатор) x Аметист	910	0	0	0	0
2767	IR74099 x Новатор	1456*	7	1	1	1
2769	IR74099 x Новатор	1226*	206*	114*	25	0
1955	IR74099 x Контакт	1254*	178*	53*	8	0
1958	(IR52713 x Новатор) x Контакт	994	375*	155*	14	0
2085	(IR74099 x Новатор) x Контакт	1028	68	16	6	1
2864	IR52713 x Новатор	1506*	0	0	0	0
1954	FL-478 x Контакт	1095	0	0	0	0
2364	R26 x Контакт	987	445*	224*	36	28*
1642	IR52713 x Новатор	869	11	20	2	2
1964	(IR52713x Новатор) x Контакт	749	59	5	0	1
	Σ	15897	1442	621	101	34
	\bar{x}	1135,5	103,0	44,4	7,2	2,4
	s	–	146,2	70,0	10,9	7,4
	Cv	–	70,5	63,4	66,1	32,9

Примечание: * – достоверное отличие от среднего значения при $p < 0,05$

Образование каллусов началось на 30–33-й день с момента посадки пыльников на питательную среду. Величина каллусообразования в культуре пыльников значительно варьировала между гибридными комбинациями, что обусловлено генотипическими различиями, а также качеством экспланта, условиями культивирования, холодной обработкой. В общей сложности было получено 1442 каллуса, из них каллусов с очагами морфогенеза (зеленых) 621 шт. Отзывчивыми к формированию каллусов являлись 10 гибридных комбинаций: №2361(R17 x Боярин); №2362 (R20 x Контакт); №2769(IR74099 x Новатор); №1955(IR74099 x Контакт); №2085((IR74099 x Новатор) x K2495); №1958((IR52713 x Новатор) x Контакт); №2364(R26 x Контакт); №1642(IR52713 x Новатор); №2767(IR74099 x Новатор) и №1964(IR52713 x Новатор) x Контакт) из 14-ти изученных. У образца №1964(IR52713 x Новатор) x Контакт) не проявилось способности к морфогенезу, т.е. каллусы были неморфогенными. Образовавшиеся каллусы пересаживали на регенерационную среду каждые 2 недели.

При культивировании на среде MS из каллусов развивались зеленые проростки и альбиносы, а также были отмечены структуры, развивающиеся по типу ризогенеза (корня) (рисунок 63).



Рисунок 63 – Формирование корней на каллусе риса (ризогенез)

Способность каллусов к морфогенезу оценивали по регенерации растений. Изучаемые образцы риса сформировали 135 растений–регенерантов по 8–и гибридным комбинациям (рисунок 64).

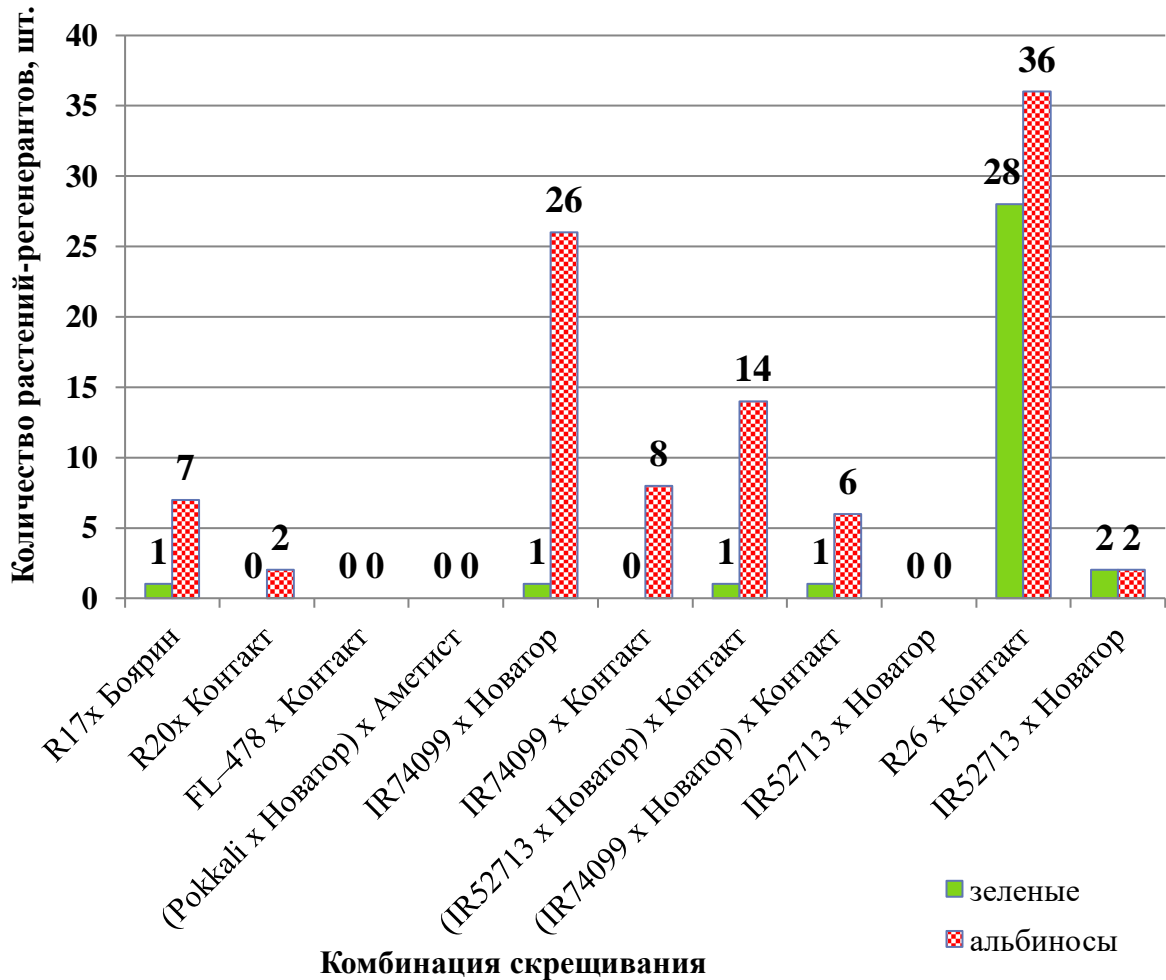


Рисунок 64 – Количество полученных растений–регенерантов

Из них только 34 растения были зелеными. Наибольшее количество зеленых регенерантов, в количестве 28 шт., сформировалось в образце №2364(R26 x Контакт).

В результате оценки эффективности культуры пыльников установлено, что наибольшее число каллусов на 100 культивируемых пыльников наблюдалось у образцов №2364(R26 x Контакт), №1958((IR52713 x Новатор) x Контакт), №1955(IR74099 x Контакт) и №2769(IR74099 x Новатор), которые достоверно превысили среднее значение в опыте (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты эффективности культивирования пыльников риса

№	Название комбинации	Число каллусов, шт	Число каллусов/на 100 пыльников	Число всех регенерантов/на 100 пыльников	Число всех регенерантов/на 100 каллусов
2361	R17 x Боярин	25	2,1	0,7	32,0*
2362	R20 x Контакт	68	5,7	0,2	2,9
2767	IR-74099 x Новатор	7	0,5	0,1	28,6*
2769	IR74099 x Новатор	206	16,8*	2,0*	12,1
1955	IR74099 x Контакт	178	14,2*	0,6	4,5
1958	(IR52713 x Новатор) x Контакт	375	37,7*	1,4*	3,7
2085	(IR74099 x Новатор) x K2495	68	6,6	0,7	10,3
2364	R26 x Контакт	445	45,1*	6,5*	14,4
1642	IR52713 x Новатор	11	1,3	0,5	36,4*
1964	(IR52713 x Новатор) x Контакт	59	7,9	0,1	1,7
	\bar{x}	144,2	13,8	1,3	14,7
	s	155,8	15,6	1,9	13,0

Примечание: * – достоверное отличие от среднего значения

Установлено, что наибольшее число проростков было получено в гибридной комбинации №2364(R26 x Контакт) – 6,5, что статистически значимо превысило среднее значение. Наибольший показатель по признаку количество регенерантов на 100 каллусов был зафиксирован у гибридной комбинации №1642(IR52713 x Новатор) и составил 36,4%. В среднем, высокие показатели регенерации каллусов также наблюдались у образцов №2361(R17 x Боярин) и №2767(IR74099 x Новатор).

Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК регенерантного материала риса. Регенерантные растения риса, были получены в количестве 21 шт., только в комбинации скрещивания №2364(R26 x Контакт), остальные погибли после пересадки в грунт на ранних стадиях развития. Генотипы оценили с помощью молекулярных маркеров, на наличие интродуцируемых аллелей генов *Saltol*, *SKC1* и *SNC*.

В результате молекулярно-генетических анализов было обнаружено наличие генов устойчивости к хлоридному засолению в регенерантных растениях риса. В качестве примера на электрофореграмме представлена идентификация гена *SKC1*. Доминантная аллель гена *SKC1* визуализировалась в сорте №2–R26 и в регенерантных образцах под №6, 7, 21, 22, 23 (рисунок 65).



Рисунок 65 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК растений-регенерантов риса с маркером DQ148410 (гена *SKC1*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–Контакт (отрицательный контроль); №2–R26 (положительный контроль); №3–23–исследуемые регенерантные образцы риса; №6–2364/4, №7–2364/5, №21–2364/19, №22–2364/20, №23–2364/21 – с геном *SKC1*

Ген *Saltol* выявлен в гомозиготном состоянии у донорного сорта №1–R26 и у регенерантных образцов под №3, 4, 6 (рисунок 66).



Рисунок 66 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК растений-регенерантов риса с маркером RM493 (гена *Saltol*)

М–маркер молекулярного веса (100–1000 пн); №1–R26(положительный контроль); №2–Контакт (отрицательный контроль); №3–23 – исследуемые регенерантные образцы риса; №3–2364/1, №4–2364/2, №6–2364/4 – с геном *Saltol*

Частота рекомбинации изученных маркеров была менее 5% (DQ148410 – 1,4%; RM493 – 2,2%), что свидетельствует о сцепленном наследовании данного маркера с признаком. После проведенного молекулярно-генетического анализа выделены регенерантные линии с доминантными аллелями генов *Saltol*, *SKC1*, *SNC*, ассоциированные с солеустойчивостью у растений риса, данные по их количеству представлены в таблице 19.

Таблица 20 – Оценка наличия генов устойчивости к хлоридному засолению в растениях регенерантах риса №2364(R26 x Контакт)

№ растения	<i>Saltol</i>	<i>SKC1</i>	<i>SNC</i>
1	+	–	–
2	+	–	–
3	–	–	–
4	+	+	–
5	–	+	–
6	–	–	–
7	–	–	–
8	–	–	–
9	–	–	–
10	–	–	–
11	–	–	–
12	–	–	–
13	–	–	–
14	–	–	–
15	–	–	–
17	–	–	–
18	–	–	–
19	–	+	–
20	–	+	–
21	–	+	–

Примечание: + аллель, унаследованная от донора устойчивости R26

В общей сложности было идентифицировано 7 генотипов риса с доминантной аллелью генов устойчивости к хлоридному засолению, при этом один из них унаследовал доминантные аллели генов *Saltol* и *SKC1* (№2364/4). Семенной материал с регенерантных растений в настоящее время не получен, растения продолжают свою вегетацию в оранжерейных условиях.

3.6 Характеристика линий риса по комплексу хозяйственно ценных признаков в полевых условиях

По результатам лабораторных испытаний и молекулярно-генетического исследования были отобраны селекционные образцы риса, которые унаследовали донорные аллели генов устойчивости к глубоководному затоплению *Sub1A*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2* и хлоридному засолению *Saltol*, *SKC1*, *SNC*. Поскольку важной задачей для селекции остается получение сортов не только с генами устойчивости к неблагоприятным факторам среды, но способных культивироваться в агроэкологической зоне Ростовской области и обладающих высокими показателями селекционно ценных признаков (скороспелость, число зерен в метелке, масса 1000 зерен и другие), был проведен анализ по выше перечисленным признакам.

Хозяйственно ценные признаки гибридов риса с генами устойчивости к глубоководному затоплению. Гибридные комбинации по комплексу хозяйственно ценных признаков сравнивали с отечественными высокопродуктивными сортами. Продолжительность вегетационного периода у образцов с генами *Sub1A*, *SK1*, *SK2*, *AG1* и *AG2* варьировала от 106 до 125 дней. Преобладали образцы с периодом вегетации от 110 до 120 дней – 80,1%, что является главным условием для культивирования растений риса в агроклиматической зоне Ростовской области (приложение В). В качестве примера в таблице 21 приведены средние значения хозяйственно ценных признаков гибридных образцов риса и отечественных сортов.

Таблица 21 – Хозяйственно ценные признаки гибридных образцов риса устойчивых к глубоководному затоплению

Комбинация скрещивания	Вегетационный период, дней	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерен с 1 метелки, шт.	Масса 1000 зерен, г
Магнат	112,5±5,1	100,2±5,1	15,0±0,5	149,3±10,2	29,9±0,9
Swarna x Магнат	119,0±4,8	90,8±5,3	15,5±0,9	127,4±3,8	28,2±1,4
Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6
Inbarga-3 x Новатор	119,4±4,1	87,2±8,5	16,8±1,4	127,0±4,4	28,3±2,2
Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9
(Inbarga-3 x Новатор) x Контакт	117,5±4,4	84,1±9,6	15,3±1,2	127,4±5,0	28,1±1,6
Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9
Inbarga-3 x Контакт	116,3±4,5	85,1±9,3	15,8±1,3	127,7±5,2	28,5±1,2
Степняк	113,5±3,5	99,1±3,3	14,7±0,9	147,2±9,6	29,8±1,1
Inbarga-3 x Степняк	120,4±3,1	93,2±1,6	17,6±2,1	132,9±6,1	27,8±2,1
Командор	115,5±2,9	100,2±6,1	15,0±1,1	144,3±9,5	30,1±1,3
Inbarga-3 x Командор	120,8±4,4	89,7±3,9	15,8±0,8	129,8±1,7	28,6±1,9
Бахус	115,5±2,9	100,2±6,1	15,0±1,1	144,3±9,5	30,1±1,3
Inbarga-3 x Бахус	115,6±3,0	91,1±5,9	16,5±1,6	134,2±4,9	29,9±2,5
Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6
TDK-1 x Новатор	117,4±5,2	93,2±5,8	16,5±1,4	134,5±7,9	28,8±2,1
Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6
BR-11 x Новатор	116,3±5,1	89,3±3,7	15,6±1,5	135,5±9,2	28,3±1,3
Кубань-3	112,5±4,2	98,2±3,5	14,5±1,3	147,3±8,4	29,7±1,4
BR-11 x Кубань-3	116,6±4,5	84,1±4,9	15,1±1,0	127,1±3,6	28,6±1,7
Боярин	118,5±3,5	95,2±5,6	14,8±1,4	148,2±10,4	30,9±0,9
IR-64 x Боярин	117,5±4,6	86±9,5	16,4±1,0	135,3±7,7	27,5±2,3
Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6
CR-1009 x Новатор	116,3±4,2	92,4±5,2	16,3±1,1	128,3±8,7	28,9±2,1
Командор	115,4±5,2	100,5±4,2	15,0±1,6	144,3±7,1	30,1±1,3
Khan Dan x Командор	113,4±4,3	93,3±5,4	16,5±1,5	127,5±6,4	27,8±1,5
Кубояр	115,3±4,2	97,4±4,2	14,9±1,2	140,5±9,2	29,6±1,5
Кубояр x Kharsu 80A	114,6±6,1	89,5±5,4	15,9±1,2	132,4±10,4	28,4±1,2
Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9
Контакт x Khao Hlan On	116,5±5,4	91,6±5,2	15,7±1,6	135,5±8,9	27,7±1,6
Кубояр	115,3±4,2	97,4±4,2	14,9±1,2	140,5±9,2	29,6±1,5
Khao Hlan On x Кубояр	116,4±5,2	93,4±5,6	15,8±1,5	124,4±10,6	30,1±1,2
Кубояр	115,3±4,2	97,4±4,2	14,9±1,2	140,5±9,2	29,6±1,5
Кубояр x Mazhan Red	116,2±4,8	92,4±4,2	15,5±1,6	137,7±10,5	28,4±1,3

Следует отметить, что гибридные образцы имели более длинную метелку, чем родительские сорта, при этом количество выполненных зерен с 1 метелки было меньше, чем у отечественных сортов. Это связано с высоким выходом пустых зерен. При этом масса 1000 зерен у гибридных образцов была более 27 г, а у некоторых даже незначительно превышала родительские сорта.

Хозяйственно ценные признаки гибридов риса с генами устойчивости к хлоридному засолению. Гибридные образцы с генами солеустойчивости *Saltol*, *SKC1*, *SNC* в сравнении с отечественными сортами являлись среднеспелыми, продолжительность вегетационного периода варьировала от 96 до 115 дней. Преобладали гибридные образцы с продолжительностью периода вегетации от 100 до 110 дней – 36%. В качестве примера в таблице 22 приведены средние значения хозяйственно ценных признаков гибридных образцов риса и отечественных сортов.

Таблица 22 – Хозяйственно ценные признаки гибридных образцов риса устойчивых к хлоридному засолению

Комбинация скрещивания	Вегетационный период, дней	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерен с 1 метелки, шт.	Масса 1000 зерен, г
Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9
R26(IR86385) x Контакт	96,1±6,3	88,3±6,3	16,9±1,3	126,1±4,2	27,4±2,0
IR74099 x Контакт	106,2±4,1	93±5,2	15,3±1,5	144,3±6,4	29,8±1,6
Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6
Pokkali x Новатор	100,8±3,2	88,8±5,8	15,4±0,9	125,6±4,6	28,0±1,9
IR-45427 x Новатор	102,6±5,3	89,1±4,4	15,5±0,3	128,2±3,4	28,0±2,3
IR52713 x Новатор	98,9±2,3	88,5±4,9	15,6±0,9	128,9±2,4	27,4±2,2
IR74099 x Новатор	107,2±5,1	88,4±4,8	16,7±1,5	126,1±3,9	27,9±1,8
Боярин	118,5±3,5	95,2±5,6	14,8±1,4	148,2±10,4	30,9±0,9
R17(IR86385) x Боярин	96,1±6,3	89,3±6,3	16,9±1,3	126,1±4,2	27,4±2,0
Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9
(IR52713 x Новатор) x Контакт	115,2±5,3	96,5±6,3	15,9±1,6	137,2±6,4	29,1±1,3

Большинство гибридных образцов имели высоту растений 85–98 см, что составило 54%. Преобладала группа с длиной метелки 14–14,5 (20%), 15,5–16,0 (16%) и 16,5–17,0 см (16%). Количество зерен с 1 метелки у 67% гибридов варьировало от 120 до 150 шт. В общем, у гибридных образцов наблюдалась однородность по всем хозяйственно ценным признакам.

Хозяйственно ценные признаки регенерантных линий риса с генами устойчивости к глубоководному затоплению. Полевые испытания регенерантных образцов риса показали следующие результаты, представленные в таблице 23.

Таблица 23 – Хозяйственно ценные признаки регенерантных растений риса с генами устойчивости к глубоководному затоплению

№	Комбинация скрещивания	Вегетационный период, дней	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерен с 1 метелки, шт	Масса 1000 зерен, г
	Контакт	110,5±4,8	97,3±5,5	15,3±0,8	141,1±10,3	29,5±0,9
4641/1	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	112,5±5,3	86,2±5,3	14,8±1,1	118,1±10,2	27,8±1,4
4641/2	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	115,2±4,9	83,2±4,7	15,0±0,9	132,2±9,5	29,1±1,5
4641/3	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	123,1±4,2	87,1±5,1	15,8±1,3	129,2±6,9	28,1±1,6
4641/4	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	120,4±5,2	92,3±4,3	15,5±1,4	116,2±5,4	27,6±0,9
4641/5	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	119,2±4,2	87,2±5,3	15,0±1,1	118,2±6,8	28,4±1,4
4641/7	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	116,5±5,5	95,1±4,7	15,3±1,4	123,4±9,1	24,3±1,5
4641/8	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	119,2±5,3	86,4±4,9	15,5±1,3	127,2±9,2	26,4±1,2
4641/9	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	120,3±3,2	91,2±4,7	17,0±1,4	132,4±7,5	27,4±1,9

Продолжение таблицы 23

4641/10	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	116,2±4,8	87,5±5,3	15,2±1,5	129,3±6,8	29,5±1,2
4641/11	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	113,3±5,1	93,2±4,1	15,0±1,3	127,1±6,8	27,6±1,8
4641/12	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	118,1±4,2	85,4±4,2	17,8±1,4	118,3±7,5	28,5±1,8
4641/14	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	113,4±3,9	97,3±4,3	15,0±1,3	125,2±6,3	29,1±1,6
4641/15	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	116,3±4,2	78,5±4,9	14,3±1,4	132,4±5,8	29,2±1,5
	Новатор	111,6±5,3	98,4±3,8	14,7±1,4	147,1±9,8	29,5±1,6
5010/1	(Inbara-3x Новатор) x Контакт	120,2±5,2	87,3±4,3	16,3±1,4	125,4±6,7	29,7±1,8
5010/2	(Inbara-3x Новатор) x Контакт	119,5±4,2	81,4±4,2	15,3±1,5	127,3±8,4	28,2±1,6
5009/2	(Inbara-3x Новатор) x Контакт	116,5±5,4	97,4±4,3	15,2±1,3	129,6±7,7	29,5±1,7
5009/3	(Inbara-3x Новатор) x Контакт	113,4±5,3	83,5±4,4	15,0±1,3	127,5±8,3	27,6±1,7

По продолжительности вегетационного периода регенерантные линии являлись среднеспелыми, максимальные значения по этому признаку наблюдались у образцов №4641/3 – 123 дня. Самыми скороспелыми были образцы №4641/1 с вегетационным периодом 112 дней. Максимальное значение по признаку длина растений наблюдалось у регенерантных растений №4641/14 и № 5009/2 – 97 см. В целом регенерантные растения имели оптимальную высоту стебля для комбайнированной уборки.

Длина метелки и ее плотность у растений риса имеют решающее значение при формировании зерновой продуктивности. Метелки регенерантных линий риса существенно не различались между собой по размерам, форме, числа колосков на боковых ветвях. В среднем длина метелки составила 15,5 см, варьируя от 14,3 до 16,3 см. По количеству выполненных зерен с 1 метелки существенной разницы не наблюдалось.

Масса 1000 зерен у регенерантных растений риса в среднем составила 28 г, достоверных превышений в сравнении с отечественными сортами не наблюдалось.

Таким образом, в результате проведенных исследований выделены перспективные гибридные образцы риса с генами устойчивости к глубоководному затоплению и хлоридному засолению и с комплексом хозяйственно ценных признаков для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов устойчивых к абиотическим факторам среды.

ВЫВОДЫ

1. На основе лабораторных и полевых испытаний выделены для дальнейшей гибридизации, следующие родительские формы: зарубежные сорта устойчивые к глубоководному затоплению IR-64, TDK-1, CR-1009, Swarna, Mazhan Red, Khan Dan, BR-11, Inbara-3, Kharsu 80A, Khao Hlan On и к хлоридному засолению IR74099, R21(IR86385), R26(IR86385), R20(IR86385), R17(IR86385), FL-478, IR527132B, Pokkali, а также высокопродуктивные сорта отечественной селекции Боярин, Контакт, Кубояр, Степняк, Командор, Бахус, Магнат, Южанин, Кубань-3, Новатор.

2. В результате сравнительного молекулярно-генетического анализа определены 7 информативных маркеров генов, определяющих признак устойчивости риса к глубоководному затоплению – Sub1A203, RM 7481, SK1(1F1R), SK1(2F2R), SK2(2F2R), RM 24161, RM 478 и 3 маркера генов, устойчивости к хлоридному засолению – RM493, DQ148410, qSNC3.

3. С помощью ДНК–маркирования получены: 222 гибридные комбинации риса с доминантными аллелями генов *Sub1A*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2*, контролирующие устойчивость к глубоководному затоплению и 45 гибридных комбинаций риса с доминантными аллелями генов *Saltol*, *SKC1*, *SNC*, контролирующие солеустойчивость.

4. В результате андрогенеза *in vitro* и ДНК–маркирования созданы 21 дигаплоидная линия с доминантными аллелями генов *Sub1A*, *SK1*, *SK2*, *AG1*, *AG2* и 7 линий с доминантными аллелями генов *Saltol*, *SKC1*, *SNC*, устойчивость, которых подтверждена в лабораторных испытаниях.

5. Для дальнейшей селекционной работы выделены перспективные гибридные комбинации риса устойчивые к глубоководному затоплению и хлоридному засолению с оптимальными показателями хозяйственно ценных признаков для выращивания в условиях Ростовской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян К.М. Система рисоводства Краснодарского края / К.М. Авакян, В. Д. Агарков, Е. В. Алексеенко [и др.] // Департамент сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности Краснодарского края Всероссийский научно-исследовательский институт риса. – 2-е издание, переработанное и дополненное. – Краснодар: ООО "Просвещение-Юг", 2011. – С. 316.
2. Азарин К.В., Усатов А.В., Костылев П.И. Селекция риса, устойчивого к полному затоплению (обзор) // Рисоводство. – 2017. – №4(37). – С. 35–42.
3. Азарин К.В., Усатов А.В., Костылев П.И., Макаренко М.С., Ковалевич А.А. SSR маркеры устойчивости риса к полному затоплению // Зерновое хозяйство России. – 2016 а. – №4. – С. 21–25.
4. Азарин К.В., Усатов А.В., Макаренко М.С., Хачумов В.А., Костылев П.И., Кудашкина Е.Б. Маркерная селекция солеустойчивых форм риса // Зерновое хозяйство России. – 2016 б. – №6. – С. 28–32.
5. Алабушев А.В., Костылев П.И., Краснова Е.В. Новые сорта риса селекции АНЦ «Донской» // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т.33. – №3. – С. 45–47. doi: 10.24411/0235-2451-2019-10311.
6. Бушман Н.Ю., Верещагина С.А. Эффективность питательных сред для индукции каллусообразования у гибридов риса // Рисоводство. – 2013. – № 1(22). – С.13–16.
7. Глазко В.И., Рождественская Н.В., Иванов А.Н. Молекулярно-генетические подходы к анализу доместикации риса и его коэволюции с человеком // Известия ТСХА.– 2009.– Т.4. – С.71–79.
8. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. – Краснодар: ВНИИ риса. – 2012. С. 91.
9. Гученко С.С. Сравнительная характеристика и отбор дигаплоидных линий риса по хозяйственно ценным признакам // Дальневосточный аграрный вестник. –2016. –Т. № 1. – С. 10–15.

10. Дубина Е.В., Костылев П.И., Мухина Ж.М., Харитонов Е.М., Есаулова Л.В. Release of rice lines with five genes of tolerance to blast // В сборнике: Биотехнология: состояние и перспективы развития материалы VIII Московского Международного Конгресса.–ЗАО «Экспо-биохимтехнологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2015. – С. 85-87.
11. Жоголева О.С., Вожжова Н.Н., Дубина А.Ю., Купрейшвили Н.Т., Костылев П.И. // Зерновое хозяйство России. – 2021. – №6(78). – С. 73–77. doi:10.31367/2079-8725-2021-78-6-73-77.
12. Зеленская О.В., Зеленский Г.Л., Остапенко Н.В., Туманьян Н.Г. Генетические ресурсы риса (*Oryza sativa* L.) с окрашенным перикарпом зерна // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22(3). – С. 296-303 doi:10.18699/VJ18.363.
13. Зеленский Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, рисовой листовой нематоде и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: автореф. дис.... д-ра с.-х. наук. – Краснодар: ВНИИ риса. – 1993. – С. 48.
14. Зеленский, Г. Л. Рис: биологические основы селекции и агротехники: монография / Г. Л. Зеленский. – Краснодар: КубГАУ. – 2016. – С. 236.
15. Илюшко М.В. Регенерационный максимум в андрогенных каллусных линиях риса *Oryza sativa* L. *in vitro* // Рисоводство. 2019. Т. 2 (43). С. 29-32.
16. Илюшко М.В., Ромашова М.В. Изменчивость гаплоидов риса, полученных в культуре пыльников *in vitro* // Российская сельскохозяйственная наука.– 2019.– Т. 2.– С. 11-14. doi: 10.31857/S2500-26272019211-14.
17. Канукова К.Р., Газаев И.Х., Сабанчиева Л.К., Боготова З.И., Аппаев С.П. ДНК-маркеры в растениеводстве // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН.– 2019.– Т. 6(92). doi: 10.35330/1991-6639-2019-6-92-220-232.

18. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. – С.-Пб.: ВИР, 1998. – 370 с.
19. Костылев П.И., Аксенов А.В. Селекция суходольного риса на засухоустойчивость (обзор) // Зерновое хозяйство России. – 2021. – № 4(76). – С. 15–22. doi:10.31367/2079-8725-2021-76-4-15-22.
20. Костылев П.И., Вожжова Н.Н., Калинина Н.В., Черткова Н.Г. Получение андрогенных дигаплоидов риса с генами *Sub1A* и *SNORKEL* устойчивых к продолжительному затоплению // Труды Кубанского Государственного Аграрного университета. – 2023. – Т. 10. С. 215–223. doi: 10.21515/1999-1703-105-215-223.
21. Костылев П.И., Голубова В.А., Калинина Н.В., Вожжова Н.Н. Изучение энергии роста растений риса в лабораторных условиях // Зерновое хозяйство России. – 2022. – Т. 14. – №5. – С. 77–83. doi:10.31367/2079-8725-2022-82-5-77-83.
22. Костылев П.И., Дубина Е.В., Гаркуша С.В. Генетика качественных и количественных признаков риса: книга / Костылев П.И., Дубина Е. В., Гаркуша С.В. – Зерноград – Краснодар: АНЦ «Донской», ФНЦ риса, 2025. – 336 с.
23. Костылев П.И., Краснова Е.В. История создания сортов риса в Аграрном научном центре «Донской» // Зерновое хозяйство России. – 2022. – Т. 14. – №3. – С. 5–17. doi: 10.31367/2079-8725-2022-81-3-5-17.
24. Костылев П.И., Краснова Е.В., Аксенов А.В. Изучение китайских образцов риса в условиях Ростовской области // Зерновое хозяйство России. – 2020. – №2(68). – С. 66–71. doi:10.31367/2079-8725-2020-68-2-66-71.
25. Костылев П.И., Краснова Е.В., Аксенов А.В., Балюкова Э.С. Генетика ряда признаков у гибрида риса Светлый х Мавр // Зерновое хозяйство России. – 2019. – Т. 3(63). doi:10.31367/2079-8725-2019-63-3-30-35.
26. Костылев П.И., Парфенюк А.А., Степовой В.И. Северный рис (генетика, селекция, технология). – 2004. – С. 576.

27. Костылев П.И., Черткова Н.Г. Гены устойчивости риса к бактериальному ожогу листьев, вызываемому *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (обзор) // Зерновое хозяйство России. – 2022. – Т.14(2). С. 41–47. doi: 10.31367/2079-8725-2022-80-2-41-47.
28. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17(2).– С. 314-325.
29. Лесняк С.А., Дубина Е.В., Гаркуша С.В., Корж С.О., Рубан М.Г. Создание генетических ресурсов риса, устойчивых к абиотическим стрессорам, на основе методов молекулярного маркирования // Рисоводство. – 2021. – №3(52). – С. 6–11. doi: 10.33775/1684-2464-2021-52-3-6-11.
30. Лось Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса // Сельскохозяйственная биология. – 1987. –Т. 12. – С. 15-17.
31. Малышева Н.Н., Савенко Б.Г., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. По-лучение, оценка и отбор дигаплоидных линий риса с хозяйственно ценными признаками // Рисоводство. 2012. № 2. С. 14-18.
32. Мережко, А.Ф. Система генетического изучения исходного материала для селекции растений / А.Ф. Мережко. – Л.: ВИР. – 1984. – С.70.
33. Методика Государственной комиссии по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур – М.: Сельхозиздат. – 1963. – С. 243.
34. Савенко Е.Х., Королева С.В., Мухина Ж.М., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. Использование метода культуры пыльников для создания исходного материала сельскохозяйственных культур // Рисоводство. – 2016. – № 1–2 (30–31). С. 76–79.
35. Савенко Е.Г., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. Вариабельность признаков в популяциях ДН линий риса // Рисоводство. – 2022. – Т. 2(55). – С. 6-10. doi:10.33775/1684-2464-2022-55-2-6-10.
36. Скаженник М.А., Воробьев Н.В., Шеуджен А.Х., Ковалев В.С., Балясный И.В. Признаки определяющие полегание растений, и оценка

устойчивости к нему у интенсивных и экстенсивных российских сортов риса (*Oryza sativa* L.) // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54(1). – С. 149–157. doi: 10.15389/agrobiology.2019.1.149ru.

37. Супрун И.И., Ковалев В.С., Коротенко Т.Л., Степанов И.В., Лободина Е.В. Анализ генетических взаимосвязей сортов риса из разных эколого-географических групп с использованием SSR маркеров // Plant Biotechnology and Breeding.– 2019.– Т. 2(1).– С. 7–15. doi: 10.30901/2658-6266-2019-1-7-15.

38. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика.– 2018.– Т. 10(1). С. 69–84. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15.

39. Тараненко В.В., Дядюченко Л.В., Муравьев В.С. Изучение эффективности нового регулятора роста на растениях риса // Земледелие. – 2021. – № 5. – С. 32–36. doi:10.24412/0044-3913-2021-5- 32-36.

40. Ткачева М.С., Досеева О.А. К вопросу солеустойчивости риса // Научный журнал КубГАУ. – 2015. – Т. 105(01).

41. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // Сельскохозяйственная биология. – 1997. – № 5. – С. 3–21.

42. Харитонов Е. М., Гончарова Ю.К. О генетико-физиологических механизмах солеустойчивости у риса (*Oryza sativa* L.) (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – Т. 3. С.3–11.

43. Харитонов Е.М., Гончарова Ю.К. Механизм солеустойчивости российских сортов риса // Аграрный вестник Урала.– 2010.– Т. 8(74).– С.45–48.

44. Харченко П.Н., Кучеренко Л.А. Получение растений риса из пыльников // Доклады ВАСХНИЛ. – 1977. – Т. 4. – С.15–16.

45. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – № 4/2 (17). – С. 1044-1054.

46. Черепанова Т.А., Безмутко С.В., Лелявская В.Н. Оценка влияния инсектофунгицидного протравителя Селест Топ на растения риса // *Зерновое хозяйство России*. 2021. – № 1(73). – С. 78–81. doi:10.31367/2079-8725-2021-73-1-78-81.
47. Черткова Н. Г., Костылев П. И., Калинина Н. В., Донцова В. Ю., Шумская О. В. Получение регенерантных линий риса методом культуры пыльников // *Зерновое хозяйство России*. –2022. – Т. 14, № 4. –С. 22–27. doi: 10.31367/2079-8725-2022-82-4-22-27.
48. Черткова Н. Г., Усатов А. В., Костылев П. И., Скрининг гибридных генотипов риса на наличие генаустойчивость к засолению Saltol // «Живые и биокосные системы». – 2024. – № 48. doi: 10.18522/2308-9709-2024-48-5.
49. Черткова Н.Г., Костылев П.И., Калинина Н.В., Донцова В.Ю., Шумская О.В. Получение регенерантных линий риса методом культуры пыльников // *Зерновое хозяйство России*.– 2022.– Т.14(4).– С.22–27. doi: 10.31367/2079-8725-2022-82-4-22-27.
50. Черткова Н.Г., Усатов А.В., Костылев П.И., Дуплий Н.Г. Идентификация генов устойчивости к длительному затоплению в гибридных образцах риса // *Социально-экологические технологии*.– 2023.– Т.–4.– С. 366–383. doi:10.31862/2500-2961-2023-13-4-366-383.
51. Чесноков Ю.В. Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях. – С. –Пб.: АФИ. – 2013.– С. 116.
52. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин С.Е. и др. *Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / Под ред. В.С. Шевелухи – 2-е изд., перераб. и доп. М.; Высш. шк. – 2003.– С. 469.*
53. Шихмурадов А.З. Генетические аспекты солеустойчивости культурных растений // *Известия дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки*.– 2011. – №1(14).– С.46–49.

54. Aggarwal R.K., Brar D.S., Nandi S., Huang N., Khush G.S. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers // Theor. Appl. Genetic.– 1999.– Vol. 96.– P. 602-611.
55. Ahmadi B., Ebrahimzadeh H. In vitro androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants // Plant cell reports.– 2020.– Vol. 39(3).– P. 299–316. doi: 10.1007/s00299-020-02509-z.
56. Ali Md.N., Yeasmin L., Gantait S., Goswami R., Chakraborty S. Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers // Physiol Mol Biol. – 2014. – P. 411–423. doi: 10.1007/s12298-014-0250-6.
57. Almeida D.M., Almadanim M.C., Lourenço T., Abreu I.A., Saibo N.J.M., Oliveira M.M. Screening for abiotic stress tolerance in rice: salt, cold, and drought. Environmental responses in plants.– 2016.– Vol.– 1398.– P. 155–82. doi: 10.1007/978-1-4939-3356-3_1.
58. AL-Tam F., Adam H., Anjos A., Lorieux M., Larmande P., Ghesquière A., Jouannic S., Shahbazkia H. R. P-TRAP: a Panicle Trait Phenotyping tool // BMC Plant Biology. – 2013. – Vol. 13:122.
59. Ammar M. H. M., Pandit A., Singh R. K., Sameena S., Chauhan M. S., Singh A. K., Sharma P. C., Gaikwad K., Sharma T. R., Mohapatra T., Singh N. K. Mapping of QTLs Controlling Na⁺, K⁺ and Cl⁻ Ion Concentrations in Salt Tolerant Indica Rice Variety CSR27 // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology.– 2009.– Vol. 18(2).– P. 139–150. doi:10.1007/BF03263312.
60. Angaji S. A., Septiningsih E. M., Mackill D. J., Ismail A. M. QTLs Associated with Tolerance of Flooding During Germination in Rice (*Oryza sativa* L.) // Euphytica.– 2010.– Vol. 172(2).– P. 159–168. doi:10.1007/s10681-009-0014-5.
61. Aurabi A. K., Ibrahim K. M., Yousif S. A. Screening of some rice *Oryza sativa* L. genotypes for drought tolerance using SSR-PCR technique // Journal of Biotechnology Research Center. – 2014. – Vol. 8(2). – P. 14–18. DOI: 10.24126/jobrc.2014.8.2.319.

62. Bailey-Serres J., Chang R. Sensing and Signalling in Response to Oxygen Deprivation Plants and Other Organisms // *Annals of Botany*.– 2005.– Vol.96(4).– P. 507–18. doi:10.1093/aob/mci206.
63. Bailey-Serres J., Fukao T., Ronald P., Ismail A., Heuer S., Mackill D. Submergence Tolerant Rice: SUB1's Journey from Landrace to Modern Cultivar // *Rice*.– 2010.– Vol. 3.– P. 138–147. doi:10.1007/s12284-010-9048-5.
64. Baltazar M. D., Ignacio J. C. I., Thomson M. J., Ismail A. M., Mendiola M. S., Septiningsih E. M. QTL mapping for tolerance of anaerobic germination from IR64 and the aus landrace Nanhi using SNP genotyping // *Euphytica*. –2014. – Vol. 197. – P. 251–260. doi: 10.1007/s10681-014-1064-x.
65. Bindusree G., Natarajan P., Kalva S., Madasamy P. Whole genome sequencing of *Oryza sativa* L. cv. Seeragasamba identifies a new fragrance allele in rice // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12(11):e0188920. doi: 10.1371/journal.pone.0188920.
66. Bonilla P., Dvorak J., Mackill D., Deal K., Gregorio G. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines // *Philippine Agricultural Scientist*. – 2002. – Vol. 65(1). – P.68–76.
67. Bonilla P., Dvorak J., Mackill D., Deal K., Gregorio G. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines // *Philippine Agricultural Scientist*.– 2002.– Vol. 65(1).– P. 68–76.
68. Blair M.W., Panaud O., McCouch S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) // *Theor. Appl. Genet.*– 1999. – Vol.98.– P. 780–792.
69. Causse, M.A., Fulton T. M., Cho Y. G., Ahn S. N., Chunwongse J., Wu K., Xiao J., Yu Z., Ronald P. C., Harrington S. E. et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population // *Genetics*.– 1994.– Vol.138.– P. 1251–1274.

70. Chakravarthi B. K., Naravaneni R. SSR-marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.) // African J. of Biotech. – 2006. – No. 5. – P. 684– 688.
71. Chang T. T. The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rice // Euphytica.–1976.– Vol. 25.– P. 435–441.
72. Chen Y. Anther and pollen culture of rice // Haploids of higher plants in vitro. Beijing: China Academic Publishers. – 1986. – P.3–25.
73. Chen Y. Anther and pollen culture of rice in China // Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement, Beijing. – 1983. – P. 126.
74. Cheng L., Wang Y., Meng L., Hu X., Cui Y., Sun Y., Zhu L., Ali J., Xu J., Li Z. Identification of salt-tolerant QTLs with strong genetic background effect using two sets of reciprocal introgression lines in rice // Genome.– 2012.– Vol. 55(1).– P. 45–55. doi: 10.1139/g11-075.
75. Cheng, Z. J. , Hardy, R. W. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. – 2003. – Vol. 218(1–4). – P. 501–514. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00458-1)
76. Choi, Young J. The complex geography of domestication of the African rice *Oryza glaberrima* // PLOS Genetics. – 2019. – Vol. 15(3):e1007414. doi:10.1371/journal.pgen.1007414
77. Datta S.K. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement // Curr. Sci. – 2005.– Vol. 89(11). – P. 1870–1878.
78. Doi, K., Sobrizal K., Ikeda K., Sanchez P. L., Kurakazu T. et al. Developing and evaluating rice chromosome segment substitution lines // in IRRI Conference. – 2002. – P.16–19.

79. Dubina E., Kostylev P., Ruban M., Lesnyak S., Krasnova E., K. Azarin. Rice Breeding in Russia Using Genetic Markers // Plants. – 2020. – Vol. 9. – P. 1580. doi:10.3390/plants9111580.
80. Feyt H., Dubois C, Clement G. Analysis of the diversity of rice genetic resources for use in Europe-determination of a core collection // Proceeding of Eurorice 2001 Symposium. – 2001.– P. 52–68.
81. Fukao T., Bailey-Serres J. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice // BIOLOGICAL SCIENCES. – 2008. – Vol. 105(43). – P. 16814–16819. doi:10.1073/pnas.0807821105.
82. Ganie S.A., Molla K.A., Henry R.J., Bhat K. V., Mondal T. K. Advances in understanding salt tolerance in rice. Theoretical and Applied Genetics. – 2019. doi:10.1007/s00122-019-03301-8.
83. Gao L., Innan H. Nonindependent domestication of the two rice subspecies, *Oryza sativa ssp. indica* and *ssp. japonica*, demonstrated by multilocus microsatellites // Genetics. – 2008. – Vol. 179. – P. 965–976. doi: 10.1534/genetics.106.068072.
84. Ganie, S. A., Molla, K. A., Henry, R. J., Bhat, K. V., Mondal, T. K. Advances in understanding salt tolerance in rice // Theor. Appl. Genet. – 2019. – Vol. 132(4). P. 851–870. doi: 10.1007/s00122-019-03301-8.
85. Garris, A., Tai T., Coburn J., Kresovich S., Mccouch S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. // Genetics.– 2005. – Vol. 169.– P. 1631–1638. doi:10.1534/genetics.104.035642.
86. Das G., Patra J. K., Baek K.H. Insight into MAS: A Molecular Tool for Development of Stress Resistant and Quality of Rice through Gene Stacking // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00985.
87. Goff S. A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., et al. A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. *ssp.japonica*) // Science. – 2002. – Vol. 296(5565). – P. 92–100. doi: 10.1126/science.1068275.

88. Gueye T., Ndir K.N. *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material // *Sci Res Essays*. – 2010. – Vol. 5(7). – P. 709–713.
89. Haque M. A., Rafii M. Y., Yusoff M. M., Ali N. S., Yusuff O., Arolu F., Anisuzzaman M. Flooding tolerance in Rice: adaptive mechanism and marker-assisted selection breeding approaches // *Molecular Biology Reports*. – 2023. – Vol. 50. – P. 2795–2812.
90. Haque Md. A., Rafii M. Y., Yusoff M. M., Ali N. S., Yusuff O., Arolu F., Anisuzzaman M. Flooding tolerance in Rice: adaptive mechanism and marker-assisted selection breeding approaches // *Molecular Biology Reports*. – 2023. – Vol. 50. – P. 2795–2812. doi:10.1111/pbr.12719.
91. Harris D.R. The Origins and Spread of Agriculture and Pastoralism in Eurasia // Psychology Press. – 1996. – P. 565.
92. Harushima Y., Yano M., Shomura A. et al. A High-Density Rice Genetic Linkage Map with 2275 Markers Using a Single F2 Population // *Genetics*. – 1998. – Vol. 148. – P. 479–494.
93. Hattori Y., Nagai K., Furukawa S., Song X.J., Kawano R., Sakakibara H., Wu J., Matsuoka T., Yoshimura A., Kitano H., Matsuoka M., Mori H., Ashikari M.. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water // *Nature*. – 2009. – Vol. 460. – P. 1026–1030.
94. Herwibawa B., Kusmiyati F. Contribution of Genomics to Gene Discovery of Salinity Tolerance in Rice // *Vegetalika*. – 2020. – Vol. 9(4). – P. 572–586. doi.org/10.22146/veg.54889.
95. Herwibawa B., Kusmiyati F. Contribution of Genomics to Gene Discovery of Salinity Tolerance in Rice // *Vegetalika*. – 2020. – Vol. 9(4). – P. 572–586. doi: 10.1038/s41498-020-66604-7.
96. Horie T., Karahara I., Katsuhara M. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants // *The rice journal*. – 2012. – Vol. 5:11. doi: 10.1186/1939-8433-5-11.

97. Ismail A. M., Ella E. S., Vergara G. V., Mackill D. J. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*) // *Annals of Botany*. – 2008. – Vol. 103(2). – P. 197–209. doi:10.1093/aob / mcn211.
98. Ismail A. M., Johnson D. E., Ella E. S., Vergara G. V., Baltazar A. M. Adaptation to flooding during emergence and seedling growth in rice and weeds, and implications for crop establishment // *AoB Plants*. – 2012. – pls019. doi:10.1093/aobpla /pls019.
99. Ismail A.M., Heuer S., Thomson M.J., Wissuwa M. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils // *Plant Mol Biol*. – 2007. – Vol. 65(4). – P. 547–70. doi:10.1007/s11103-007-9215-2.
100. Jena K.K, Kim S.R Genomics, biotechnology and plant breeding for the improvement of rice production // In: *Accelerated Plant Breeding*. – 2020. – Vol. 1. – P. 217–232. doi:10.1007/978-3-030-41866-3_9.
101. Jena K.K., Moon H.P, Mackill D.J. Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding // *Korean J. Breed*. – 2003. – Vol. 35. – P. 133–140.
102. Jiang L., Liu S., Hou M., Tang J., Chen L., Zhai H., Wan J. Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.) // *Agricultural and Food Sciences*. – 2006. – Vol. 98(1). – P. 68–75. doi:10.1016/j.fcr.2005.12.015.
103. Ju C., M, X., Han B., Zhang W., Zhao Z., Geng L., Cui D., Han L. Candidate gene discovery for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at the germination stage based on genome-wide association study. *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 13:1010654. doi:10.3389/fpls.2022.1010654.
104. Kamolsukyonyong W., Ruanjaichon V., Siangliw M., Kawasaki S., Sasaki T., Vanavichit A., Tragoonrun S. Mapping of Quantitative Trait Locus Related to Submergence Tolerance in Rice with Aid of Chromosome Walking // *DNA Res*. – 2001. – № 8. – P. 163–171.

105. Kato S, Kosaka H, Hara S: On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants // Bull Sci. Fac. Agric. Kyushu Univ. – 1928.– Vol. 3.– P. 132–147.
106. Kaushal L., Sharma R., Balachandran S.M., Ulaganathan K., Shenoy V. Effect of cold pretreatment on improving anther culture response of rice (*Oryza sativa* L.) // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.– 2014. – T. 2(II(S)). – C. 231–242.
107. Khasna E., Karisma K., Ardana G., Zakiyah A., Fikriani C., Anggraini N., Listyorini D. Sub1A gene screening for submergence stress in Indonesian local rice varieties // AIP Conference Proceedings. – 2020. – Vol. 2260(1):060012
108. Khush G.S., Brar D.S., Hardy B. Rice genetics VI. – Los Banos. – 2001. – P. 488.
109. Khush G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice // Plant Mol. Biol. –1997. – Vol. 35. – P. 25–34.
110. Kostylev P., Kainina N., Vozzhova N., Golubova V., Chertkova N. Creation of Rice Doubled Haploids Resistant to Prolonged Flooding Using Anther Culture // Plants. – 2023. – Vol. 12. – P. 3681. doi: 10.3390/plants12213681.
111. Koyama M. L., Levesley A., Koebner R. M., Flowers T. J., Yeo A. R. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 125(1). – P. 406–422. doi: 10.1104/ctp.125.1.406.
112. Kuang Y. H., Fang Y.F, Lin S. C., Tsai S. F., Yang Z. W., Li C. P., Huang S. H., Hechanova S. L., Jena K. K., Chuang W. P. The Impact of Climate Change on the Resistance of Rice Near-Isogenic Lines with Resistance Genes Against Brown Planthopper // Rice. – 2021. – Vol. 14:64. DOI:10.1186/s12284-021-00508-6.
113. Kumari R., Kumar P., Sharma V. K., Kumar H. Molecular characterization for salinity tolerance in rice using microsatellite markers. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. – 2016. – 9(2). – P. 163–174. doi: 10.5958/2230-732X.2016.00023.1.

114. Kumari R., Kumar P., Sharma V.K., Kumar H. Molecular characterization for salinity tolerance in rice using microsatellite markers // International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology. – 2016. – T. 9(2). – P. 163–174. doi:10.5958/2230-732X.2016.00023.1.
115. Kumar S., Kumar S., Krishnan G. S., Mohapatra T. Molecular basis of genetic plasticity to varying environmental conditions on growing rice by dry/direct-sowing and exposure to drought stress: Insights for DSR varietal development // Front. Plant Sci. 2022. – Vol. 13. doi:10.3389/fpls.2022.1013207.
116. Kumar V., Bhagwat S. G. Microsatellite (SSR) Based Assessment of Genetic Diversity among the Semi-dwarf Mutants of Elite Rice Variety WL112 // International Journal of Plant Breeding and Genetics. – 2012. – Vol. 6. – P. 195–205. doi:10.3923/ijpbg.2012.195.205.
117. Li X., Wu L., Geng X., Xia X., Wang X., Xu Z., Xu Q. Deciphering the Environmental Impacts on Rice Quality for Different Rice Cultivated Areas // Rice. – 2018. – V. 11:7. doi:10.1186/s12284-018-0198-1.
118. Lin H. X., Zhu M. Z., Yano M., Gao J. P., Liang Z. W., Su W. A., Hu X. H., Ren Z. H., Chao D. Y. QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance // Theor Appl Genet. – 2004. – Vol. 108(2). – P. 253–260. doi: 10.1007/s00122-003-1421-y.
119. Li-zhi G., Nonindependent I. H. Domestication of the Two Rice Subspecies, *Oryza sativa* ssp. *indica* and ssp. *japonica*, Demonstrated by Multilocus Microsatellites // Genetics. – 2008. – Vol. 179. – P. 965–976.
120. Londo J. P., Chiang Y. C., Hung K. H., Chiang K. H., Schaal B. A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 103. – P. 9578–9583. doi: 10.1073/pnas.0603152103.
121. Loriex M., Ndjiondjop M.N., Ghesquiere A. A first interspecific *Oryza sativa* *Oryza glaberrima* microsatellite based genetic map // Theor. Appl. Genetic. – 2000. – V.100. – P. 591–601.

122. Luce C, Noyer J.L., Tharreau D. The use of microsatellite markers to examine the diversity genetic resources of rice (*Oryza sativa* L.) adapted to European conditions // Proceeding of the international symposium on molecular markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in horticulture.– Montpellier. – 2000. – P. 221–235.
123. Mackill D., Khush G. *IR64*: a high-quality and high-yielding mega variety // Plant Science. – 2018. – T. 11(1). – C.18. doi:10.1186/s12284-018-0208-3.
124. Maharani A., Fanata W. I. D., Laeli F. N., Kim K. M., Handoyo T. Callus Induction and Regeneration from Anther Cultures of Indonesian Indica Black Rice Cultivar // Journal of Crop Science and Biotechnology. – 2020. – Vol. 23(1). – P. 21–28. doi:10.7324/JABB.2019.70216.
125. Maharani A., Fanata W. I. D., Laeli F. N., Kim K.M., Handoyo T. Callus Induction and Regeneration from Anther Cultur Indonesian Indica Black Rice Cultivar // J. Crop Sci. Biotech. – 2020. – T. 23(1). – C. 21–28. doi: 10.7324/JABB.2019.70216.
126. Manangkil O. E., Vu H. T. T., Yoshida S., Mori N., Nakamura C. A simple, rapid and reliable bioassay for evaluating seedling vigor under submergence in indica and japonica rice (*Oryza sativa* L.) // Euphytica. – 2008. – Vol. 163.– P. 267–274. doi: 10.1007/s10681-008-9645-1.
127. Mannion A.M. Domestication and the origins of agriculture: an appraisal // Progress in Physical Geography. – 1999. – Vol. 23. – P. 37–56.
128. Mardani, Z. Identification of molecular markers linked to salt-tolerant genes at germination stage of rice / Z. Mardani¹, B. Rabiei, H. Sabouri, A. Sabouri // Plant Breeding. – 2014. – V. 133. – P. 196–202. doi:10.1111/pbr.12136.
129. McCouch, S.R., Kochert G., Yu Z.H. et al. Molecular mapping of rice chromosomes // Theor. Appl. Genet. – 1988. – V.76. – P. 815–829.
130. McCouch S.R., Temnykh S., Lukashova A., Cobum J., DeClerck G., et al. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications // Rice

genetic 4. Proceeding of the fourth international rice genetic symposium. – 2001.– P. 117–135.

131. Mochizuki, K., H. Ohtsubo, H. Hirano, Sano Y., Ohtsubo E., Classification relationships of rice accessions with AA genome by identification of transposable elements at nine loci. *Jpn. J. Genet.* –1993. – Vol. 68. – P. 205–217.

132. Molina J.; Sikora M.; Garud N.; Flowers J.M.; Rubinstein S. Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2011. – Vol. 108(20). – P. 8351–8356. doi:10.1073/pnas.1104686108.

133. Mondal S., Hasan M. J., Ahmad T., Miah M.G., Cruz P.C.S., Ismail A.M. Effects of *AG1* and *AG2* QTLs on Nonstructural Carbohydrate and Seed Management Options for Rice Seedling Growth and Establishment under Flooding Stress // *Rice Science.* – 2020. – Vol. 27(6). – P. 515–528. doi: 10.1016/j.rsci.2020.09.008.

134. Morinaga T. Classification of rice varieties on the basis of affinity // In: Reports for 5th Meeting of International Rice Commission's Working Party on Rice Breeding. – 1954. – P. 1–14.

135. Morishima H. Wild progenitors of cultivated rice and their population dynamics / in *Rice genetics*. International Rice Research Institute. Manila. – 1986. – P. 3–14

136. Nagai I. Japonica rice. Its breeding and culture. – Tokio: Yokendo Ltd. – 1959. – P.357–360.

137. Negrao, S., Courtois B., Ahmadi N., Abreu I. et al Recent updates on salinity stress in rice: from physiologi-cal to molecular responses // *Critical Reviews in Plant Sciences.* –2011. – V. 30. – 4. – P. 329–377.

138. Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plants from anther culture // *Proc. Japan Acad.* –1968. – Vol.44. – P. 554–557.

139. Niizeki H., Oono K. Rice plants obtained by anther culture // *Les Cultures de Tissus de Plantes.* – 1971.– P. 251–257/

140. Niroula R. K., Pucciariello C., Ho V. T., Novi G., Fukao T., Perata P. SUB1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species // *The Plant Journal*. – 2012.– Vol.- 72.– P. 282–293. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05078.x.
141. Normile D. Yangtze seen as earliest rice site // *Science*. – 1997.- T. 275 (5298).- C. 309–310. doi:10.1126/science.275.5298.309.
142. Nishikawa T., Vaughan D.A., Kadowaki K. Phylogenetic analysis of *Oryza* species based on simple sequence repeats and its flanking nucleotide sequences from the genomes of cytoplasmic organelle // *Proceedings of international genetic resources workshop on the genus Oryza*. – 2003. – P. 35–38.
143. Oe S., Sasayama D., Luo Q., Fukayama H., Hatanaka T., Azuma T. Growth responses of seedlings under complete submergence in rice cultivars carrying both the submergence-tolerance gene Sub1A-1 and the floating genes Snorkels // *Plant Production Science*. – 2021. – Vol. 25. – P. 70–77. doi:10.1080/1343943x.2021.1943465.
144. Oka H. I., Morishima H. Phylogenetic differentiation of cultivated rice. 23. Potentiality of wild progenitors to evolve the indica and japonica types of rice cultivars // *Euphytica*. – 1982. – Vol. 31. – P. 41–50.
145. Okishio T., Sasayama D., Hirano T., Akimoto M., Itoh K., Azuma T. Growth promotion and inhibition of the Amazonian wild rice species *Oryza grandiglumis* to survive flooding // *Planta*. – 2014. – Vol. – 240.– P. 459–469. doi:10.1007/s00425-014-2100-8.
146. Oladosu Y., Rafii M. Y., Arolu F., Chukwu S. C., Muhammad I., Kareem I., Salisu M. A., Arolu I. W. Submergence tolerance in rice: Review of mechanism, breeding and, future prospects. // *Sustainability*. – 2020. – Vol. 12. – P. 1632. doi: 10.3390/su12041632.
147. Pandit A., Rai V., Bal S., Sinha S., Kumar V., Chauhan M., Gautam R. K., Singh R., Sharma P. C., Singh A. K., Gaikwad K., Sharma T. R., Mohapatra T., Singh N. K. Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice

(*Oryza sativa* L.) // *Mol Genet Genomics*. – 2010. – Vol. 284(2). – P. 121–136. doi: 10.1007/s00438-010-0551-6.

148. Pareek A. Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. // *Funct Integr Genomics*. – 2009. – № 9. – P.109-123.

149. Parida, A.K., Das A.B., Mohanty P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes // *Journal of Plant Physiology*. – 2004. – №161. – P. 531–542.

150. Parida A.K., Sekhar S., Panda B.B., Sahu G., Shaw B.P. Effect of Panicle Morphology on Grain Filling and Rice Yield: Genetic Control and Molecular Regulation // *Front. Genet*. – 2022. – Vol. 13. doi: 10.3389/fgene.2022.876198.

151. Phukan U.J., Jindal S., Laldinsangi C., Singh P.K., Longchar B. A microscopic scenario on recovery mechanisms under waterlogging and submergence stress in rice // *Planta*. –2024. – Vol. 259(1). – P. 9. doi 10.1007/s00425-023-04285-y.

152. Platten, J.D. Salinity tolerance, Na⁺ exclusion and allele mining of HKT1;5 in *Oryza sativa* and *O. glaberrima*: many sources, many genes, one mechanism? / J.D. Platten, J.A. Egdane, A.M. Ismail // *BMC Plant Biol*. – 2013. – V. 13. – P. 2–16. doi:10.1186/1471-2229-13-32.

153. Powell W., Morgante M., Andre C, Hanafey M. A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis // *Mol. Breed*. –1996. – V. 2. – P. 225–238.

154. Prusty M.R., Kim S.R., Vinarao R., Entila F., Egdane J., Diaz M.G.Q., Jena K.K. Newly identified wild rice accessions conferring high salt tolerance might use a tissue tolerance mechanism in leaf // *Front Plant Sci*. – 2018. – 9:417. doi:10.3389/fpls.2018.00417.

155. Quan R., Wang J., Hui J., Bai H., Lyu X., Zhu Y., Zhang H., Zhang Z., Li S., Huang R. Improvement of Salt Tolerance Using Wild Rice Genes // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 8:2269. doi:10.3389/fpls.2017.02269.

156. Ren, H. Z., Gao J.P., Li L.G. et al. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter // *Nature Genetics*. – 2005. – V. 37. – P. 1141–1146.

157. Roy S.J., Sónia Negrao Mark Tester Salt resistant crop plants // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – Vol. 26. – P. 115–124. doi:10.1016/j.copbio.2013.12.004.

158. Salzberg S. L. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A / Salzberg S. L., Sommer D. D., Schatz M. C. [et al.] // *BMC Genomics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 204. doi:10.1186/1471-2164-9-204.

159. Sasaki T. Rice cultivars having a high capacity for regeneration from the anther callus, and their genealogies // *Japan. J. Breed*- 1986.- Vol. 36.- P.64-65.

160. Sasayama D., Okishio T., Hirano T., Fukayama H., Hatanaka T., Akimoto M., Azuma T. Internodal elongation under submergence in the Amazonian wild rice species *Oryza glumaepatula*: the growth response is induced by hypoxia but not by ethylene // *Plant Growth Regulation*. – 2018. – Vol. 85. – P. 123–132. doi:10.1007/s10725-018-0378-4.

161. Sato Y.L, Nakamura I., Kuroda Y. Semi-sterile perennial wild rice (*Oryza rufipogon*) as the progenitor *oi japonica* cultivar // *Proceedings of international genetic resources workshop on the genus Oryza*. – 2003. – P. 47–49.

162. Septiningsih E. M., Ignacio J. C. I., P. M. Sendon D., Sanchez D. L., Ismail A. M., Mackill D. J. QTL mapping and confirmation for tolerance of anaerobic conditions during germination derived from the rice landrace Ma-Zhan Red // *Theor Appl Genet*. – 2013. – Vol. 126. – P. 1357–1366. doi:10.1007/s00122-013-2057-1.

163. Setter T. L., Laureles E.V. The beneficial effect of reduced elongation growth on submergence tolerance of rice // *Journal of Experimental Botany*. –1996. – Vol. 47(10). – P. 1551–1559. doi:10.1093/jxb/47.10.1551.
164. Shahbaz M, Ashraf M. Improving salinity tolerance in cereals // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2013. – Vol. 32. – P. 237–249. doi: 10.1080/07352689.2013.758544.
165. Shang L., Li X., He H., Yuan Q., Song Y., Wei Z., Lin H. et al. A super pan-genomic landscape of rice // *Cell Research*. – 2022. – Vol. 32. – P. 878–896. doi: 10.1038/s41422-022-00685-z.
166. Shannon, M.C. Adaptation of plants to salinity // *Adv in Agron.* – 1997. – №60. – P. 75–120.
167. Sharma S.D., Shastry S.V.S. A modified classification // *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 1965. – 25. – P. 173–178.
168. Singh A., Carandang J., Gonzaga Z. J. C., Collard B. C. Y, Ismail A. M., Septiningsih E. M. Identification of QTLs for yield and agronomic traits in rice under stagnant flooding conditions // *Rice*. – 2017. – Vol. 10:15. doi:10.1186/s12284-017-0154-5.
169. Singh A., Sengar R.S. DNA Fingerprinting Based Decoding of Indica Rice (*Oryza sativa* L) Via Molecular Marker (SSR, ISSR, & RAPD) in Aerobic Condition // *Advances in Crop Science and Technology*. – 2015. – Vol. 3. – P. 2–8. doi: 10.4172/2329-8863.1000167.
170. Singh R. K., Kota S., Flowers T.J. Salt tolerance in rice: seedling and reproductive stage QTL mapping come of age. *Theoretical and Applied Genetics*. – 2021. – Vol. 134. – P. 3495–3533. doi:10.1007/s00122-021-03890-3.
171. Singh R. From QTL to variety- harnessing the benefits of QTLs for drought, flood and salt tolerance in mega rice varieties of India through a multi-institutional network / Singh R., Singh Y., Xalaxo S. [et al.] // *Plant Science*. – 2015. doi:10.1016/j.plantsci.2015.08.008.

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

173. Singh R.K., Redoña E.D., Refuerzo L. Varietal improvement for abiotic stress tolerance in crop plants: special reference to salinity in rice // *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. – 2010. – P. 387–415. doi:10.1007/978-90-481-3112-9_18.

174. Sun C.Q., Wang X.K., Yoshimura A., Doi K. Genetic differentiation for nuclear, mitochondrial and chloroplast genomes in common wild rice (*Oryza rufipogon Griff.*) and cultivated rice (*Oryza sativa L.*) // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – V.104. – P. 1335–1345.

175. Sweeney M., McCouch S. The Complex History of the Domestication of Rice // *Annals of Botany*. – 2007. – Vol. 100. – P. 951–957. doi:10.1093/aob/mcm128.

176. Talebi R., Rahemi M.R., Arefi H., Nourozi M., Bagheri N. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa L.*) cultivars // *Pak. J. Biological Sci.* – 2007. – Vol. 10. – P. 2056–2060. doi:10.3923/pjbs.2007.2056.2060.

177. Tang W., Lin J., Wang Y., An H., Chen H., Pan G., Zhang S., Guo B., Yu K., Li H., Fang X., Zhang Y. Selection and Validation of 48 KASP Markers for Variety Identification and Breeding Guidance in Conventional and Hybrid Rice (*Oryza sativa L.*) // *Rice*. – 2022. – Vol. 15:48. doi:10.1186/s12284-022-00594-0RESEARCH.

178. Thomson M. J., Ocampo M., Egdane J., Rahman M. A., Sajise A. G., Adorada D. L., Singh R. K., Gregorio G. B., Ismail A. M. Characterizing the Saltol Quantitative Trait Locus for Salinity Tolerance in Rice // *Agricultural Plant Science*. – 2010. – Vol. 3(2). – P. 148–160. doi: 10.1007/s12284-010-9053-8.

179. Thomson M.J., Ismail A.M., McCouch S.R., Mackill M.J. Marker assisted breeding. In: Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, Govindjee (eds) *Abiotic*

stress adaptation in plants, physiological, molecular and genomic foundation // Springer, New York. –2010. – P. 451–469.

180. Tian, L., Tan, L. B., Liu, F. X., Cai, H. W., Sun, C. Q. Identification of quantitative trait loci associated with salt tolerance at seedling stage from *Oryza rufipogon*. *J. // Genet. Genomics.* – 2011. – Vol. 38 (12). – P. 593–601. doi:10.1016/j.jgg.2011.11.005.

181. Vaughan D.A., Lu B., Tomooka N. The evolving story of rice evolution // *Plant Science.* – 2008. – Vol. 174 (4). – P. 394–408. doi:10.1016/j.plantsci.2008.01.016.

182. Vaughan D.A., Morishima H., Kadowaki K. Diversity in the *Oryza* genus // *Current Opinion in Plant Molecular Biology.* – 2003. – Vol. 6. – P. 139–146.

183. Vitte, C., F. Lamy, Ishii T., Brar D. S., Panaud O. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa*, L.) // *Mol. Gen. Genomics.* – 2004. – Vol. 272. – P. 504–511. doi:10.1007/s00438-004-1069-6.

184. Wang Z., Chen Z., Cheng J., Lai Y., Wang J., Bao Y., Huang J., Zhang H. QTL analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in roots and shoots under different levels of NaCl stress in rice (*Oryza sativa* L.) // *PLoS One.* –2012. – Vol. 7(12):e51202. doi:10.1371/journal.pone.0051202.

185. Wang, Z. Y., Second G., Tanksley S. D. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs // *Theor. Appl. Genet.* – 1992. –Vol. 83. – P. 565–581.

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

187. Woo S.C., Mok T., Huang C.Y. Anter culture of *Oryza sativa* L., *Oryza perennis* Moench hybrids // *Bot. Bull. Acad. Sci. (Taiwan).* – 1978. – Vol. 19. – P. 171–178.

188. Xu K., Xu X., Fukao T., Canlas P., Maghirang-Rodriguez R., Heuer S., Ismail A., Bailey-Serres J., Ronald P., Mackill D. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice // *Nature*. – 2006. – T. – 442. – C. 705–708. doi:10.1038/nature04920.
189. Xu K., Xu X., Ronald P. C., Mackill D. J. A high-resolution linkage map in the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1 // *Mol. Gen. Genet.* – 2000. – № 263. – P. 681– 689.
190. Yang J., Guo Z., Luo L., Gao Q., Xiao W., Wang J., Wang H., Chen Z., Guo T. Identification of QTL and candidate genes involved in early seedling growth in rice via high-density genetic mapping and RNA-seq // *The Crop Journal*. – 2021. – V.9. – P. 360–371. www.elsevier.com/locate/cj.
191. Yang J., Sun K., Li D., Luo L., Liu Y., Huang M., Yang G., Liu H., Wang H., Chen Z., Guo T. Identification of stable QTLs and candidate genes involved in anaerobic germination tolerance in rice via high-density genetic mapping and RNA-Seq // *BMC Genomics*. – 2019. – Vol. 20. – P. 355. doi:10.1186/s12864-019-5741-y.
192. Yin W., Lu T., Chen Z., Lu T., Ye H., Mao Y., Luo Y., Lu M., Zhu X., Yuan X., Rao Y., Wang Y. Quantitative trait locus mapping and candidate gene analysis for salt tolerance at bud stage in rice // *Front. Plant Sci.* – 2022. Vol. 13. doi:10.3389/fpls.2022.1041081/
193. Zeng L., Poss J. A., Wilson C. et al. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by physiological characters // *Euphytica*. – 2003. – Vol. 129 (3). – P. 281–292.
194. Zhang J.; Lu H., Gu W., Wu N., Zhou K., Hu Y., Xin Y., Wang C., Kashkush K. Early Mixed Farming of Millet and Rice 7800 Years Ago in the Middle Yellow River Region, China // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7(12):e52146. doi:10.1371/journal.pone.0052146.
195. Zhao J., He Y., Huang S., Wang Z. Advances in the Identification of Quantitative Trait Loci and Genes Involved in Seed Vigor in Rice // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – Vol. 12. doi:10.3389/fpls.2021.659307.

196. Zhu Q. H., Ge S. Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes // *New Phytol.* – 2005. – Vol. 167. – P. 249–265. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01406.x.

197. Zhu J., Gale M.D., Quarre S. AFLP markers for the study of rice biodiversity // *Theor. Appl. Genetic.* – 1998. – V.96. – P. 602–611.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 1– Оценка наличия генов устойчивости к глубоководному затоплению в гибридных образцах риса

№	Комбинация скрещивания	Наличие локуса				
		<i>Sub1A</i>	<i>SK1</i>	<i>SK2</i>	<i>AG1</i>	<i>AG2</i>
4141	(Swarna x Новатор) x (Ил14 x 10136)	+				
4142	(Swarna x Новатор) x (Ил14 x 10136)	+				
4144	(Swarna x Новатор) x (Ил14 x 10136)	+				
4191	Swarna x Магнат	+				
4192	Swarna x Магнат	+				
4193	Swarna x Магнат	+				
4195	Swarna x Магнат	+				
4196	Swarna x Магнат	+				
4198	Swarna x Магнат	+				
5588/1	Swarna x Магнат	+				
5589/1	Swarna x Магнат	+				
5589/3	Swarna x Магнат	+				
4148	Inbara-3 x Новатор	+				
4149	Inbara-3 x Новатор	+				
4145	Inbara-3 x Новатор	+				
4146	Inbara-3 x Новатор	+				
4147	Inbara-3 x Новатор	+				
4153	Inbara-3 x Новатор	+				
4210	Inbara-3 x Новатор	+				
4216	Inbara-3 x Новатор	+				
4303	Inbara-3 x Новатор	+				
3121	Inbara-3 x Новатор	+				
3122	Inbara-3 x Новатор	+				
3123	Inbara-3 x Новатор	+				
3124	Inbara-3 x Новатор	+				
3125	Inbara-3 x Новатор	+				
3125/1	Inbara-3 x Новатор	+				
3126	Inbara-3 x Новатор	+				
3130	Inbara-3 x Новатор	+				
3131	Inbara-3 x Новатор	+				
3131/1	Inbara-3 x Новатор	+				
3223	Inbara-3 x Новатор	+				
3230	Inbara-3 x Новатор	+				
5620/1	Inbara-3 x Новатор	+				
4225	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4226	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4227	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4228	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4229	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4230	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4231	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4232	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4233	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4234	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				

4235	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4248	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4249	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4250	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4251	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4252	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4253	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	+				
4254	(Inbara-3 x Контакт) x (Khao Hlan On x Кубояр)		+			
4255	(Inbara-3 x Контакт) x (Khao Hlan On x Кубояр)		+			
4641	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	+				
4236	Inbara-3 x Контакт	+				
4271	Inbara-3 x Контакт	+				
4272	Inbara-3 x Контакт	+				
4273	Inbara-3 x Контакт	+				
4154	Inbara-3 x Степняк	+				
4155	Inbara-3 x Степняк	+				
4306	Inbara-3 x Степняк	+				
4307	Inbara-3 x Степняк	+				
4308	Inbara-3 x Степняк	+				
4285	Inbara-3 x Боярин	+				
4286	Inbara-3 x Командор	+				
4181	Inbara-3 x Командор	+				
4182	Inbara-3 x Командор	+				
4183	Inbara-3 x Командор	+				
5576	Inbara-3 x Командор	+				
5591	Inbara-3 x Бахус	+				
5618	Inbara-3 x Бахус	+				
4201	Бахус x Inbara-3	+				
4202	Бахус x Inbara-3	+				
4204	Бахус x Inbara-3	+				
4205	Бахус x Inbara-3	+				
4206	Бахус x Inbara-3	+				
4207	Бахус x Inbara-3	+				
4208	Бахус x Inbara-3	+				
4337	Бахус x Inbara-3	+				
4338	Бахус x Inbara-3	+				
4343	Бахус x Inbara-3	+				
4344	Бахус x Inbara-3	+				
4246	(Inbara-3 x Новатор) x (Ил14 x Кубояр)	+				
4247	(Inbara-3 x Новатор) x (Ил14 x Кубояр)	+				
4245	(Inbara-3x Новатор) x (Ил14 x Кубояр)	+				
4156	TDK-1 x Новатор	+				
4157	TDK-1 x Новатор	+				
4170	TDK-1 x Новатор	+				
4221	TDK-1 x Новатор	+				
4222	TDK-1 x Новатор	+				
4223	TDK-1 x Новатор	+				
4310	TDK-1 x Новатор	+				

4335	TDK-1 x Новатор	+				
4336	TDK-1 x Новатор	+				
4403	TDK-1 x Новатор	+				
5463/1	TDK-1 x Новатор	+				
4158	BR-11 x Новатор	+				
4166	BR-11 x Новатор	+				
4167	BR-11 x Новатор	+				
4168	BR-11 x Новатор	+				
4209	BR-11 x Новатор	+				
4313	BR-11 x Новатор	+				
4314	BR-11 x Новатор	+				
4315	BR-11 x Новатор	+				
4316	BR-11 x Новатор	+				
4317	BR-11 x Новатор	+				
4318	BR-11 x Новатор	+				
4321	BR-11 x Новатор	+				
4322	BR-11 x Новатор	+				
4323	BR-11 x Новатор	+				
4324	BR-11 x Новатор	+				
4325	BR-11 x Новатор	+				
5618	BR-11 x Новатор	+				
5619	BR-11 x Новатор	+				
5620	BR-11 x Новатор	+				
5443	BR-11 x Новатор	+				
5461	BR-11 x Новатор	+				
5699	BR-11 x Новатор	+				
4162	(BR-11 x Новатор) x Контакт	+				
4163	(BR-11 x Новатор) x Контакт	+				
4164	(BR-11 x Новатор) x Боярин	+				
4261	(BR-11 x Новатор) x Боярин	+				
4262	(BR-11 x Новатор) x Боярин	+				
4264	(BR-11 x Новатор) x Боярин	+				
4288	BR-11x Магнат	+				
4175	BR-11 x Кубань-3	+				
4178	BR-11 x Кубань-3	+				
5575/1	BR-11 x Кубань-3	+				
5575/2	BR-11 x Кубань-3	+				
5575/3	BR-11 x Кубань-3	+				
4241	(BR-11 x Новатор) x (Бахус x Боярин)	+				
4242	(BR-11 x Новатор) x (Бахус x Боярин)	+				
4265	(BR-11 x Новатор) x Кубань-3	+				
4266	(BR-11 x Новатор) x Кубань-3	+				
4267	(BR-11 x Новатор) x Кубань-3	+				
4268	(BR-11 x Новатор) x Кубань-3	+				
4270	(BR-11 x Новатор) x Бахус	+				
4161	IR-64 x Новатор	+				
4218	IR-64 x Новатор	+				
4185	IR-64 x Боярин	+				

4187	IR-64 x Боярин	+				
5577	IR-64 x Боярин	+				
5578	IR-64 x Боярин	+				
4189	IR-64 x Магнат	+				
4565	IR-64 x Магнат	+				
5579	IR-64 x Магнат	+				
4169	CR-1009 x Новатор	+				
4327	CR-1009 x Новатор	+				
4328	CR-1009 x Новатор	+				
4329	CR-1009 x Новатор	+				
4330	CR-1009 x Новатор	+				
5541/3	CR-1009 x Новатор	+				
4172	(CR-1009 x Новатор) x Магнат	+				
4174	(CR-1009 x Новатор) x Магнат	+				
4289	(CR-1009(Sub-1) x Новатор) x Магнат	+				
4291	(CR-1009 x Новатор) x Магнат	+				
4293	(CR-1009 x Новатор) x Магнат	+				
4237	KD (KhanDan) x Боярин	+				
4282	KD x Боярин	+				
4275	KD x Командор	+				
4276	KD x Командор	+				
4277	KD x Командор	+				
4278	KD x Командор	+				
4281	KD x Командор	+				
4283	Контакт x Kharsu 80A		+			
4284	Контакт x Kharsu 80A		+		+	+
4366	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4367	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4368	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4369	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4370	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4371	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4372	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4373	Кубояр x Kharsu 80A				+	
4374	Кубояр x Kharsu 80A				+	
4375	Кубояр x Kharsu 80A				+	+
4773	Кубояр x Kharsu 80A		+			
4381	Kharsu 80A x Контакт		+		+	+
4389	Kharsu 80A x Контакт		+			
4390	Kharsu 80A x Контакт		+			+
4391	Kharsu 80A x Контакт		+			
4392	Kharsu 80A x Контакт		+		+	
4393	Kharsu 80A x Контакт		+		+	
4394	Kharsu 80A x Контакт				+	+
4395	Kharsu 80A x Контакт		+			
4396	Kharsu 80A x Контакт		+		+	
4397	Kharsu 80A x Контакт		+		+	+
4398	Kharsu 80A x Контакт		+			+

Продолжение таблицы 1

4401	Kharsu 80A x Контакт		+			
4402	Kharsu 80A x Контакт		+			
4792	Kharsu 80A x Контакт		+			
4798	Kharsu 80A x Контакт		+			
4794	Kharsu 80A x Контакт		+			
4351	Контакт x Khao Hlan On			+		+
4352	Контакт x Khao Hlan On			+	+	+
4353	Контакт x Khao Hlan On			+		
4354	Контакт x Khao Hlan On			+	+	
4355	Контакт x Khao Hlan On			+	+	+
4356	Контакт x Khao Hlan On			+		+
4357	Контакт x Khao Hlan On		+		+	+
4358	Контакт x Khao Hlan On				+	
4361	Контакт x Khao Hlan On			+	+	+
4362	Контакт x Khao Hlan On		+	+	+	
4363	Контакт x Khao Hlan On		+	+	+	
4364	Контакт x Khao Hlan On			+	+	
4744/2	Контакт x Khao Hlan On			+		
4744	Контакт x Khao Hlan On			+		
4365	Контакт x Khao Hlan On		+			+
4745	Контакт x Khao Hlan On		+			
4746	Контакт x Khao Hlan On		+			
4383	Khao Hlan On x Контакт				+	+
4384	Khao Hlan On x Кубояр		+		+	+
4385	Khao Hlan On x Кубояр		+		+	+
4386	Khao Hlan On x Кубояр		+		+	+
4387	Khao Hlan On x Кубояр		+		+	+
4388	Khao Hlan On x Кубояр			+	+	+
4787	Khao Hlan On x Кубояр		+			
4784	Khao Hlan On x Кубояр		+			
4376	Кубояр x Mazhan Red		+		+	+
4377	Кубояр x Mazhan Red			+	+	+
4378	Кубояр x Mazhan Red				+	+

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица 2 – Оценка наличия генов *Saltol*, *SKC1* и *SNC* в гибридных образцах риса

№	Гибридная комбинация	Наличие локуса		
		<i>Saltol</i>	<i>SKC1</i>	<i>SNC</i>
623	IR74099 x Новатор	+	-	-
624	IR74099 x Новатор	+	-	-
1657	(IR52713 x Новатор) x Контакт	+	+	-
2010	R17(IR86385) x Боярин	+	-	+
2032	R26(IR86385) x Контакт	+	+	-
2033	R26(IR86385) x Контакт	-	+	-
2364	R26(IR86385) x Контакт	-	+	-
2565	Pokkali x Новатор	+	-	-
3136	IR-45427 x Новатор	+	-	-
3137	IR52713 x Новатор	+	+	-
3143	IR52713 x Новатор	+	+	-
3177	IR52713 x Новатор	+	+	-
3181	IR52713 x Новатор	+	+	-
3192	IR52713 x Новатор	+	+	-
3194	IR52713 x Новатор	+	+	-
3198	IR52713 x Новатор	+	+	-
3212	IR52713 x Новатор	+	+	-
3214	IR74099 x Новатор	+	-	-
3251	IR74099 x Новатор	+	-	-
3734	IR74099 x Новатор	+	-	-
3735	IR74099 x Новатор	+	-	-
4383	IR52713 x Новатор	+	+	-
4448	IR52713 x Новатор	+	+	-
2769	IR74099 x Новатор	+	-	-
2770	IR74099 x Новатор	+	-	-
2772	IR74099 x Новатор	+	-	-
2776	IR52713 x Новатор	-	+	-
2773	IR74099 x Новатор	+	-	-
2775	R17(IR86385) x Боярин	-	-	+
1963	R17(IR86385) x Боярин	-	-	+
1962	R17(IR86385) x Боярин	-	-	+
1964	IR52713 x Новатор	-	+	-
1961	IR52713 x Новатор	-	+	-
2774	IR74099 x Новатор	+	-	-
2771	IR74099 x Новатор	+	-	-
2519	R17(IR86385) x Боярин	-	-	+
2767	IR74099 x Новатор	+	-	-
2520	IR74099 x Новатор	+	-	-
1960	IR74099 x Контакт	+	-	-
1658	IR52713 x Новатор	-	+	-
1958	IR52713 x Новатор	-	+	-
1959	R17(IR86385) x Боярин	-	-	+
1957	IR74099 x Новатор	+	-	-
1955	IR74099 x Новатор	+	-	-
1956	IR74099 x Контакт	+	-	-

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица 3 – Характеристика селекционных образцов риса по комплексу хозяйственно ценных признаков устойчивых к глубоководному затоплению и хлоридному засолению

№	Комбинация скрещивания	Вегетационный период, дней	Высота растений, см	Длина метелки, см	Количество зерен с 1 метелки, шт.	Масса 1000 зерен, г
4141	(Swarna x Новатор) x (Ил14 x 10136)	125	80	16,3	127	25,8
4142	(Swarna x Новатор) x (Ил14 x 10136)	119	75	15,3	126	25,6
4144	(Swarna x Новатор) x (Ил14 x 10136)	113	70	15	119	25,1
4191	Swarna x Магнат	120	74	16	129	29,1
4192	Swarna x Магнат	130	74	15	131	28,8
4193	Swarna x Магнат	123	82	13,8	127	29,1
4195	Swarna x Магнат	123	85	15,8	126	28,5
4196	Swarna x Магнат	123	77	16,5	119	27,7
4198	Swarna x Магнат	119	82	16,3	130	27,5
5588/1	Swarna x Магнат	120	82	16	128	29,1
5589/1	Swarna x Магнат	123	83	15,8	127	28,8
5589/3	Swarna x Магнат	116	90	16,5	126	28,7
4148	Inbara-3 x Новатор	125	72	17,3	130	29,3
4149	Inbara-3 x Новатор	116	73	16	128	25,2
4145	Inbara-3 x Новатор	123	75	16	128	24,3
4146	Inbara-3 x Новатор	118	75	17,2	129	30,2
4147	Inbara-3 x Новатор	118	65	17	128	24,9
4153	Inbara-3 x Новатор	119	68	16	119	27,1
4210	Inbara-3 x Новатор	120	64	13,7	123	26,8
4216	Inbara-3 x Новатор	123	75	17	127	27,6
4303	Inbara-3 x Новатор	118	70	18,8	131	28,1
3121	Inbara-3 x Новатор	111	88	18,1	127	29,3
3122	Inbara-3 x Новатор	119	76	17,3	118	25,2
3123	Inbara-3 x Новатор	117	95	15,6	125	24,5
3124	Inbara-3 x Новатор	129	85	16,3	130	27,3
3125	Inbara-3 x Новатор	125	89	16,5	128	24,3
3125/1	Inbara-3 x Новатор	115	91	15,7	127	30,2
3126	Inbara-3 x Новатор	120	78	18,6	132	24,9
3130	Inbara-3 x Новатор	118	69	18,5	127	27,1
3131	Inbara-3 x Новатор	119	75	18,1	118	26,8
3131/1	Inbara-3 x Новатор	116	73	15,6	125	25,6
3223	Inbara-3 x Новатор	129	82	15,8	130	31,9

Продолжение таблицы 3

3230	Inbara-3 x Новатор	119	84	17,1	128	26,4
5620/1	Inbara-3 x Новатор	115	79	16,8	132	24,1
4225	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	123	67	16,3	125	29,7
4226	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	130	77	14,8	130	31,7
4227	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	119	60	15,5	128	28,2
4228	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	119	66	15,5	127	26,4
4229	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	120	71	17	132	27,4
4230	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	116	67	15,2	129	29,5
4231	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	113	73	15	127	27,6
4232	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	123	75	17,8	118	28,5
4233	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	113	67	15	125	29,1
4234	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	119	68	14,5	130	26,5
4235	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	123	84	16,8	128	30,1
4248	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	123	81	15,3	127	28,2
4249	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	113	73	15	132	29,1
4250	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	123	77	15,8	129	28,1
4251	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	120	62	15,5	116	27,6
4252	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	119	77	15	118	28,4
4253	(Inbara-3 x Новатор) x Контакт	116	65	15,3	123	24,3
4254	(Inbara-3 x Контакт) x (Khao Hlan On x Кубояр)	111	70	14,8	136	29,6
4255	(Inbara-3 x Контакт) x (Khao Hlan On x Кубояр)	116	78	14,3	132	29,2
4641	(Inbara-3 x Контакт) x Khao Hlan On	115	66	14,8	128	27,8
4236	Inbara-3 x Контакт	116	81	19,3	130	29,7
4271	Inbara-3 x Контакт	111	72	14,5	128	28,5
4272	Inbara-3 x Контакт	113	73	16,3	134	28,1
4273	Inbara-3 x Контакт	111	70	15	131	28,8
4154	Inbara-3 x Степняк	123	74	18,5	128	26,3
4155	Inbara-3 x Степняк	116	73	19,5	137	30,6
4306	Inbara-3 x Степняк	118	73	15,5	129	30,5
4307	Inbara-3 x Степняк	118	76	19,5	135	28,4
4308	Inbara-3 x Степняк	123	71	13,8	127	26,3
4285	Inbara-3 x Боярин	111	68	14,5	126	29,8
4286	Inbara-3 x Командор	130	82	17	129	23,8
4181	Inbara-3 x Командор	120	77	15,5	132	29,3
4182	Inbara-3 x Командор	123	75	16	130	29,7
4183	Inbara-3 x Командор	120	80	16,3	128	28,8
5576	Inbara-3 x Командор	115	83	14,8	129	29,6
5591	Inbara-3 x Бахус	117	95	16,6	133	29,9
5618	Inbara-3 x Бахус	120	68	15,1	137	28,9
4201	Бахус x Inbara-3	113	75	17,8	135	31,2
4202	Бахус x Inbara-3	113	73	17	127	29,1
4204	Бахус x Inbara-3	113	77	17,8	139	30,1
4205	Бахус x Inbara-3	113	74	17,3	137	30,7
4206	Бахус x Inbara-3	116	87	17,3	128	31,9
4207	Бахус x Inbara-3	116	78	17,8	133	34,2
4208	Бахус x Inbara-3	111	78	15,3	128	32,9
4337	Бахус x Inbara-3	113	81	18,8	137	30,8
4338	Бахус x Inbara-3	116	72	19	129	33,8
4343	Бахус x Inbara-3	111	75	17,8	140	32,1

Продолжение таблицы 3

4344	Бахус x Inbara-3	113	75	17	138	27,7
4246	(Inbara-3 x Новатор) x (Ил14 x Кубояр)	123	79	15,8	126	28,1
4247	(Inbara-3 x Новатор) x (Ил14 x Кубояр)	116	79	15,3	131	28,8
4245	(Inbara-3x Новатор) x (Ил14 x Кубояр)	120	74	15	133	30,5
4156	TDK-1 x Новатор	120	58	18,5	126	30,8
4157	TDK-1 x Новатор	120	78	18,5	134	30,7
4170	TDK-1 x Новатор	125	73	15,8	128	23,3
4221	TDK-1 x Новатор	111	68	14,5	137	29,3
4222	TDK-1 x Новатор	111	68	14,3	142	28,5
4223	TDK-1 x Новатор	116	70	13,2	139	26,3
4310	TDK-1 x Новатор	123	72	18,3	123	23,7
4335	TDK-1 x Новатор	118	80	15,8	128	26,9
4336	TDK-1 x Новатор	119	86	18,8	137	29,8
4403	TDK-1 x Новатор	116	81	17,3	142	24,1
5463/1	TDK-1 x Новатор	125	70	15,8	141	23,3
4158	BR-11 x Новатор	119	72	17	129	28,6
4166	BR-11 x Новатор	130	80	17,5	146	27,6
4167	BR-11 x Новатор	111	74	14,5	132	28,8
4168	BR-11 x Новатор	113	70	16,8	150	26,8
4209	BR-11 x Новатор	119	83	15,8	126	31,2
4313	BR-11 x Новатор	111	85	14,3	137	27,1
4314	BR-11 x Новатор	119	86	18,8	142	28,3
4315	BR-11 x Новатор	111	73	14,5	139	28,9
4316	BR-11 x Новатор	118	75	13,5	127	27,7
4317	BR-11 x Новатор	116	71	16,8	123	26,5
4318	BR-11 x Новатор	116	61	15,2	128	29,9
4321	BR-11 x Новатор	113	72	14	137	28,1
4322	BR-11 x Новатор	120	85	16,3	142	29,2
4323	BR-11 x Новатор	111	73	14,5	139	26,3
4324	BR-11 x Новатор	116	70	13,8	127	29,1
4325	BR-11 x Новатор	111	72	16	124	30,7
5618	BR-11 x Новатор	130	80	17,5	146	27,6
5619	BR-11 x Новатор	111	74	14,5	132	28,8
5620	BR-11 x Новатор	113	70	16,8	150	26,8
5443	BR-11 x Новатор	111	67	16	134	28,1
5461	BR-11 x Новатор	118	75	13,5	139	27,7
5698	BR-11 x Новатор	116	71	16,8	127	26,5
5699	BR-11 x Новатор	116	61	15,2	124	29,9
4162	(BR-11 x Новатор) x Контакт	111	73	15,3	134	28,6
4163	(BR-11 x Новатор) x Контакт	109	67	14,3	123	28,9
4164	(BR-11 x Новатор) x Боярин	111	70	14	139	28,5
4261	(BR-11 x Новатор) x Боярин	111	73	14,8	124	31,1
4262	(BR-11 x Новатор) x Боярин	119	80	14,3	137	30,5
4264	(BR-11 x Новатор) x Боярин	127	52	12,8	128	30,5
4288	BR-11x Магнат	121	68	15,5	125	27,8
4175	BR-11 x Кубань-3	119	79	14,8	132	28,6
4178	BR-11 x Кубань-3	116	73	14	120	24,8

Продолжение таблицы 3

5575/1	BR-11 х Кубань-3	111	77	15,1	129	26,6
5575/2	BR-11 х Кубань-3	115	70	16,2	127	28,1
5575/3	BR-11 х Кубань-3	120	72	14,9	126	25,7
4241	(BR-11 х Новатор) х (Бахус х Боярин)	118	65	14,5	127	29,1
4242	(BR-11 х Новатор) х (Бахус х Боярин)	111	73	13,8	124	29,9
4265	(BR-11 х Новатор) х Кубань-3	116	69	15	132	30,7
4266	(BR-11 х Новатор) х Кубань-3	119	78	14,8	126	27,4
4267	(BR-11 х Новатор) х Кубань-3	111	70	14	134	26,6
4268	(BR-11 х Новатор) х Кубань-3	118	75	17,3	146	29,7
4270	(BR-11 х Новатор) х Бахус	130	78	19	133	28,2
4161	IR-64 х Новатор	120	80	17	131	30,5
4218	IR-64 х Новатор	120	56	16,1	128	27,8
4185	IR-64 х Боярин	126	65	17,3	145	24,3
4187	IR-64 х Боярин	123	82	18	137	26,8
5577	IR-64 х Боярин	125	69	16,9	138	28,1
5578	IR-64 х Боярин	120	80	17,1	146	26,3
4189	IR-64 х Магнат	118	75	16,8	129	24,8
4565	IR-64 х Магнат	115	71	15,9	134	26,5
5579	IR-64 х Магнат	110	87	16	139	20,3
4169	CR-1009 х Новатор	116	81	17,3	121	28,1
4327	CR-1009 х Новатор	120	85	16,3	118	28,4
4328	CR-1009 х Новатор	120	81	16,8	122	27,4
4329	CR-1009 х Новатор	119	85	16,8	124	26,9
4330	CR-1009 х Новатор	120	83	16,8	126	26,1
5541/3	CR-1009 х Новатор	118	83	16,3	126	28,3
4172	(CR-1009 х Новатор) х Магнат	118	70	15	139	32,2
4174	(CR-1009 х Новатор) х Магнат	118	74	13,8	124	29,6
4289	(CR-1009 х Новатор) х Магнат	123	75	16,8	137	30,5
4291	(CR-1009 х Новатор) х Магнат	119	80	17,2	139	28,4
4293	(CR-1009 х Новатор) х Магнат	116	82	15,3	132	32,5
4237	KD (Khan Dan) х Боярин	120	68	18,5	123	28,2
4282	KD х Боярин	120	83	14,8	129	26,2
4275	KD х Командор	111	70	18	127	27,1
4276	KD х Командор	120	73	15,3	130	31,8
4277	KD х Командор	116	72	16,3	129	27,7
4278	KD х Командор	120	75	17,5	125	27,5
4281	KD х Командор	116	70	14,8	121	25,8
4283	Контакт х Kharsu 80A	119	70	15	130	29,8
4284	Контакт х Kharsu 80A	120	75	16,3	128	27,4
4366	Кубояр х Kharsu 80A	120	83	15,3	132	27,8
4367	Кубояр х Kharsu 80A	109	74	14	128	28,8
4368	Кубояр х Kharsu 80A	109	75	15,3	125	28,4
4369	Кубояр х Kharsu 80A	113	68	15,3	120	27
4370	Кубояр х Kharsu 80A	123	84	16,3	130	26,8
4371	Кубояр х Kharsu 80A	120	80	16	129	27,3
4372	Кубояр х Kharsu 80A	113	80	17,3	127	29,3
4373	Кубояр х Kharsu 80A	116	79	17,3	126	29
4374	Кубояр х Kharsu 80A	113	68	14,2	129	30,7

Продолжение таблицы 3

4375	Кубояр x Kharsu 80A	106	70	17,8	125	28,7
4773	Кубояр x Kharsu 80A	106	74	16,8	121	29,2
4381	Kharsu 80A x Контакт	109	75	14	137	31,1
4389	Kharsu 80A x Контакт	113	75	13,8	139	26,7
4390	Kharsu 80A x Контакт	118	83	14,3	146	26,2
4391	Kharsu 80A x Контакт	116	75	16,3	132	27,1
4392	Kharsu 80A x Контакт	116	77	16	150	26,8
4393	Kharsu 80A x Контакт	120	74	16,8	126	25,9
4394	Kharsu 80A x Контакт	116	65	13,8	134	26,7
4395	Kharsu 80A x Контакт	127	75	18,3	123	29,7
4396	Kharsu 80A x Контакт	113	76	16	128	31,9
4397	Kharsu 80A x Контакт	116	80	15	129	26,1
4398	Kharsu 80A x Контакт	116	70	18	125	26,5
4401	Kharsu 80A x Контакт	125	79	16	121	31
4402	Kharsu 80A x Контакт	123	78	17,5	130	28,6
4792	Kharsu 80A x Контакт	118	83	14,3	146	26,2
4798	Kharsu 80A x Контакт	115	73	15,2	140	30,9
4794	Kharsu 80A x Контакт	120	74	13,7	129	29,3
4351	Контакт x Khao Hlan On	116	81	14,5	129	22,1
4352	Контакт x Khao Hlan On	120	77	18,3	146	25,8
4353	Контакт x Khao Hlan On	116	75	19,8	132	27,3
4354	Контакт x Khao Hlan On	125	80	14,3	150	27,4
4355	Контакт x Khao Hlan On	116	79	15,5	126	29,5
4356	Контакт x Khao Hlan On	119	75	16	134	27,5
4357	Контакт x Khao Hlan On	116	73	15,3	128	28,7
4358	Контакт x Khao Hlan On	119	65	15,5	137	25,6
4361	Контакт x Khao Hlan On	119	68	14	142	28,8
4362	Контакт x Khao Hlan On	109	74	14,8	139	29,2
4363	Контакт x Khao Hlan On	111	75	15	127	28,5
4744/2	Контакт x Khao Hlan On	119	68	14	142	28,8
4744	Контакт x Khao Hlan On	120	77	18,3	146	25,8
4365	Контакт x Khao Hlan On	109	78	15	128	29,7
4745	Контакт x Khao Hlan On	114	80	15,6	132	28,9
4746	Контакт x Khao Hlan On	112	78	16,4	134	29,5
4383	Khao Hlan On x Контакт	116	83	17	139	28,2
4384	Khao Hlan On x Кубояр	116	73	15,5	124	30,1
4386	Khao Hlan On x Кубояр	116	73	16,5	141	29,9
4387	Khao Hlan On x Кубояр	113	65	15,3	139	30,4
4376	Кубояр x Mazhan Red	123	85	16	150	25,7
4377	Кубояр x Mazhan Red	116	88	13,3	126	25,3
4378	Кубояр x Mazhan Red	123	84	17,3	134	29,4
	\bar{x}	118	76	16,0	131	28,0
	Max	130	95	19,8	150	34,2
	Min	106	52	12,8	116	20,3
	s	4,8	7,2	1,4	7,1	2,2