Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби

УДК 575: 631.527.5: 633. 18 (043.3)

На правах рукописи

МЫНБАЕВА ДАНА ОМАРОВНА

Создание предселекционных ресурсов риса с генами устойчивости к пирикуляриозу методом маркерной селекции

8D05104 – Генетика

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Отечественный научный консультант:
Усенбеков Б.Н., к.б.н.,
ассоциированный профессор

Зарубежный научный консультант:
Wenjing Zheng, PhD, профессор

Республика Казахстан
Алматы, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ		4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ		5
ВВЕДЕНИЕ		6
1	**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**	12
1.1	Морфобиологические особенности риса	12
1.1.2	История одомашнивания риса	18
1.1.3	Производство риса в мире и в Казахстане	19
1.2	Геномные исследования культурных и диких видов риса	23
1.3	Глобальное и региональное значение эпидемии пирикуляриоза риса в настоящем и будущем контексте	25
1.4	Возбудитель пирикуляриоза риса	26
1.4.1	Факторы, связанные с патогенностью *M. oryzae*	28
1.4.2	Гены резистентности как индивидуальные защитники и механизм устойчивости к пирикуляриозу	29
1.4.3	Реакция устойчивости риса к пирикуляриозу	34
1.5	Молекулярные механизмы поражения листьев, метелок и стеблей	36
1.6	Значимость гаплоидной биотехнологии в селекции риса и в получении материала с желаемыми признаками	37
1.7	Генетико-селекционные подходы к формированию продуктивности риса и механизмам её повышения	40
2	**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**	42
2.1	Материалы исследования	42
2.2	Методы исследования	43
2.2.1	Получение гибридов риса методом традиционной селекции	43
2.2.2	Выделение ДНК из этиолированных проростков риса	45
2.2.3	Проведение ПЦР анализа на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу	46
2.2.4	Скрининг гибридов риса на устойчивость к пирикуляриозу в инфекционном питомнике	47
2.2.5	Использование методов культуры пыльников в *in vitro* для стабилизации хозяйственно-ценных признаков у F_2 поколения	48
2.2.6	Статистический анализ элементов структуры урожая у перспективных гибридов риса у F_2-F_3 поколения	49
3	**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**	50
3.1	Скрининг исходных сортообразцов риса отечественной и зарубежной селекции на наличие генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* на основе молекулярно-генетического подхода с использованием генов *Pi* комплекса	50

3.2 Интрогрессия генов устойчивости *Pi* комплекса к пирикуляриозу в казахстанские сорта риса 56
3.2.1 Контроль генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* у интрогрессированных отечественных гибридах и исходных родительских форм 63
3.3 Проведение фитопатологического теста для оценки созданных гибридов на устойчивость к *Magnaporthe oryzae* 79
3.4 Получение растений-регенерантов в культуре изолированных пыльников для создания дигаплоидных растений с целью закрепления признака устойчивости к пирикуляриозу 86
3.5 Анализ элементов структуры урожая перспективных гибридов F_{2-3} поколении 93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 103
ПРИЛОЖЕНИЕ А 117
ПРИЛОЖЕНИЕ Б 118
ПРИЛОЖЕНИЕ В 119
ПРИЛОЖЕНИЕ Г 120
ПРИЛОЖЕНИЕ Д 121
ПРИЛОЖЕНИЕ Е 122
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж 123
ПРИЛОЖЕНИЕ З 124
ПРИЛОЖЕНИЕ И 128
ПРИЛОЖЕНИЕ К 132

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В данной исследовательской работе используются следующие термины:

Oryza sativa	– однолетнее растение из семейства злаковых
Сорт	– «культурный сорт», состоящий из растений, отобранных или выведенных селекционерами по определенным характеристикам растений
Japonica	– один из основных подвидов культурного риса (*Oryza sativa* L.), отличающийся морфологическими, агрономическими, физиологическими и биохимическими характеристиками, а также структурой генома
Indica	– второй по значимости подвидов культурного риса, который отличается длинными, тонкими и рассыпчатыми зернами
Пирикуляриоз	– грибковое заболевание риса
Magnaporthe oryzae	– патоген, вызывающий пирикуляриоз риса
Аутофагия	– естественный клеточный процесс, при котором клетка «съедает» себя, утилизируя поврежденные или неиспользуемые компоненты для получения энергии и строительных блоков
Гены устойчивости	– гены, которые у растений обеспечивают устойчивость к болезням, в основном, путем выработки белков R, которые распознают патогены
Avr-гены	– гены у патогенов, которые кодируют белки, распознаваемые растениями, обладающими соответствующими генами устойчивости (R-генами)
Фитопатологический скрининг	– комплекс мероприятий, направленных на выявление и диагностику болезней растений, а также на оценку их распространения и вредоносности
Аппрессорий	– видоизменение мицелия в форме плоского утолщения, образующегося на концах, растущих гиф гриба
Гаплоидная биотехнология	– применение биотехнологических методов для получения гаплоидных растений, то есть растений с одинарным набором хромосом
Дигаплоид	– диплоидная клетка, ткань или организм, развившиеся из гаплоидных клеток, в которых произошло удвоение хромосом
Культура пыльников	– андрогенез *in vitro*, это метод биотехнологии, используемый для получения гаплоидных растений из пыльцевых зерен (микроспор)

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Pi	– общепринятое наименование генов устойчивости к пирикуляриозу
SSR	– микросателлитные маркеры, используемые для идентификации генов (simple sequence repeats)
PAMP	– патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns)
PRR	– рецепторы распознающие PAMP (pattern recognition receptors)
SIM	– простое интервальное картирование (simple interval mapping)
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
SNP	– однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)
NBS-LRR	– тип генов, обнаруженных в основном у растений, которые играют ключевую роль в иммунном ответе растений, распознавая патогены и инициируя защитную реакцию (nucleotide-binding site leucine-rich repeat)
QTL	– локус количественного признака, участок ДНК, связанный с изменчивостью определенного признака в популяции (quantitative trait locus)
DH	– дигаплоид (doubled haploid)
FAO	– продовольственная и сельскохозяйственная организация объединённых наций, ведущее международное учреждение, занимающееся борьбой с голодом и обеспечением продовольственной безопасности (food and agriculture organization of the united nations)
ETS	– восприимчивость, вызванная эффектором патогена (effector-triggered susceptibility)
CEBiP	– белок, содержащийся в рисе, который играет решающую роль в защите растений от грибковых патогенов (chitin elicitor binding protein)
Armadillo	– домен белков, характеризующийся серией повторяющихся аминокислотных последовательностей

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационной работы. Основная идея исследования заключается в разработке и получении новых гибридов риса казахстанской селекции, обладающих устойчивостью к пирикуляриозу, вызываемому фитопатогенным грибом *Magnaporthe oryzae*. Для достижения этой цели использована стратегия маркер-опосредованной селекции (MAS, *marker-assisted selection*), которая позволил значительно ускорить процесс получения устойчивых форм и повысить эффективность отбора по сравнению с традиционными методами селекции.

Актуальность исследования. Рис (*Oryza sativa* L.) является жизненно важной культурой для обеспечения продовольственной безопасности человечества, особенно в странах Азии. Значительная часть населения этого региона напрямую или косвенно зависит от потребления риса как основного источника калорий. Пирикуляриоз риса, вызываемый фитопатогенным грибом *Magnaporthe oryzae*, относится к числу трёх наиболее опасных заболеваний, существенно влияющих на урожайность культуры во всём мире. Ежегодно данная болезнь представляет серьёзную угрозу для рисоводства, вызывая снижение урожайности на 10-30% в обычные годы и до 50% и более в условиях сильных эпифитотий [1]. В связи с этим разработка и внедрение устойчивых к пирикуляриозу сортов и гибридных линий является одной из приоритетных задач современной селекции риса. Заболевание развивается в течение всего вегетационного периода и может поражать различные органы растения: проростки, листья, узлы и метёлки в зависимости от времени и места заражения. Наибольшую опасность для производства риса представляет пирикуляриоз метёлки, поскольку он напрямую влияет на формирование и наполненность зерна, что приводит к значительным потерям урожая. Выбор устойчивых типов риса путем тщательного отбора и разумного применения является наиболее экономически эффективным. Традиционные методы борьбы с болезнью, включая применение фунгицидов и агротехнические приёмы, оказываются недостаточно эффективными, особенно в условиях масштабных эпифитотий. Следовательно, произошел сдвиг в сторону идентификации генов, которые придают устойчивость к пирикуляриозу риса (гены R), что необходимо для производства надежных сортов [2]. Более того, использование генетических подходов в защите риса обеспечивает целевые и устойчивые решения, которые минимизируют использование химикатов и повышают устойчивость культур к различным заболеваниям [3].

Рис является жизненно важным компонентом питания для значительной части населения мира, включая Казахстан, обеспечивая основные калорийные потребности человека. Однако урожайность этой ключевой сельскохозяйственной культуры снижается под воздействием ряда биотических стрессов. Среди них особую угрозу представляет пирикуляриоз риса, вызываемый преимуще-

ственно фитопатогенным грибом *Magnaporthe oryzae*, который в последние годы оказывает значительное влияние на производство и урожайность культуры во всём мире. Актуальность проблемы усиливается в условиях глобальных климатических изменений, способствующих распространению и развитию болезни. За последние десятилетия был достигнут заметный прогресс в разработке эффективных методов борьбы с пирикуляриозом риса [4]. Тем не менее, большинство существующих мер защиты, включая химический контроль и агротехнические приёмы, обладают ограниченной эффективностью и не обеспечивают долгосрочного решения проблемы, что подчёркивает необходимость создания и внедрения сортов, устойчивых к данному заболеванию. В Казахстане исследования грибковых болезней риса носят эпизодический характер, т.е. недостаточно, и в основном изучают популяции гриба во время вспышек этой болезни. Сотрудниками НИИ проблем биологической безопасности создана коллекция изолятов гриба казахстанской популяции *Magnaporthe oryzae,* дана их морфолого-культуральная характеристика, но агрессивность популяции не изучена из-за отсутствия набора сортов-дифференциаторов [5].

Поэтому в Казахстане целенаправленные селекционные работы, посвящённые созданию устойчивых сортов, практически не проводились. Поскольку основная часть сортов, возделываемых в рисоводческих хозяйствах страны, представлена образцами зарубежной селекции, актуальной задачей является разработка устойчивых к пирикуляриозу сортов на основе отечественных высокопродуктивных районированных форм. Данное направление представляет особую значимость для укрепления продовольственной безопасности и развития отечественной селекции риса. В связи с этим, особую ценность приобретает использование современных молекулярно-генетических подходов, в частности маркер-опосредованной селекции (MAS), которая позволяет ускорить процесс создания устойчивых форм и повысить эффективность отбора в сочетании с традиционными методами.

Объекты исследования. Объектами исследования являлись 35 сортобразцов риса (*Oryza sativa* L.) отечественной и зарубежной селекции, представленные в коллекции ИББР: 31 – сорта и линий зарубежной селекции из коллекции риса ИББР любезно предоставленные селекционерами из ФНЦ риса (д.б.н. профессор Г.Л. Зеленский) и АНЦ Донской (д.б.н. профессор П.И. Костылев); 4 сорта казахстанской селекции – Баканасский, Фатима, Айсауле, Ару созданные учеными ИББР (Таранов О.Н., Аймаков Ж.Ж., Мамонов Л.К., Седловский А.И. Усенбеков Б.Н. и др.) и КазНИИ рисоводства имени И. Жахаева (Бакирулы К.Б., Подольских А.Н., Карлыханов Т.К., Мейрман Г.Т., Байбосынова С.М.).

Предмет исследования. Генетическая устойчивость риса к пирикуляриозу, вызываемому *Magnaporthe oryzae*, а также методы традиционной селекции и гаплоидной технологии и маркер-опосредованной селекции (MAS) для создания гибридов и линий.

Тема диссертации: Создание предселекционных ресурсов риса с генами устойчивости к пирикуляриозу методом маркерной селекции

Цель исследования заключается в оценке сортов риса отечественной и зарубежной селекции из коллекции ИББР на наличие генов, контролирующих признак устойчивости к *Magnaporthe oryzae* и создании новых устойчивых гибридов и линий с использованием методов традиционной селекции, гаплоидной биотехнологии и MAS.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести анализ и скрининг сортов риса отечественной и зарубежной селекции из коллекции ИББР на наличие генов устойчивости к *Magnaporthe oryzae* на основе молекулярно-генетического подхода с использованием генов *Pi* комплекса;

2. Введение генов устойчивости комплекса *Pi* к пирикуляриозу в казахстанские районированные сорта риса и пирамидирование с использованием маркер-опосредованной селекции. Получение генотипов с 2 и более генами *Pi* и внедрение их в селекционный процесс.

3. Провести отбор устойчивых генотипов к патогену с использованием молекулярных SSR-маркеров.

4. Оценить перспективные гибриды на устойчивость к популяции *Magnaporthe oryzae* в условиях инфекционного питомника с использованием искусственного инфекционного фона (фитопатологический тест).

5. Создать дигаплоиды из гибридов поколения F_2 биотехнологическим методом и оценить линии и перспективные гибриды F_2 и F_3 резистентных к патогену по основным хозяйственно ценным признакам.

Методы исследования. Методы выделения ДНК, метод гибридизации с помощью пневмокастрации (трехканальный пневмокастратор), «ТВЕЛЛ» метод опыления растений, полимеразная цепная реакция с SSR маркерами, фитопатологический скрининг, метод гаплоидной биотехнологии, структурный анализ оценки элементов урожая.

Научная новизна. У риса известны большое количество грибных болезней, и они в Казахстане изучены недостаточно: не проводились исследования отечественных районированных сортов риса на присутствие генов устойчивости к пирикуляриозу, не создана коллекция сортов-дифференциаторов с различными генами устойчивости к *Magnaporthe oryzae*. Изучение грибных болезней риса носит эпизодический характер, что связано со вспышками этой болезни в благополучные годы для развития фитопатогена (высокая температура и влажность). Впервые в Казахстане проведены исследования по созданию исходных линий для селекции новых сортов, иммунных к фитопатогену *Magnaporthe oryzae*, с использованием методов маркерной селекции и гаплоидной биотехнологии. Новизна заключается в разработке и получении следующих выводов:

Впервые в Казахстане проведены исследования по созданию исходных гибридов, резистентных к фитопатогену *Magnaporthe oryzae*, с использованием методов маркерной селекции.

Отобраны сорта-доноры или дифференциаторы генов резистентности *Pi-1, Pi-ta, Pi-2, Pi-33, Pi-40, Piz-t* и *Pi-54***,** контролирующих устойчивость к *Magnaporthe oryzae* для интрогрессии и пирамидирования генов в казахстанские сорта риса.

Получены гибридные поколения (F_1-F_3) на основе введения и пирамидирования генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* в районированные в Казахстане сорта риса.

Созданы предселекционные материалы, характеризующиеся высокой урожайностью и повышенной резистентностью к популяции *Magnaporthe oryzae*.

Практическая значимость. Созданы 27 новые исходные гибриды на основе высокопродуктивных казахстанских районированных сортов (Баканасский, Фатима, Айсауле и Ару), несущие гены устойчивости к пирикуляриозу из них 7 линий являются пирамидированными, то есть содержат комбинации 2-3 генов (*Pi-1, Pi-33* и *Pi-ta*) устойчивости. Получена дигаплоидная линия F_2 Айсауле/7668 *(var. italica Alef)* несущая 2 гена (*Pi-1* и *Pi-ta*) резистентности к *Magnaporthe oryzae.*

Теоретическая значимость исследования. Рассмотрены фундаментальные аспекты молекулярной генетики в области селекции риса, на выведение новых устойчивых к патогену казахстанской селекции современными методами. Теоретическая значимость исследования включает новые исходные предселекционные материалы, полученные с использованием методов традиционной гибридизации и MAS, для дальнейшего использования в отечественных программах по селекции риса. Все отобранные гибриды имеют потенциал для дальнейшего изучения и выведения сортов риса устойчивых к *Magnaporthe oryzae*. Анализ литературы показал, что аналогичные исследования не проводились в Казахстане. Результаты, полученные в данном исследований, могут служить основой для разработки новых стратегий в селекции риса с использованием MAS, направленных на создание конкурентоспособных казахстанских сортов риса, имеющих значимость для внутреннего рынка и экспорта.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Протестированы 35 отечественных и зарубежных сортов на наличие генов устойчивости к *Magnaporthe oryzae* с использованием SSR маркеров. Отобраны доноры, которые были использованы для введения и пирамидирования генов устойчивости в высокопродуктивные казахстанские сорта риса с целью создания гибридов. Создано 54 гибридов, несущих в генотипе гены к пирикуляриозу путем переноса гена в казахстанские высокопродуктивные районированные сорта.

2. Отобраны 27 перспективных гибридов риса F_2, несущих гены резистентности к *Magnaporthe oryzae* с помощью МАС (маркер-опосредованной селекции). Выявлено 7 гибридов (7698/Айсауле var. *suberythroseros* Kan., Ару/7702 var. *erythroceros* Koern., Баканасский/7667 var. *subjanthoseros* Brsch., Баканасский/7667 var. *vulgaris* Koern., Баканасский/7701 var. *vulgaris* Koern., Айсауле/7664 var. *italica* Alef.), которые содержат 2 гена устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1* и *Pi-ta*), 1 гибрид Айсауле/7689 var. *zeravschanica* Brsch содержат 3 гена устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1*, *Pi-33* и *Pi-ta) и,* 16 гибридов F_3, содержащих 1 ген резистентности (*Pi-1).* Фитопатологический скрининг позволил выявить 37 гибридов F_2, с различными степенями устойчивости (от слабой до высокой) к популяции грибкового заболевания.

3. Созданы предселекционные продуктивные гибриды для отечественных программ по выведению устойчивых к пирикуляриозу сортов риса и дигаплоидная линия F_2.

Связь с планом основных научных работ. Исследовательская работа выполнена в лаборатории физиологии и биохимии растений Института биологии и биотехнологии растений КН МНВО РК в рамках проекта AP14869300 «Повышение устойчивости риса к *Magnaporthe oryzae* с использованием маркер-опосредованной селекции (MAS)» на 2022-2024 гг., финансируемый Комитетом науки Министерством науки и высшего образования Республики Казахстан.

Апробация научно-исследовательской работы. Результаты исследований опубликованы и доложены в международных научных конференциях «Селекция, семеноводство, технология возделывания и переработка сельскохозяйственных культур», посвященная 90-летию со дня образования ФГБНУ «ФНЦ риса» (Россия, 2021 г.) и «Экологическая генетика и здоровье населения: достижения и перспективы», Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию д.б.н., профессора, академика Национальной Академии Наук Высшей Школы РК и МАИН Бигалиева А.Б. (Казахстан, 2023 г.). Основные результаты представлялись на заседаниях кафедры молекулярной биологи и генетики КазНУ им. аль-Фараби, научных семинарах лаборатории физиологии и биохимии растений Института биологии и биотехнологии (ИББР), на ученом совете ИББР в ежегодных заслушиваниях отчетов по проектам. Результаты диссертационной работы включены в ежегодные отчеты о НИР по проекту AP14869300 (2022-2024 гг.).

Публикации. Основные результаты диссертации отражены в 13 печатных работах, в том числе 4 статьи в изданиях, входящие во второй Q2 квартиль базы данных Scopus; 2 статьи в журналах, входящих в перечень КОКСНВО МНВО РК, в 1 монографии, 6 тезисов в материалах международных конференций.

Личный вклад соискателя заключается в теоретической подготовке и разработке программы исследований, формулировании задач и проведении

научных экспериментов и опытов, а также в синтезе и анализе полученных результатов. В частности, соискатель принимал непосредственное участие в выполнении научных исследований, сборе, обработке и анализе экспериментальных данных, апробации результатов работы, а также в подготовке и публикации материалов исследования в научных изданиях, включая журналы, рекомендованные перечнем Комитет по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, а также базы Scopus. Соискатель является ответственным исполнителем проекта, в рамках которого выполнялась исследовательская работа.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описание использованных материалов и методов для исследований, результаты и их обсуждение, заключения, списка использованных источников. Содержит 132 страниц текста, включающих 17 таблиц и 33 рисунка. Список использованной литературы включает 221 источника, в том числе 199 зарубежных.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Морфобиологические особенности риса

Окультуренный рис (*Oryza sativa*) – это однолетнее растение из семейства злаковых. Он относится к гигрофитам, что означает его способность расти на переувлажненных или затопленных почвах [6]. Внутри стеблей и корней этого растения присутствуют воздушные полости, через которые кислород поступает к его нижним, погруженным в воду частям. Корневая система у риса хорошо развита и может значительно изменяться в зависимости от уровня залива водой.

Стебель риса представляет собой соломину, состоящую из 4-5 полых междоузлий (рис. 1). Его длина варьируется от 30 см у карликовых разновидностей до 6 м у плавающих форм, но чаще всего составляет 0,5-2 м. У представителей японского подвида стебель короче, чем у индийского. Количество узлов напрямую зависит от продолжительности вегетационного периода: у скороспелых сортов их около 10, тогда как у позднеспелых может достигать 20.

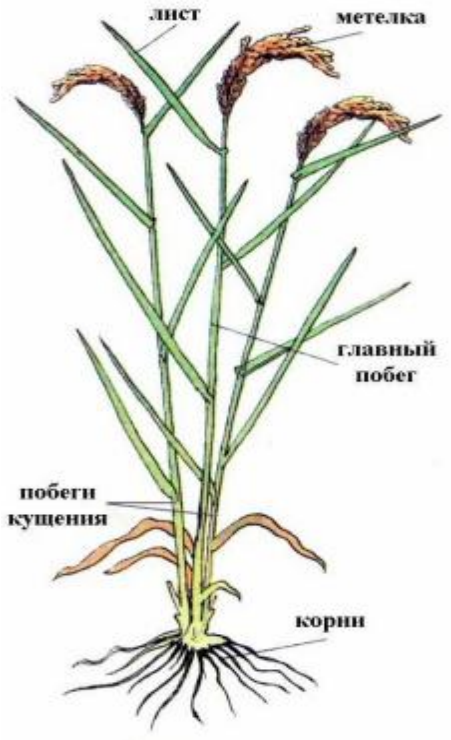


Рисунок 1 – Растение риса

Колоски риса имеют небольшие верхнюю и нижнюю колосковые чешуи ланцетной формы, длина которых составляет 1/3-1/2 от цветковых чешуй. В каждом колоске расположен единственный цветок, состоящий из двух колосковых и двух цветковых чешуй, двух лодикул, шести тычинок и пестика с двумя перистыми рыльцами. У остистых сортов нижняя цветковая чешуя оканчивается остью длиной до 15 см [7].

Соцветие риса представляет собой метелку длиной 10-30 см, содержащую от 20 до 300 колосков (рис. 2). В зависимости от формы метелки могут быть поникшими, прямостоячими или промежуточными. Осыпаемость зерен опреде-

ляется строением колоскового сочленения – участка, где колосок соединяется с ножкой.



Рисунок 2 – Строение цветка риса

Примечание: 1 – тычинки; 2 – пестик; 3 – лодикулы; 4 – стерильные чешуи; 5 – нижняя цветковая чешуя; 6 – верхняя цветковая чешуя.

Вегетационный период риса. Прорастание – первый этап жизненного цикла риса, который заканчивается, когда зерно созревает и стареет. Продолжительность и перекрытие конкретных стадий роста риса могут различаться в зависимости от сорта, факторов окружающей среды и методов ведения сельского хозяйства. Ключевые показатели урожайности, такие как количество метелок и колосков, количество зерен, вес и процент, формируются на разных стадиях развития риса [8]. По этой причине выбор правильного времени для различных процедур управления имеет решающее значение для корректировки конкретного фактора урожайности и достижения целевого количества и качества урожая риса. Для прорастания рисовых семян необходимо воздействие кислорода, влаги и температуры почвы выше 10°C. Впитывание достаточного количества воды на этой стадии развития рисового семени запускает активацию зародыша в семени. Необходимо обращать внимание на уровень покрытия семян землей и водой, так как дефицит кислорода препятствует нормальному появлению всходов и дальнейшему росту урожая [9,10].

В зародыше риса происходит рост корешка и колеоптиля, в основном за счет удлинения. Колеоптиль вскоре прекращает свой рост под воздействием солнечного света. В аэробных условиях корешок появится раньше колеоптиля, но в анаэробных условиях колеоптиль появится первым. Появление колеоптиля является явным признаком появления всходов. Идеальная температура для прорастания риса составляет 30°C, но это может произойти в диапазоне от 10

до 41°C. В диапазоне температур от 21 до 36°C стадия прорастания риса обычно длится всего два дня. Это занимает больше времени и может привести к снижению скорости появления всходов, если температура ниже или выше этой [11].

Фосфор (P), необходимый для роста корней, интенсивного кущения и раннего созревания, и калий (K), способствующий росту корней и делающий урожай более устойчивым к болезням и вредителям, применяются на стадии прорастания риса. Рекомендуется использование фосфорного удобрения и низкокалорийного калийного удобрения перед окончательной подкормкой перед пересадкой рассады или внесения всего удобрения сверху через 10-15 дней после прямого посева [12].

Развитие листьев. Первый лист, появляющийся из колеоптиля при воздействии света, знаменует начало стадии развития листа. Обычно размером около 2,5 см или короче, первичный лист у риса служит защитой для следующего листа, который появится. На стадии роста риса с одним листом есть один настоящий лист и один первичный лист. Каждый новый лист, который вырастает после первого, является настоящим листом [13].

На стадии роста листьев корневая система риса также развивается и начинает формироваться. У риса, посеянного непосредственно в почву, первичная корневая система начинает свой рост на уровне или близко к семени, а вторичная система появляется над семенем, выходя из основания колеоптиля. Эти различия в корневых системах риса могут влиять на доставку питательных веществ и другие решения по управлению урожаем на всех стадиях роста риса [10].

Кущение. Побеги риса появляются из верхушек влагалищ настоящих листьев. Хотя рост побегов не такой быстрый и активный, как у основных побегов, побеги развиваются по той же схеме. На этой стадии роста у основания побега начинает формироваться корона. Также на этой стадии продолжается рост и развитие корней и листьев.

Появление первого побега обычно происходит из боковой почки второго листа на стебле на стадии роста риса, отмечая начало кущения. На стадии роста процесс кущения продолжается, и второй побег появляется из боковой почки третьего листа. Так кущение продолжается до тех пор, пока не развернется последний настоящий лист [14].

На этапе кущения риса лучше всего вносить аммиачную селитру в сухую почву и сразу же заливать ее. Если условия влажные, фермеры могут отложить внесение азотных удобрений на несколько недель без ущерба для урожая. Однако если ситуация сохраняется, им приходится вносить удобрения во влажную почву и заливать ее. Оптимальная дата внесения может варьироваться, но обычно это три недели до того, как вы ожидаете, что метелки начнут различаться. На ранних стадиях роста, до развития метелки и на протяжении вегетативных стадий роста риса, азот является наиболее важным питательным веще-

ством для растения. Вот почему обеспечение надлежащего внесения азота имеет решающее значение для содействия здоровому росту риса [15].

Удлинение стебля. На этой стадии роста рис начинает расти в высоту благодаря удлинению своего главного стебля, состоящего из узлов и междоузлий. Сорт риса определяет конечную высоту стебля. В частности, позднеспелые сорта, как правило, выше, чем раннеспелые. На стадии удлинения стебля риса происходят следующие процессы:

Появление метелки. Рис вступает в репродуктивную фазу роста на стадии закладки метелки. Метелка теперь либо незаметна человеческому глазу, либо выглядит просто как зеленое кольцо. Стадия зеленого кольца – это еще одно название стадии закладки метелки риса именно по этой причине. Междоузлия появляются прямо над верхним узлом в виде зеленых колец и видны только в течение нескольких дней [16].

Важно начать проверку на предмет качества почвы, заболевания риса мирового значения, прямо с этапа зарождения метелки. Наиболее оптимальными условиями для роста пирикуляриоза, фитофтороза являются избыточное внесение азотных удобрений, температура 28-32 °C и относительная влажность 85-100%. В дождливые периоды растения чаще страдают от болезни. Таким образом, крайне важно следить за такими переменными, как температура воздуха и осадки, а также за растительным покровом поля [17].

Удлинение междоузлий. Начиная примерно за семь дней до ожидаемой дифференциации метелки, стадия удлинения междоузлий или рост риса продолжается до тех пор, пока растение не достигнет максимальной высоты, а затем происходит выметывание. Стеблевые междоузлия, в отличие от корневых, имеют зеленый оттенок стенок. Стадии закладки метелки и удлинения междоузлий роста риса, являются оптимальными стадиями для внесения азотных удобрений.

У высоких сортов длина междоузлий может варьироваться от 5 см у основания до 38 см наверху, тогда как у полукарликовых сортов она может варьироваться от 2,5 см до 25 см. Эти значения могут различаться в зависимости от даты посадки, состояния почвы, глубины затопления, плотности растений, конкуренции с сорняками и других факторов [18].

Большинство возделываемых сортов риса, имеют постоянное количество междоузлий (5-6) над кроной главного стебля. После начала удлинения междоузлий стебля главный побег может произвести максимум шесть новых полных листьев (по одному на междоузлие). Самый верхний лист на полностью выросшем стебле риса, известный как флаговый, развивается последним. Результаты фотосинтеза, которые он обеспечивает, в основном отвечают за развитие зерен, поэтому этот лист высоко ценится. Когда начинается рост междоузлий над кроной, расширение корней достигает своего апогея. Теперь вторичная корневая система сильно разветвилась во всех направлениях ниже кроны. Это также период, который указывает на начало стадий репродуктивного развития риса [19].

Дифференциация метелки. Процесс дифференциации метелки у риса происходит во время роста междоузлий и метелки. На данном этапе впервые становится доступной зрению новая метелка. Метелка достигает длины около 3 мм и продолжает расти внутри стебля. Рис весьма восприимчив к влиянию окружающей среды, и особенно к тепловому стрессу, на этой стадии роста. Чтобы обеспечить желаемое целевое количество зерен на метелку, необходимо внимательно следить за этими влияниями [15].

Трубкование. Во время стадии выхода в трубку риса многие компоненты метелки созревают в защитной оболочке флагового листа. Эта оболочка представляет собой трубку. Три различных стадии выхода в трубку риса определяются тем, насколько видна часть оболочки флагового листа над воротником предпоследнего листа:

– Ранняя трубка. Начинается с момента, когда становится видна трубка флагового листа, пока она не окажется примерно на 5 см выше воротника предыдущего листа;

– Средняя трубка. Воротник флагового листа виден на 5-13 см выше воротника предыдущего листа;

– Поздняя трубка. Воротник флагового листа виден минимум на 13 см. Поскольку к этому времени идет активный рост метелок, трубка набухает, за что эта стадия роста получила название «набухшая трубка» [20].

Появление соцветия, выметывание. Стадия выметывание риса начинается, как только метелка начинает выходить из нижней части флагового листа. Поскольку зрелость побегов различается, колошение всех растений в поле может занять до двух недель. Агрономический термин «дата выметывание» обычно относится к моменту, когда половина метелок частично поднялась. Это не то же самое, что «колошение» риса, которое происходит, когда все метелки полностью вышли.

Длительное отсутствие солнечного света в трехнедельный период до и после стадии колошения риса может снизить всходы метелки и затруднить налив зерна. Типичная продолжительность между стадиями колошения и цветения составляет около двух дней. Изменения в солнечном свете, температуре и влажности могут вызвать значительные колебания в этой продолжительности. Например, когда много солнечного света, период может сократиться до одного дня. С другой стороны, когда дождливо и облачно, есть вероятность продления данного периода до 5-7 дней [21].

Цветение. Время между открытием и закрытием цветка известно, как стадия цветения риса. Ветви метелки начинают цвести на кончиках и продвигаются вниз к основаниям. Пыльцевые зерна сохраняют жизнеспособность всего пять минут после появления, в то время как рыльце имеет окно оплодотворения от трех до семи дней. Цветение может занять около трех недель, в зависимости от группы зрелости сорта риса и температуры [22].

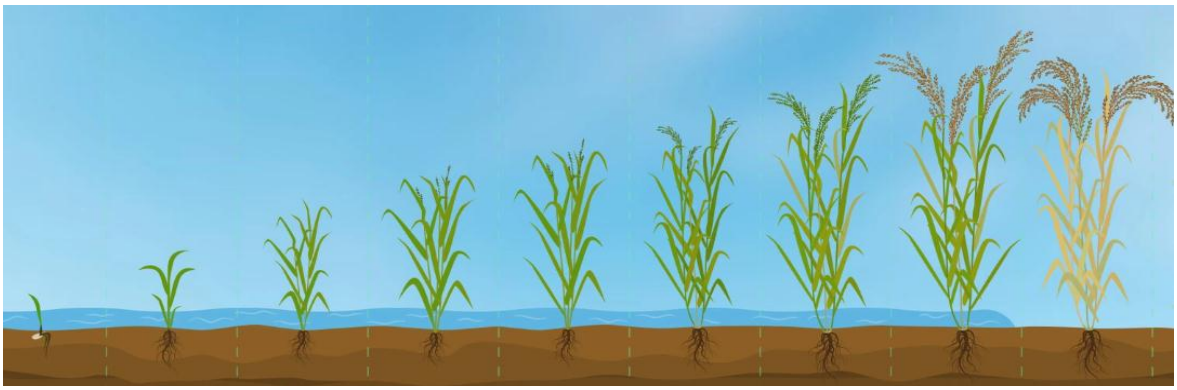
Рис является самоопыляющейся культурой. Количество оплодотворенных цветков является основным фактором, определяющим потенциал заполнения зерна метелки. Но не каждый оплодотворенный цветок заполнится из-за воздействия определенных условий роста. Низкие температуры ниже 10°C в течение двух ночей подряд за две недели до или во время стадии цветения риса и высокие температуры выше 35°C во время цветения могут привести к пустозерности или стерильности. Стерильность, вызванная холодом, оказывает значительно большее влияние на урожайность, чем стерильность, вызванная теплом. Также стерильность может быть усугублена внесением удобрений или пестицидов во время цветения, сильными ветрами и дождями [23].

Начало созревания: развитие зерен. Развитие зерна характеризует 3-6 дневную стадию наполнения зерна в рисе, которая следует за оплодотворением яйцеклетки. Зерно набухает в ответ на крахмал и сахара, перемещенные из стеблей и листьев. Молодые зерна риса вырастают из маленьких цветков на главном стебле. На этой стадии развития и роста риса интенсивность света является решающим фактором, поскольку зерна фотосинтезируют от 60 до 100% от общего содержания углерода [24].

Молочная спелость риса характеризуется появлением молочного крахмального накопления в соцветиях главного стебля. Поскольку соцветия, которые приобретают крахмал, становятся тяжелее, метелка в конечном итоге изгибается. Крахмал эндосперма становится из молочного более твердым, посредством уменьшения содержания влаги. На этой стадии роста риса определяется вес каждого зерна. Условия роста могут влиять на вес, хотя он остается в значительной степени постоянным для конкретного сорта. Высокие температуры могут вызвать снижение веса зерна. Кроме того, продолжительность заполненности зерна риса больше при низких температурах и меньше при высоких. Когда температура сохраняется ниже 10°C в течение многих дней, наполнение зерна обычно значительно замедляется и может даже остановиться после сильных заморозков [25].

Созревание. Во время стадии созревания риса метёлка претерпевает визуальные и структурные изменения: она меняет цвет с бледно-зелёного на пятнистый коричнево-зелёный оттенок, что отражает созревание и накопление углеводов в зерне. На стадии «мягких зерен» зерна становятся более пластилиновыми и легко сжимаются. По мере затвердевания крахмала формируется твёрдый, меловой эндосперм. На стадии «твёрдых зерен» зерно теряет влагу, становится твёрдым и хрупким. Промежуток между этими стадиями составляет от двух до пяти дней. В фазе полной зрелости зерно завершает своё развитие и достигает физиологической зрелости, что указывает на приближение времени сбора урожая. За 10-15 дней до сбора урожая риса рекомендуется удалять поверхностную воду с полей для обеспечения равномерного и своевременного созревания, облегчения процесса уборки и сбора урожая [26]. Точное время осушения может варьироваться в зависимости от погодных условий, таких как

температура и осадки. При этом важно сохранить достаточный уровень влаги в почве, чтобы избежать водного стресса у растений в период созревания, поскольку он может негативно сказаться на урожайности. Оптимальное время для сбора урожая наступает при уровне влажности зерна от 19% до 21%, поскольку дальнейшее снижение влажности на каждый 1% приводит к увеличению трещиноватости на 2% [27]. Все вышеперечисленные этапы органогенеза риса показаны на рисунке 3.



а б в г д е ж з и

Рисунок 3 – Этапы органогенеза риса: а – прорастание; б - развитие листьев; в – кущение; г - удлинение стебля; д – выход в трубку; е – появление соцветия; ж – цветение; з – начало созревания (молочная и восковая спелость); и – полное созревание

Изучая различные литературные источники по морфобиологическим особенностям риса можно получить различные данные про фазы вегетации риса и какие внешние факторы влияют на рост. Важно отметить, что правильно подобранные параметры при каждой стадии могут положительно отразиться на продуктивности и целостности риса.

1.1.2 История одомашнивания риса

История одомашнивания видов сельскохозяйственных культур привлекает большое внимание исследователей из разных областей. Понимание процесса одомашнивания представляет большой интерес и будет способствовать управлению сельским хозяйством нового поколения в грядущую эпоху, когда окружающая среда быстро меняется. Недавние геномные исследования пролили свет на историю одомашнивания азиатского риса [28]. Загадка происхождения и процесса одомашнивания азиатских сортов риса была загадкой на протяжении десятилетий. Основными вопросами были происхождение *japonica* и *indica* и то, были ли эти сортовые группы независимо одомашнены. Предыдущие генетические исследования с использованием *O. sativa* и разнообразие *O. rufipogon* показали, что *japonica* и *indica* показали близкое сродство с различ-

ными популяциями *O. rufipogon*, и предположили множественное происхождение *O. sativa*, при этом *japonica* возникла в Китае, а *indica* – в Южной/Юго-Восточной Азии [29-31], а время их расхождения предшествовало началу одомашнивания. Эта гипотеза хорошо соответствовала археологическим данным, демонстрирующим существование руин древней культуры риса в бассейне реки Янцзы в Китае и в бассейне реки Ганг в Индии [32]. Однако история более сложная, поскольку некоторые популяционно-генетические исследования, использующие большее количество локусов, предполагают не независимое одомашнивание *japonica* и *indica* [33,34]. Недавние исследования, основанные на данных по всему геному, прояснили подробный процесс одомашнивания азиатского риса, показав, что *japonica* и *indica* демонстрируют расходящиеся геномные фоны, происходящие из разных популяций дикого риса, и что произошла интрогрессия генов, связанных с одомашниванием, от *japonica* к *indica* [35,36]. Кроме того, два сорта риса *indica* (*indica* и *aus*) также имеют разное происхождение [37]. Филогеографический анализ видов дикого риса по всему миру, включающих более 400 образцов, вместе с культивируемым рисом, показал, что дикий рис, собранный в средней части региона Жемчужной реки на юге Китая, показал самое близкое генетическое сродство к культивируемому рису в областях генов, связанных с одомашниванием [35].

Существуют самые разные теории о происхождении риса и с их помощью можно проследить пути появления разновидностей риса. Это понимание помогает ученым в мире в современных исследованиях по самым разным направлениям.

1.1.3 Производство риса в мире и в Казахстане

Рис (*Oryza sativa* L.) – крупнейшая в мире продовольственная культура, ежедневно обеспечивающая потребности миллионов людей в калориях, которую потребляет около 50% населения мира [38]. На протяжении всей истории был одним из важнейших продуктов питания в рационе человека и одной из самых распространенных зерновых культур. Фактически, рис, вероятно, кормил больше людей в истории, чем любая другая культура. Даже сегодня рисовые зерна поддерживают две трети населения мира, примерно 2,5 миллиарда человек. Рис в основном потребляется как белое зерно, но за последнее десятилетие на рынке продуктов питания появились десятки продуктов, содержащих рис в качестве ингредиента [39].

Рис составляет 19% от общего мирового производства зерновых. Выращивание сосредоточено в развивающихся странах, в основном вокруг Восточной и Средней Азии, где расположено 91% от общего мирового производства (FAO, 2024). Китай является крупнейшим в мире производителем риса, за ним следуют Индия, Бангладеш и Индонезия. Остальная Азия, Америка и Африка производят меньше риса от общего мирового производства (рис.4).

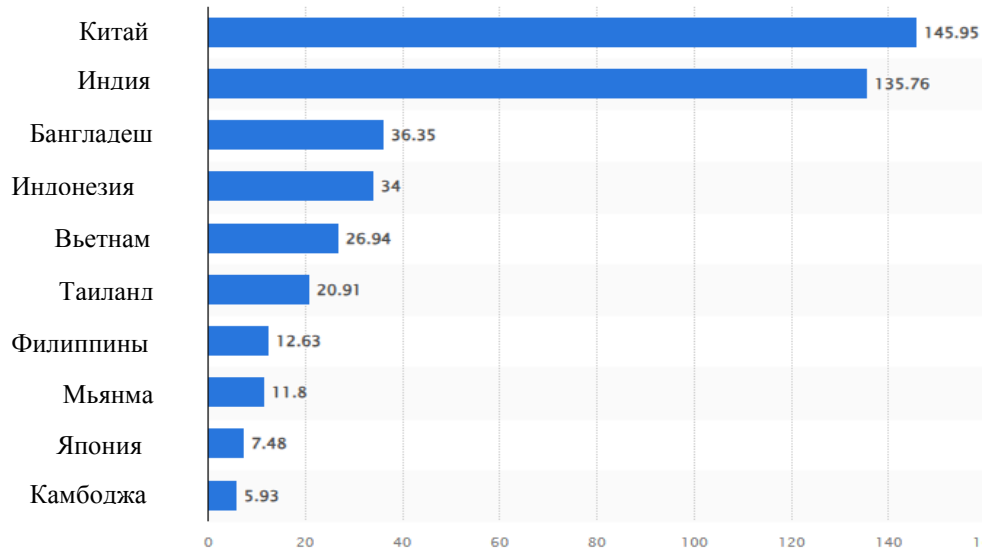


Рисунок 4 – Статистика производства риса по странам в миллионах метрических тонн, по данным базы Statistica [40]

Количество продуктов на основе риса, доступных для потребления человеком в разных странах, почти соответствуют его производству. За небольшими исключениями, практически весь произведенный рис потребляется в странах-производителях. Самый высокий ежедневный рацион потребление риса наблюдается в Мьянме. Среднесуточное потребление риса в азиатских странах составляет 285 г на душу населения, что выше 44 г в сравнении с развитыми странами [41,42].

Рис обеспечивает 27% калорий от общего потребления пищи в развивающихся странах и этот показатель в развитых странах составляет только 4%. Как и другие злаки, рис является дешевым источником белка, и в развивающихся странах рис обеспечивает 20% от потребления пищевого белка [43].

Экономическая значимость риса проявляется также в создании рабочих мест и доходов для миллионов фермеров, особенно в развивающихся странах. Кроме того, рис играет важную роль в аграрной политике и устойчивом сельском хозяйстве, поскольку его производство тесно связано с управлением водными ресурсами. Селекционные и биотехнологические исследования направлены на повышение урожайности, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам, а также улучшение пищевой ценности. Рис также используется как модельный объект в генетике и молекулярной биологии благодаря компактному геному и высокой степени изученности. Учитывая демографический рост и изменение климата, устойчивое производство риса становится приоритетной задачей для мировой аграрной науки. В целом, рис остается ключевой культурой для обеспечения продовольственной безопасности и глобального развития [44].

По данным базы данных Statistica видно, что производство риса в мире растет с каждым годом, что говорит о необходимости в увеличении разнообра-

зия сортов с различными полезными хозяйственно-ценными признаками с помощью современных методов селекции (рис.5).



Рисунок 5 – Объем мирового производства шлифованного риса в миллионах метрических тонн в 2008/2009-2024/2025 гг. по данным по данным базы Statistica [45]

Рис характеризуется высокой продуктивностью, при благоприятных агроклиматических условиях и надлежащем уходе урожайность может достигать 69-80 ц/га и выше. Однако в Кызылординской области за последние пять лет наблюдается тенденция к снижению урожайности. Так, если в 2019 году она составляла 59,3 ц/га, то к 2023 году снизилась до 56,5 ц/га. В Кызылординской области в ходе посевной кампании было использовано 20 тыс. тонн семян высшей репродукции, из которых свыше 70% составили сорта российской селекции. Доля районированных сортов риса зарубежной селекции возделываемых в республике составила 19%. На долю отечественных казахстанских сортов пришлось лишь 11% от общего объема используемого семенного материала. Это говорит о необходимости создании и внедрении в производство отечественных сортов риса для рисосеющих регионов республики.

Объём производства риса в 2023 году составил 205,1 тыс. тонн, что на 8,4% ниже по сравнению с предыдущим годом. Основной объем продукции (92%) был произведён в Кызылординской области. В Алматинской области собрано 9,5 тыс. тонн риса, в Туркестанской – 6,7 тыс. тонн, а в Жетысуской – 138 тонн (рис.6).

В 2024 году производство риса в Казахстане общая площадь посевов риса во всех категориях хозяйств составила свыше 98 тыс. га, из которых 85,6 тыс. га расположены в Кызылординской области, 6,7 тыс. га – в Алматинской, 4,5 тыс. га – в Туркестанской и 1,2 тыс. га – в Жетысуской областях.



Рисунок 6 – Производство риса в Казахстане, тыс. тонн

Рисоводство в Казахстане в 2025 году сосредоточено в Кызылординской области, где площади посева риса незначительно выросли, а уборка урожая принесла около 470 тыс. тонн при средней урожайности 58 ц/га, Туркестанской области (Мактааральский, Шардаринский и Жетысайский районы) под рисом находилось более 11,6 тыс. гектаров, в Алматинской области посеяно 6,0 тыс. га.

Наиболее широко используемым сортом семян в регионе является российский сорт «Лидер», специально выращиваемый для аграриев Кызылординской области. Однако, несмотря на заявленные показатели урожайности, импортные семена нередко не соответствуют агротехническим требованиям. В образцах сортов «Янтарь» и «Лидер» неоднократно выявлялись бактериальные и грибковые инфекции. В то же время при использовании казахстанского сорта «Маржан» случаи заболеваний посевов не фиксировались. На сегодняшний день данный сорт занимает лишь 6-7% посевных площадей и возделывается преимущественно мелкими хозяйствами Жанакорганского района Кызылординской области.

В Туркестанской области в связи с нехваткой водных ресурсов внедряются водосберегающие технологии. В Отырарский район ТОО «Таймас-2024» впервые в стране в пилотном формате использовало капельное орошение при выращивании риса на площади 400 гектаров. Благодаря этому средняя урожайность достигла 50 центнеров с гектара. Если при традиционном способе на один гектар требуется до 26 тысяч $м^3$ воды, то применение новой технологии позволило сократить потребление почти вдвое - до 15 тысяч $м^3$. В 2026 году планируется дополнительно расширить посевные площади по данной технологии еще на 200 гектаров. В 2026 году в Туркестанской области по каналу "До-

стык" предложено исключить посевы риса, по Кызылкумскому каналу – не более 3,5 тыс. га, по Кызылординской области – не более 70 тыс. га.

Наименьшая доля отечественных сортов риса, возделываемых в республике, указывает на необходимость для создания новых, высокоурожайных казахстанских устойчивых сортов к биотическим и абиотическим стрессам окружающей среды с целью повышения конкурентоспособности в отечественного рисосеяния.

1.2 Геномные исследования культурных и диких видов риса

Геном *Oryza* является наименьшим среди зерновых культур с предполагаемым размером 400-430 Мб. Японский сорт Nipponbare который относится к подвиду *japonica* был первым секвенированным геномом риса [46]. Однако рис *O. sativa indica*, который также имеет субпопуляции *indica* и *aus*, является наиболее широко возделываемым рисом в мире [47]. Было собрано несколько исходных данных по последовательностям геномов риса *indica* [48]. Проведены исследовательские работы по секвенированию генома риса разных сортов из множества стран. Всего было проанализировано 3000 образцов из 89 стран, среднее покрытие секвенирования составляло 94% всего генома. После выравнивания этих геномов с геномом стандартного сорта Nipponbare, было обнаружено в общей сложности 18,9 миллионов однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Данные SNP использовались для филогенетического анализа с целью дифференциации генофонда *O. sativa* на пять сортовых групп (*indica, aus/boro, basmati/sadri, tropical japonica* и *temperate japonica*). Помимо *O. sativa*, были секвенированы геномы различных диких видов риса. Список диких рисов, геномы которых были секвенированы, включает: *O. longistaminata* (2014; ID: 11285); *O. glaberrima*, африканский дикий рис (2010; ID: 458); *O. minuta*, многолетний дикий рис из Юго-Восточной Азии (2014; ID: 10965); *O. meridionalis*, дикий рис из Австралии (2012; ID: 11319); *O. coarctata*, дикий рис из Бангладеш (2019; ID: 11313); *O. australiensis*, австралийский сорт дикого риса (2021; ID: 10966); *O. officinalis*, тропический и субтропический дикий рис (2014; ID: 10964); *O. punctata*, африканский дикий рис (2014; ID: 10963); *O. nivara*, дикий рис из Индии (2014; ID: 2841); *O. rufipogon*, вид дикого риса из тропических и субтропических регионов Австралии и Азии (2014; ID: 457); *O. meyeriana* var. *granulata*, дикий рис из Таиланда (2012; ID: 11287); и *O. glumipatula* (2013; ID: 11318) (таблица 1) [49].

Геном риса *Oryza sativa*, обладающий наименьшим размером среди зерновых культур, стал объектом многочисленных геномных исследований. Секвенирование различных подвидов, включая *japonica* и *indica*, позволило выявить более 18,9 млн SNP и провести их филогенетическую классификацию на пять сортовых групп.

Таблица 1 – Разновидность генома риса [50]

Вид	Число хромосом	Геном	Географическое распространение
Комплекс *Oryza sativa*			
O. sativa	24	AA	По всему миру
O. rufipogon	24	AA	Азия, Океания
O. nivara (также известен как однолетний экотип *O. rufipogon*)	24	AA	Азия, Океания
O. glaberrima	24	AA	Западная Африка
O. barthii	24	AA	Африка
O. longistaminata	24	AA	Африка
O. meridionalis	24	AA	Австралия
O. glumaepatula	24	AA	Центральная и Южная Америка
Комплекс *O. officinalis*			
O. officinalis	24	CC	Азия
O. minuta	48	BBCC	Филиппины
O. rhizomatis	24	CC	Шри-Ланка
O. eichingeri	24	CC	Африка, Шри-Ланка
O. punctata	24, 48	BB, BBCC	Африка
O. latifolia	48	CCDD	Центральная и Южная Америка
O. alta	48	CCDD	Центральная и Южная Америка
O. grandiglumis	48	CCDD	Южная Америка
O. australiensis	24	EE	Австралия
Комплекс *O. ridleyi*			
O. ridleyi	48	HHJJ	Азия, Новая Гвинея
O. longiglumis	48	HHJJ	Новая Гвинея
Комплекс *O. granulata*			
O. granulata	24	GG	Азия
O. meyeriana	24	GG	Азия
Другие			
O. brachyantha	24	FF	Африка
O. schlechteri	48	Неизвестно	Новая Гвинея
O. coarctata (также известна как *Porteresia coarctata*)	48	HHKK	Прибрежные регионы Индии, Пакистана и Бангладеш

Анализ многих образцов из разных стран продемонстрировал высокую степень генетического разнообразия внутри вида *O. sativa*. Кроме того, были секвенированы геномы нескольких диких видов риса, что существенно расширило представление о генофонде рода *Oryza* [51]. Полученные данные имеют фундаментальное значение для изучения генетики устойчивости, адаптации и селекции риса.

1.3 Глобальное и региональное значение эпидемии пирикуляриоза риса в настоящем и будущем контексте

Среди биотических стрессов пирикуляриоз является наиболее серьезной проблемой, которое ограничивает мировое производство риса [52,53]. Крупные эпидемии пирикуляриоза, охватывающие обширные территории, происходят регулярно, приводя к потерям урожая на 10-30% ежегодно, что составляет около 157 миллионов тонн во всем мире. Заболевание было впервые зарегистрировано в Китае в 1637 году и было признано болезнью рисовой лихорадки. Кроме того, оно было описано как imochibyo (пирикуляриоз на японском языке) в Японии в 1704 году и как brusone (пирикуляриоз пшеницы) в Италии в 1828 году. Сейчас это заболевание охватывает почти 85 стран, представляя серьезную угрозу продовольственной безопасности и снижает доходы фермеров в регионах Южной Азии и Африки [54,55]. *M. oryzae* вызывает пирикуляриоз у многих злаковых [56], а среди сельскохозяйственно важных видов культур он заражает рис, пшеницу, рожь, ячмень и просо.

В мире было зафиксировано несколько эпидемий пирикуляриоза риса. В эпидемический 1953 год в Японии была зафиксирована потеря около 800 000 тонн риса. В Индии пирикуляриоз был впервые зарегистрирован в 1913 году, а в 1919 году эпифитотия была зарегистрирована в штате Мадрас [52]. Частые вспышки были зарегистрированы в холмистых районах Уттаранчала, Химачал-Прадеша, Джамму и Кашмира, где из-за пирикуляриоза в осенний сезон теряется около 65% урожая. Кроме того, восточная Индия часто сталкивается с пирикуляриозом из-за благоприятных климатических условий для роста и развития патогена. Около 564 000 тонн риса теряется ежегодно из-за пирикуляриоза только в восточной Индии [57].

В Казахстане рис возделывается в трех регионах республики: Кызылординской (70-80 тыс. га), Алматинской (15-20 тыс. га) и Туркестанской областях. В Туркестанской области в 2025 году, несмотря на лимит в 4000 гектаров, фактическая площадь посева риса достигала 13 258 гектаров. Согласно Койшибаеву М. пирикуляриоз впервые был выявлен в Кызылординской области в начале 1930-х годов, и 50-60 лет упоминаний о болезни не последовало. Затем в 1998 году очаги заметили в 2-3 районах Кызылординской области. По данным территориальной инспекции МСХ РК пирикуляриоз был выявлен в 2006 году на 30,3% площади (12 тыс. га), характер распространения был очаговым. Так, в Сырдарьинском районе Кызылординской области массовый посев риса сорта

Маржан был прекращен из-за восприимчивости сорта к пирикуляриозу. В связи с тем, что рис растет на затопленной водой земле, создается микроклимат с высоким показателем влажности, что повышает шансы развития и распространения данной болезни. Так, в республике в 2009 г. *Magnaporthe oryzae* поразил 4,1 тыс. га, а в 2011 г. 1,6 тыс. га посевов [58].

В главном рисосеющем регионе страны семена отечественного производства занимают всего лишь 12%. Это катастрофически малая доля, учитывая то, что сорта, покупаемые за рубежом, часто не подходят под местные климатические критерии для посева. Например, востребованный сорт «Лидер» в самой России был забракован и снят с производства двадцать лет назад и лишь 40 гектаров данного сорта сеют в Краснодаре исключительно для продажи в Кызылординскую область. Рисоводы страны еще выплачивают патентообладателю роялти в размере 3,5 процента [59]. Данная ситуация говорит о том, что перед отечественными селекционерами и генетиками стоит задача выведения новых сортов риса, которые обладали бы качественными характеристиками, в том числе и устойчивость к пирикуляриозу.

1.4 Возбудитель пирикуляриоза риса

Magnaporthe oryzae (*Magnaporthe grisea*) – возбудитель пирикуляриоза риса, является гемибиотрофным патогеном, принадлежащим к семейству *Magnaporthaceae*. Этот грибок поражает растения на всех стадиях развития и заражает листья, стебли, узлы, метелки и корни. *Magnaporthe oryzae*, как известно, заражает многие культуры, включая рис, пшеницу, несколько видов проса и другие злаки. Возбудитель пирикуляриоза риса занимает первое место в списке 10 наиболее разрушительных грибковых патогенов растений [60]. Процесс заражения начинается с посадки и прикрепления конидии к кутикуле листа растений. Адгезивная среда из прорастающей конидии помогает прилипнуть к кутикуле. Конидий при благоприятных условиях прорастает, образуя трубку, которая далее дифференцируется в апрессорий [61]. Аппрессорий имеет дифференцированную клеточную стенку и отчетливый слой меланина между клеточной стенкой и клеточной мембраной. Этот слой помогает в создании давления, которое позже преобразуется в механическую силу через крючок проникновения и помогает внедриться через кутикулу листа. Попав внутрь клетки, гифы быстро размножаются, что приводит к развитию заболевания и видимым симптомам пирикуляриоза [62].

Каплевидные конидии имеют три клетки, каждая с одним ядром. (ii) Прорастание обычно происходит с сужающегося конца, и ядро переходит в зародышевую трубку, где происходит митоз. Одно дочернее ядро возвращается в спору, а другое перемещается в раздутый кончик зародышевой трубки. Инициация аппрессория контролируется прогрессированием последнего ядра в S-фазу клеточного цикла, которая на гидрофобной поверхности занимает 2-4 часа (рис.7).

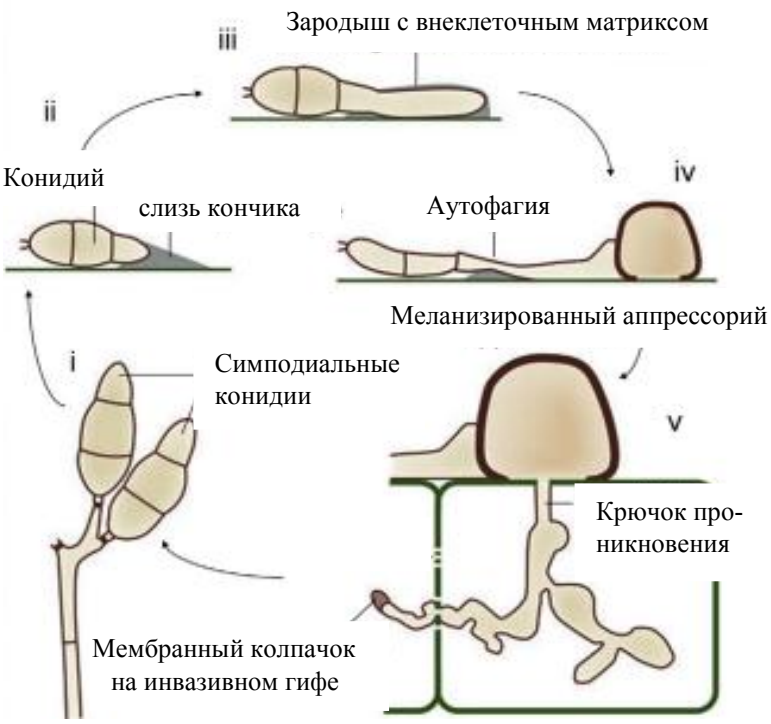


Рисунок 7 – Схематическое изображение прогрессирования клеточного цикла во время развития аппрессориума у гриба *M. Grisea*

Дифференциация аппрессория контролируется на переходе G2-M. На уровне окружающей среды образование аппрессория зависит от растительных и нерастительных сигналов, включая физические сигналы, такие как гидрофобность и твердость (аппрессории будут образовываться на искусственных поверхностях), мономеры кутина растений и истощение азота. (iii) Происходит аутофагия споры и зародышевой трубки, и глицерин, синтезированный из липида и гликогена, перемещается в аппрессорий. Аутофагия необходима для вирулентности, поскольку аппрессорий формируется за счет конидиального содержимого, как показано целевой мутацией гена аутофагии MgATG8, которая привела к авирулентному штамму. (iv) Тургорное давление до 8 МПа (т.е. в 40 раз выше, чем у автомобильной шины) создается путем накопления глицерина внутри одноклеточного куполообразного аппрессория, который изолирован слоем меланина в стенке [49]. Это тургорное давление, подаваемое очень контролируемым образом, позволяет проникающему штифту прокладывать себе путь через кутикулу и клеточную стенку, но плазматическая мембрана остается нетронутой и становится инвагинированной вокруг проникающей гифы. Это ключевая точка распознавания для грибка и хозяина. Растение реагирует выработкой активных форм кислорода (ROS) вокруг места заражения, но грибок выработал быстрый механизм детоксикации ROS. Рост в следующую клетку происходит через кластеры плазмодесм, называемые ямочными полями. Гифы, которые проникают в соседние клетки, имеют мембранный колпачок, состоя-

щий из мембранных пластинок, которые, вероятно, секретируют белок в цитоплазму живой клетки-хозяина. (v) Появление конидиеносцев через 4-5 дней после заражения [63].

Патоген проникает в растение через споры, которые, прорастая, формируют аппрессорий – специализированную структуру, обеспечивающую прикрепление к поверхности тканей и внедрение. Далее развивается гаустория – внутриклеточная питательная форма, обеспечивающая гриб колонией. После осаждения на листья и чувствительные ткани растения, споры прорастают и образуют аппрессорий, способный проникать в клеточную стенку с помощью проникающего пега. Под давлением структура вскрывается, и гифы внедряются внутрь клетки [64]. Развитие гриба продолжается в виде меж- или внутриклеточных гиф, вызывающих образование характерных некротических поражений. Первичные симптомы наблюдаются на листьях в фазу кущения, проявляясь в виде веретеновидных, круглых или ромбовидных пятен с заострёнными краями. После укоренения гиф начинается споруляция и образование конидий. Жизненный цикл гриба завершается в течение одной недели. Каждая фаза – от спорообразования до инвазии – требует определённых условий и имеет важное эпидемиологическое значение [65]. Споруляция – ключевой этап, инициирующий развитие эпифитотии, поскольку обеспечивает формирование инокуляционного материала. Заражение риса происходит, в основном, от всходов до позднего кущения. Первичные пятна – водянистые, быстро перерастают во влажной тёплой среде в крупные ромбовидные образования с серо-синим оттенком, типичным для спороношения. На интенсивность поражения влияют возраст посевов, площадь некроза и сортовые особенности культуры. При тяжёлых инфекциях поражения могут сливаться, охватывая значительную часть листовой поверхности [66].

1.4.1 Факторы, связанные с патогенностью *M. oryzae*

Известно, что устойчивость риса к поражению грибом *M. oryzae* разделяют на вертикальную (расоспецифическую) и горизонтальную (полевую). Согласно теории Ван дер Планка первая устойчивость является общей, а вторая количественной. Вертикальная устойчивость контролируется основными генами, горизонтальная – чаще всего минорными или множественными. Устойчивость риса к пирикуляриозу несет доминантный характер и соответственно является доминантным признаком [67].

Анализ Avr и эффекторных генов. Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) распознаются рецепторами распознавания образов (PRR), локализованными на поверхности клетки хозяина, для активации иммунитета растений [68]. Иммунитет, запускаемый PAMP (PTI), составляет первый уровень иммунитета растений, который ограничивает распространение патогенов. Чтобы установить успешную инфекцию, *M. oryzae* должен преодолеть PTI. Поэтому успешный изолят переключается на развертывание эффекторных бел-

ков, что приводит к ответу, известному как восприимчивость, запускаемая эффекторами (ETS) [69]. В ETS эффектор взаимодействует с регуляторами защиты хозяина, такими как секретируемый белок LysM 1 (Slp1) с двумя доменами LysM; действует как конкурентный ингибитор связывания хитина с белком, связывающим элиситор хитина хозяина (CEBiP); и тем самым подрывает PTI [70]. Недавнее исследование продемонстрировало аналогичный механизм, где хитиназа 1 (MoChia1) конкурентно ингибирует связывание белка тетратрикопептидного повтора хозяина (OsTPR1) с PAMP, хитином и нарушает PTI [70]. Совсем недавно было обнаружено, что эффекторы, такие как MoHTR1 и MoHTR2, напрямую нацелены на ядро риса, чтобы подорвать PTI [71]. На сегодняшний день 26 генов Avr/эффекторов были картированы в *M. oryzae*, и 14 из них, включая два некартированных Avrs, MoHTR1 и MoHTR2, были клонированы и охарактеризованы.

Среди 26 сообщенных Avr-генов 15 были картированы вблизи концов хромосом, а 5 из клонированных Avr-генов были фланкированы транспозонами. Эти транспозоны являются активными компаньонами Avr-генов и играют роль в потере и приобретении этих генов. Молекулярные исследования взаимодействия сообщенных семи пар R-Avr показали, что пять из них, а именно Pi-ta/AVR-Pita, Pik/AVR-Pik, Pia/AVR-Pia, Pi-CO39/AVR1-CO39 и Pi54/AVRPi54 взаимодействуют напрямую, тогда как Piz-t/AvrPiz-t и Pii/AVR-Pii взаимодействуют косвенно. Помимо взаимодействий один к одному, также сообщалось о двух других типах взаимодействий. Один, где два белка R (гомолога) взаимодействуют с одним белком Avr, например, в Pik-1 и Pik-2 с AVR-Pik [72], и аналогичный механизм предсказывается в случае недавно клонированных Avr MoHTR1 и MoHTR2, которые, как предсказывают, взаимодействуют с одним и тем же целевым белком. В другом взаимодействии два разных белка Avr могут быть распознаны одним комплексом белка R, например, двумя белками NLR, гетеродимерами RGA4 и RGA5, взаимодействующими с AVR-Pia или AVR1-CO39 [73].

Понимание механизма устойчивости растений против патогена помогло многим исследователям при созданиях схем долговременной резистентности широкого спектра действия, что в свою очередь облегчает работу селекционеров.

1.4.2 Гены резистентности как индивидуальные защитники и механизм устойчивости к пирикуляриозу

Гены устойчивости (R) являются неотъемлемой частью комплекса защитных клеток растений, а гены R и защитного ответа (DR) способствуют широкому спектру устойчивости к пирикуляриозу у риса [74]. Иммунные реакции, регулируемые большинством этих генов R, имеют переплетенные сети, и они в основном регулируют последующие общие защитные пути [75]. На сегодняшний день более 100 генов пирикуляриоза были картированы в рисе, и 38 из них

были клонированы и охарактеризованы. В результате комплексных генетических исследований риса в отношении его патогена *M. oryzae* взаимодействие риса и *M. oryzae* стало ведущей модельной системой для понимания взаимодействий растительных и грибковых патогенов. Узкая расоспецифичность R-генов и способность патогена быстро развивать новые расы, совместимые с генами устойчивости, являются основными препятствиями в достижении длительной защиты от пирикуляриоза [76].

Выявление и использование генов R, которые обеспечивают широкий спектр устойчивости против большого количества патогенных рас, является наиболее эффективным подходом к управлению заболеванием. Интересно, что среди этих 38 генов R бластов восемь, а именно *Pi9*, *Pi54*, *pi21*, *Pi50*, *Pi7*, *Pi57*, *Pigm* и *Ptr*, как сообщается, обеспечивают широкий спектр устойчивости к пирикуляриозу, и только три, *Pi5-1*, *Pi63* и *Pb1*, являются патоген-индуцируемыми, а остальные экспрессируются конститутивно. Недавно Wang и др. провели полногеномный анализ генов NBS-LRR в генотипе риса с широким спектром устойчивости Tetep и функционально подтвердили роль 90 генов NBS-LRR в устойчивости к пирикуляриозу. Ниже в таблице 2 приведены некоторые из генов устойчивости к пирикуляриозу [77,78].

Таблица 2 – Гены устойчивости к пирикуляриозу

ID гена	Номер хромос.	Позиция (cM)	Источник гена (сорт риса)	Литература
1	2	3	4	5
Pit	1	9,08–12,17	Tjahaja	[78]
Pi27(t)	1	24,29–27,90	IR64 (*indica*)	[79]
Pi24(t)	1	20,97–22,22	Azuenca (*japonica*)	[80]
Pi37	1	132,44–133,95	St. No. 1 (*japonica*)	[81]
Pish	1	135,3-138,7	Shin2 (*japonica*)	[82]
Pig(t)	2	137,38–140,54	Guangchangzhan (*indica*)	[83]
Piy2(t)	2	153,2–154,1	Yanxian No. 1	[84]
Pib	2	153,2–154,1	Tohoku IL9	[85]
Pi25(t)	2	137,44–150,90	IR64 (*indica*)	[86]
Pi68	3	6,8-9,7	*O. glumaepatula* (W)	[87]
Pi10	5	58,08–75,41	Tongil	[88]
Piz	6	40,6–42,07	Zenith (*japonica*)	[89]
Piz-t	6	58,7	Toride 1	[90]
Pi9	6	41,5–41,55	*O. minuta* (W)	[91]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Pi25(t)	6	72,32–77,03	Gumei 2	[86]
Pi8	6	19,5–24,09	Kasalath (*indica*)	[92]
Pi3(t)	6	-	Pai-kan-tao (*japonica*)	[93]
Pid2	6	68,63–68,65	Digu	[94]
Pigm(t)	6	41,47–41,68	Gumei 4	[95]
Pi33	8	23,66–24,61	IR64 (*indica*)	[93]
Pizh	8	17,48–84,04	Zhai-Ya-Quing8 (*indica*)	[79]
Pi11	8		Zhai-Ya-Quing8 (*indica*)	[96]
Pi29(t)	8	38,65–64,96	IR64 (*indica*)	[79]
Pi15	9	38,56–38,74	GA25 (*japonica*)	[92]
Pi28(t)	10	78,26–90,67	IR64 (*indica*)	[79]
Pi30(t)	11	1,76–26,31	IR64 (*indica*)	[79]
Pi7(t)	11	71,4–84,3	RIL29 (*japonica*)	[97]
Pi34	11	77,69–77,96	Chubu32 (*japonica*)	[98]
Pi38	11	76,55–87,91	Tadukan (*indica*)	[99]
PBR	11	80,5–120,3	St. No. 1	[100]
Pb1	11	85,7–91,4	Modan	[101]
Pi44(t)	11	91,4–117,9	RIL29 (*japonica*)	[102]
Pik-h (*Pi54*)	11	99,0–99,05	Tetep	[103]
Pi1	11	105,99–113,49	LAC23 (*japonica*)	[104]
Pik-m	11	109,25–110,13	Tsuyuake (*japonica*)	[105]
Pik	11	109,25–110,13	Kusabue (*indica*)	[106]
Pik-p	11	109,25–110,14	HR22 (*indica*)	[90]
Pik-s	11	109,25–110,15	Shin 2 (*japonica*)	[107]
Pik-g	11	109,25–110,16	GA20 (*japonica*)	[92]
Pise1	11	22,96–66,92	Sensho	[108]
Mpiz	11	16,29–66,92	Zenith (*japonica*)	[109]
Pikur2	11	11,36–73,49	Kuroka (*japonica*)	[110]
Pish	11	110,3–111,8	Nipponbare (*japonica*)	[82]
Pib2	11	105,99–113,49	Lemont (*japonica*)	[111]
Pi44	11	85,7–89,7	Moroberekan (*japonica*)	[102]
Pi47	11	-	Xiangzi (*indica*)	[112]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Pi12	12	27,95–60,48	Moroberekan (*japonica*)	[113]
Pi21(t)	12	20,94–22,22	Owarihatamochi (Japonica)	[110]
Pi31(t)	12	30,92–47,66	IR64 (*indica*)	[79]
Pi32(t)	12	52,41–75,46	IR64 (*indica*)	[79]
Pita	12	42,41–42,43	Tadukan (*indica*)	[90]
Pita-2	12	40,31–52,84	Shimokita (*japonica*)	[114]
Pi19(t)	12	35,30–53,67	Aichi Asahi (*japonica*)	[115]

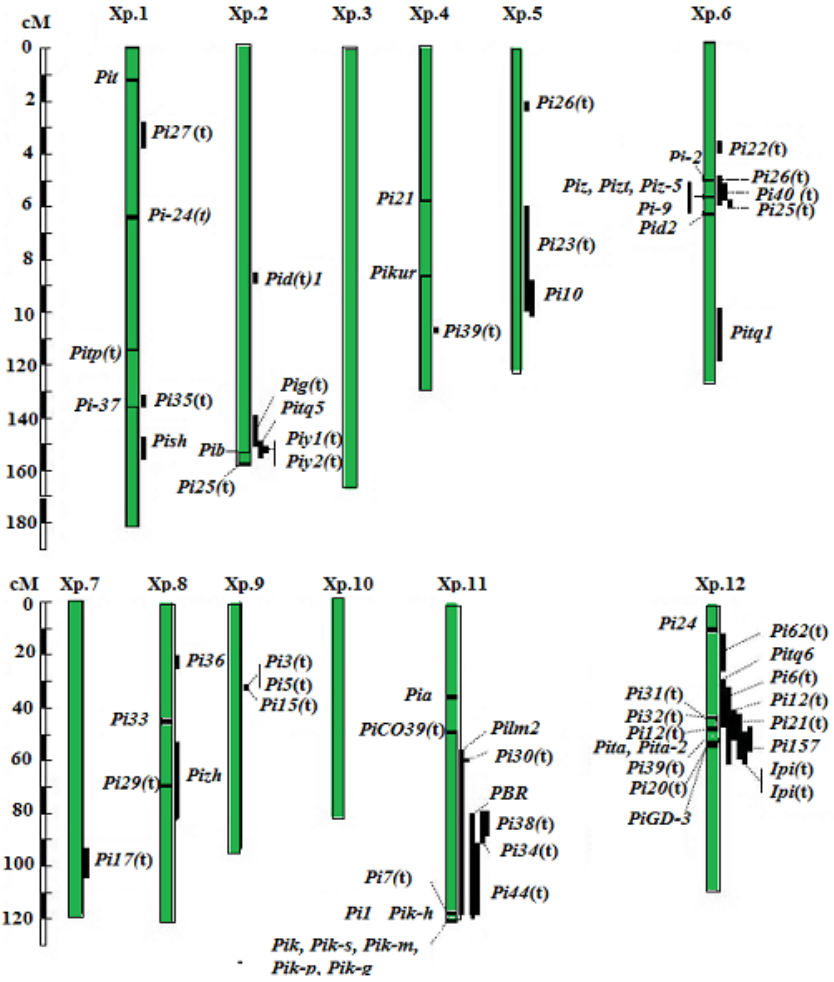


Рисунок 8 – Молекулярно-генетическая карта локализации генов *Pi* на группах сцепления у риса [116]

Механизм действия генов устойчивости на примере гена Pi54. Гены R обычно действуют поодиночке, вызывая иммунный ответ у риса. Однако нис-

ходящие пути, ведущие к ответу устойчивости, охватывают один или несколько белков DR. Обнаружено, что по крайней мере некоторые из описанных комбинаций генов R и DR демонстрируют положительную связь для придания устойчивости к пирикуляриозу у риса, например, Pid2 с OsPUB15, Pik-H4 с OsBIHD1 и Pita с геном-имитатором поражения (sl) [117]. Помимо генов R, сообщается, что пять генов DR bsr-d1, bsr-k1, OsBBI1, spl11 и spl33 придают широкий спектр устойчивости к пирикуляриозу. Среди генов DR, идентифицированных для широкого спектра устойчивости к пирикуляриозу у риса, гены-имитаторы поражения риса образуют основную часть этих генов. Эти мутанты LMM посредством запрограммированной клеточной смерти имитируют симптомы пирикуляриоза и естественную реакцию HR, вызывая реакцию устойчивости. У риса насчитывается более 30 генов lmm, отвечающих за устойчивость к пирикуляриозу. Однако большинство из этих генов связаны с потерями урожайности при передаче иммунного ответа. Следовательно, гены lmm имеют ограниченное применение для селекции риса, на устойчивость к пирикуляриозу [118].

Ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi54*, клонированный из индийского риса Tetep, представляет особый интерес, поскольку это один из самых мало известных генов устойчивости R. *Pi54* обеспечивает широкий спектр стойкой устойчивости к инфекции *M. oryzae* [119].

Функциональная роль *Pi54* в устойчивости к пирикуляриозу была подтверждена с использованием трансгенного и опосредованного РНК-интерференцией подхода [120]. Впоследствии ортологи гена *Pi54*; *Pi54rh* и *Pi54of*, также демонстрируют широкий спектр и перекрывающиеся паттерны устойчивости против нескольких штаммов *M. oryzae* [121]. Основным доменом взаимодействия Avr-Pi54 с *Pi54* и его ортологами является домен не-LRR. Схематическая диаграмма, изображающая молекулярный механизм резистентности механизма действия *Pi54*, состоит из неактивного белка OsRac1, связанного с Sti1. Белок OsRac1 активируется молекулой GEF путем взаимодействия с доменом RhoGEF.

Хитин, полученный из *M. oryzae*, основной PAMP, вызывает активацию GEF, который далее запускает OsRac1. Далее, PAMP-рецептор, OsCERK1, передает сигнал нижестоящим мишеням через комплекс Hop/Sti1a и Hsp90, который взаимодействует с OsCERK1 через свой трансмембранный домен [122]. После активации OsRac1 привлекает RACK1A, который далее взаимодействует с N-концом белков RAR1 и SGT1 и регулирует выработку ROS, взаимодействуя напрямую с N-концом мембраносвязанного Rboh, NADPH-оксидазы [122]. Кроме того, для активации каскада сигнализации, опосредованного MAPK6 риса, требуется OsRac1, который образует комплекс с MAPK6 в экстрактах клеток риса [123]. В процессе резистентности, опосредованной *Pi54*, он индуцирует экспрессию различных генов защитного ответа, таких как каллоза, лакказа, пероксидаза и PAL, а также генов, связанных с ТФ, такими как цинковый палец Dof, MAD box, NAC6, bZIP и WRKY. Исследования трансгенного риса с *Pi54* и

его контрольного растения дикого типа показал, что miR815c, который нацелен на ген DR OsWAK129b, был подавлен в трансгенных растениях. К усиленным miRNAs относятся miR164c, miR164e, miR1849, miR1854-3p, miR2925, miR396c5p, miR396c-3p и miR812f. Резистентность, опосредованная геном *Pi54*, против инфекции *M. oryzae* регулируется набором микроРНК через пути PTI и ETI, схематический механизм представлен на рисунке 9 [124].

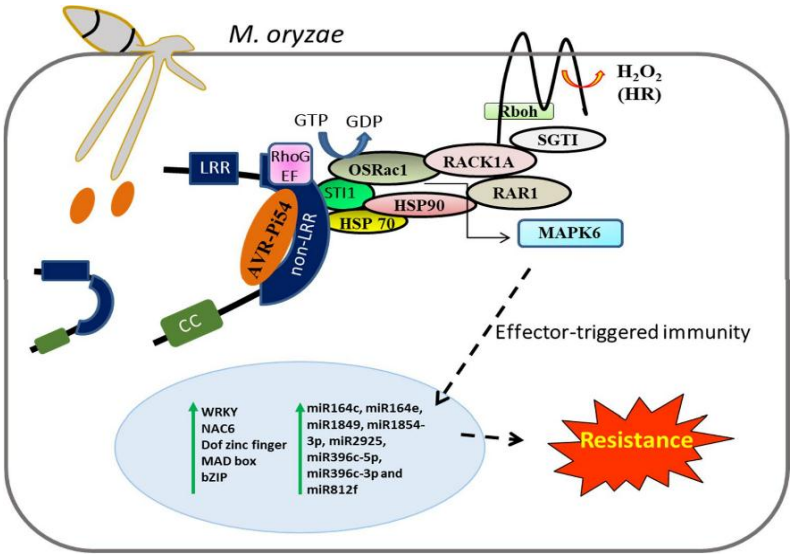


Рисунок 9 – Схематическое представление механизмов опосредованной локусом *Pi54* устойчивости к пирикуляриозу [124]

Необходимо учитывать то, что тем больше генов устойчивости к пирикуляриозу у сортов риса, тем больше шансов долговременного действия генов, а также резистентность ко многим расам возбудителя инфекции.

1.4.3 Реакция устойчивости риса к пирикуляриозу

Антагонистические взаимодействия между рисом и грибом *M. oryzae* приводят к развитию каждого из них. В то время как растение пытается распознать патоген и помешать его росту и распространению, патоген пытается помешать распознаванию и подавить реакции хозяина [125]. Известно, что устойчивость к пирикуляриозу риса в некоторых случаях наследуется как количественный признак, регулируемый многими генами. Современные подходы, которые применяются для других полигенетических признаков, также применимы для изучения количественно наследуемой устойчивости к пирикуляриозу. Базовые подходы к картированию QTL, такие как анализ отдельных маркеров (SMA), простое интервальное картирование (SIM) и интервальное картирование (IM), широко использовались для обнаружения основных и второстепенных QTL, связанных с полной/частичной устойчивостью к пирикуляриозу риса [79,126]. Картирование геномных регионов для количественной устойчивости к

пирикуляриозу приобрело важность из-за расовой неспецифичности устойчивости, которая обеспечивает стабильную защиту от патогена [127]. Впервые QTL устойчивости к пирикуляриозу был идентифицирован в широко распространенном африканском сорте Moroberekan [97]. Также есть случаи, в которых было показано, что устойчивость к пирикуляриозу регулируется генами расоспецифичной устойчивости, такими как *Pi34*, *Pif*, *Pi21* и *Pb1* [100,128]. На сегодняшний день более 500 QTL, контролирующих устойчивость к пирикуляриозу у риса, были идентифицированы и картированы на различных хромосомах риса [75]. Большинство из этих QTL были идентифицированы из двуродительских популяций, полученных из подвидов *japonica* и *indica*, с помощью различных маркерных систем, таких как RFLP, SSR и SNP [129]. QTL, демонстрирующие скромный индивидуальный эффект с расонеспецифической или устойчивостью широкого спектра действия, обеспечивают длительную устойчивость [130]. Таким образом, важно идентифицировать и использовать новые гены устойчивости в селекции отечественного риса.

Использование устойчивости растений-хозяев для управления болезнями является экологически чистым и наиболее жизнеспособным подходом к управлению болезнями, поскольку широкий спектр аллелей устойчивости доступен в различных зародышевых плазмах риса [131]. Клонированные гены устойчивости, как известно, кодируют белки с сайтами связывания нуклеотидов (NBS) и доменами повторов, богатых лейцином (LRR) [132,133]. Исключениями являются ген *Pi-d2*, который кодирует белок домена B-лектинкиназы, *pi21*, который кодирует белок, богатый пролином, с доменом тяжелых металлов, и *Ptr*, который кодирует атипичный белок с повтором armadillo [132]. Большинство выявленных генов устойчивости к пирикуляриозу кластеризованы на хромосомах 6, 11 и 12, в то время как клонированные гены устойчивости к пирикуляриозу кластеризованы на хромосомах 6 и 11. Примечательно, что большое количество генов устойчивости (28 генов R) картировано на хромосоме 11, а хромосомы 3, 7 и 10 несут одиночные гены устойчивости. Известно, что гены *Pi2*, *Pi54*, *Pi9*, *Pigm* и *Pizt*, картированные на хромосоме 6, обеспечивают широкий спектр устойчивости. Подавляющее большинство генов устойчивости к пирикуляриозу распределены по кластерам тесно связанных генов. По крайней мере три основных кластера генов устойчивости к пирикуляриозу были обнаружены у риса на хромосомах 6, 11 и 12. Несколько исследований продемонстрировали, что генетический контроль устойчивости к пирикуляриозу является сложным и включает как основные, так и второстепенные гены с комплементарными взаимодействиями. Чтобы быть впереди в эволюционной гонке между патогеном и хозяином, необходимо постоянно идентифицировать новые гены устойчивости из ранее неиспользованных генетических ресурсов [134].

Изучение генов устойчивости к пирикуляриозу предоставляет понимание дальнейших манипуляции с генами в разных исследовательских направлениях, в том числе и в создании устойчивых гибридов.

1.5 Молекулярные механизмы поражения листьев, метелок и стеблей

Пирикуляриоз – это заболевание, которое может повлиять на урожай риса на всех этапах его роста, начиная с посадки семян и до стадии налива зерна, при наличии благоприятных условий окружающей среды. Споры гриба образуются и распространяются в условиях высокой относительной влажности, продолжительные периоды присутствия свободной влаги, а также ночные температуры в диапазоне от 18 до 24 °C и отсутствие ветра ночью. Оптимальная температура для прорастания спор, развития поражений и дальнейшей споруляции составляет 25-28°C. Заболевание риса проявляется в двух основных фазах: поражение листьев наблюдается в вегетативной стадии растения, а поражение шейки (или метелки) – в репродуктивной стадии. При заражении шейки происходит блокировка потока питательных веществ к развивающимся зернам, что приводит к образованию пленчатых зерен или пустых метелок. Во время эпидемий ущерб, вызванный поражением шейки, может быть в два раза более серьезным, чем при поражении листьев, с потерями урожая, достигающими 70% от ожидаемого объема [135]. Хотя известно более 100 R-генов устойчивости к пирикуляриозу листьев, очень мало генов устойчивости к пирикуляриозу стеблевых узлов были идентифицированы и локализованы в геноме риса. Реакция болезни листьев и метелки на заражение пирикуляриозу различна, и сорта, восприимчивые к пирикуляриозу листьев, устойчивы к пирикуляриозу шейки и наоборот. Некоторые из сортов, устойчивых на стадии рассады, становятся восприимчивыми к пирикуляриозу шейки [136]. Сообщаемая восприимчивость генотипов устойчивости к пирикуляриозу листьев к пирикуляриозу шейки и наоборот предполагает, что разные гены участвуют в устойчивости к пирикуляриозу листьев и узлов. В других исследованиях ген/QTL устойчивости метелки были сопоставлены с геномными локациями, содержащими основные гены устойчивости к пирикуляриозу листьев, тем самым предполагая существование общих генов устойчивости к обеим фазам заболевания [137]. Ген *Pb1*, картированный на длинном плече хромосомы 11 в сорте *indica* «Модан», является первым геном устойчивости к пирикуляриозу метелки, который был идентифицирован у риса [101]. Ген был интрогрессирован в несколько сортов в Японии и показал длительную устойчивость к пирикуляриозу в течение почти 30 лет [138]. Ген демонстрирует более низкие уровни экспрессии на стадии рассады, но его экспрессия достигает пика на стадии полного колошения, что объясняет его сильную устойчивость к пирикуляриозу метелки. Эти результаты были приняты для отражения того, что временной и пространственный паттерн экспрессии гена устойчивости к пирикуляриозу является основным фактором при принятии решения о том, будет ли ген обеспечивать защиту от пирикуляриоза листьев или узлов, или обеих фаз заболевания [139]. Zhuang и др. идентифицировали ген устойчивости к пирикуляриозу Pi25(t), который обеспечивает устойчивость как к пирикуляриозу листьев, так и узлов [140]. Ma и др. идентифицировали ген устойчивости *Pi64*, который конститутивно экспрессируется во

всех тканях и обеспечивает защиту как от пирикуляриоза листьев, так и от пирикуляриоза стеблевых узлов [134]. Noenplab и др. сообщили о совместной локализации QTL для устойчивости к пирикуляриозу листьев и шейки в одних и тех же геномных регионах на хромосомах 1, 11 и 12 [137].

Из различных доступных средств для сдерживания пирикуляриоза выведение устойчивых сортов является наиболее подходящей, экологически безопасной и экономически эффективной стратегией. Поскольку устойчивость к пирикуляриозу у риса включает взаимодействия генов, сорта, несущие одиночные гены R, часто поддаются заболеванию из-за появления вирулентных рас патогена, что происходит из-за мутации гена авирулентности, чтобы избежать обнаружения соответствующим геном R хозяина. Пирамидирование нескольких R-генов было предложено для содействия стойкой устойчивости к пирикуляриозу [141]. Селекционером П.И. Костылевым (г. Зерноград, РФ) созданы гибридные растения с 4, 5 и 6 генами устойчивости: *Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b, Pi-ta* и *Pi-40* и передан на Государственное сортоиспытание сорт риса Пентаген который обладают 5 генами резистентности к пирикуляриозу – *Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-b, Pi-ta*. В результате выполнения данной работы также были получены перспективные пирамидированные казахстанские гибриды риса с 2 и 3 генами на устойчивость к пирикуляриозу. Генетическое картирование и молекулярное клонирование различных генов устойчивости к пирикуляриозу предоставило огромное количество связанных или основанных на генах маркеров для эффективного отбора генов устойчивости в селекционных программах. Несколько генов устойчивости к пирикуляриозу были обнаружены в рисе с использованием различных подходов с использованием геномики для достижения длительной устойчивости к пирикуляриозу [142].

1.6 Значимость гаплоидной биотехнологии в селекции риса и в получении материала с желаемыми признаками

Метод гаплоидной биотехнологии используется для ускорения процесса селекции, позволяя получать стабильное растение за одно поколение, поэтому в рисоводстве и селекции других сельскохозяйственных культур метод культуры пыльников и микроспор применяется для стабилизации перспективных популяций делящихся растений. Обычно при традиционных методах селекции требуется 6-8 поколений для получения гомозиготных линий [143]. По сравнению с селекцией гибридных линий селекция гаплоидных растений на основе маркерных признаков в 5-6 раз эффективнее. Гаплоидные растения представляют большой интерес для селекционеров, поскольку их используют для ускорения получения удвоенных гаплоидных гомозиготных линий, так называемых «чистых линий», в которых все гены, отвечающие за агрономические признаки, зафиксированы в гомозиготном состоянии [144].

Линии с двойными гаплоидами (DH) в рисе в основном получают посредством андрогенеза с помощью культуры пыльников. Niizeki и Oono были пер-

выми, кто сообщил об этой методике в рисе [145]. Культивирование пыльников риса в определенной среде вызывает индукцию каллусов из гаплоидных микроспор, которые отклоняются от своего первоначального гаметофитного пути в сторону спорофитного пути. Андрогенез в рисе изначально подразумевает двухэтапный процесс. Сначала индукция каллуса, а затем регенерация спонтанных зеленых проростков DH из эмбриогенного каллуса. Регенерация спонтанных растений DH в рисе происходит со скоростью около 30-40%. Тем не менее, для повышения эффективности андрогенеза можно объединить третий этап удвоения хромосом, чтобы воспользоваться преимуществами регенерированных зеленых гаплоидных проростков [146].

Андрогенез в рисе имеет много ограничивающих факторов, которые снижают эффективность процесса. Эндогенные факторы, такие как генотип, играют ключевую роль в андрогенезе. В целом, основными проблемами, определяющими эффективность культуры пыльников у риса, являются высокая зависимость от генотипа, низкая индукция каллуса, низкая регенерация ростков, высокое соотношение альбиносных ростков, низкая частота DH и высокая частота гаплоидных ростков. В частности, генотипы риса *indica* имеют более низкий уровень успеха, чем генотипы *japonica* риса из-за раннего некроза, слабой индукции каллуса и высокого соотношения регенерированных альбиносных ростков [147].

У риса культура пыльников является высокоспецифичной для вида и генотипа. *Oryza glaberrima* L. лучше реагирует на индукцию каллуса и регенерацию проростков, чем генотипы *Oryza sativa*. Азиатский культивируемый рис (*O. sativa, ssp. indica*) более устойчив к культуре пыльников, чем типы *japonica* (более чем в 20 раз сильнее, чем *indica*), что ограничивает его практическое применение в селекции риса. Основное препятствие заключается в ограниченном морфогенетическом потенциале каллусов, полученных из пыльников, из-за вариации числа и структуры хромосом, мутации генов и эпигенетических изменений (метилирование ДНК) и более высоком проценте регенерированных растений-альбиносов из-за изменений в ДНК хлоропластов. Однако ряд исследователей получили различные ответы, и потребовалось много времени, чтобы стандартизировать протокол для эффективного андрогенного ответа в индийском рисе. Каждый отдельный пыльник содержит несколько тысяч пыльцевых зерен [148].

Полученные гаплоиды в культуре затем преобразуются в статус двойных гаплоидов (DH) путем обработки колхицином (удвоение хромосом) для исправления гомозиготности всего за одно поколение, либо же используется спонтанное удвоение хромосом. Таким образом, большое количество чистых линий, полученных путем обхода нормального оплодотворения, затем выращиваются для выбора лучшей превосходной линий. Это сокращает цикл размножения, экономит время, пространство и труд. Таким образом, метод размножения с удвоенными дигаплоидами (DH) является потенциальным инструментом

для быстрого успеха в разработке новых сортов (в течение 5-6 лет) риса с новыми комбинациями генов из пыльников гибридов F_1 (первого дочернего поколения), не дожидаясь нескольких поколений самоопыления для восстановления чистых линий размножения. В настоящее время более 40 сортов риса были созданы с использованием метода культуры пыльников. Сообщается, что некоторые из удвоенных дигаплоидных линий, полученных от разных родителей, равны или превосходят гетерозисный уровень гибрида [149]. Кроме того, также используется культура пыльников растений BC_1 (первое поколение обратного скрещивания) для быстрой интрогрессии определенных признаков от элитных доноров. Метод DH помогает в фиксации трансгена [150]. Некоторые из DH могут оказаться потенциально важными для селекции, например, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, улучшенные агрономические признаки и потенциал урожайности, а также лучшие питательные и кулинарные качества. Такие элитные DH могут быть пригодны для разработки гетерозисных гибридов. Кроме того, линии DH служат фиксированной картографической популяцией для построения генетической карты сцепления, маркировки ценных генов/локусов количественных признаков (QTL) с использованием исследований ассоциаций маркер-признак [151], селекции с помощью маркеров [152], использования в функциональной геномике и селекции мутантов in vitro [153].

В современной селекции рассматриваются два основных пути повышения продуктивности риса. Методы, предложеные В.А. Струнниковым и испытанные во ВНИИ риса, более прогрессивны так как позволяют не только закрепить гетерозисный эффект в последующих поколениях, но и улучшить генотип гибридов посредством элиминации летальных и полулетальных генов, значительно снижающих продуктивность [154].

Тем не менее, методика культивирования изолированных пыльников и микроспор пока не получила широкого применения в практической селекции из-за генотип-зависимости процесса регенерации и низкой частоты получения зеленых регенерантов. Для сортов, видов и подвидов риса характерна различная отзывчивость в культуре пыльников: максимальная отзывчивость наблюдается у глютинозного риса, за которым следуют подвид *japonica*, гибриды *japonica/indica*, гибриды *indica/indica* и подвиды *indica*. Изменчивость этого признака внутри подвида также весьма значительна. Гаплоидные растения обладают рядом преимуществ в селекционной работе. Гаплоиды содержат один набор хромосом, что позволяет селекционерам наблюдать мутации непосредственно при изучении растений. Полиплоидизация гаплоидов приводит к появлению двойных гаплоидов, характеризующихся абсолютной гомозиготностью, что позволяет стабилизировать ценные гибридные линии разведения и создавать «чистые линии» [155].

Изучение возможности получения регенерантов из тканей пыльника показало, что ткани пыльника не способны к регенерации растений. В опытах все полученные при культивировании на среде растения происходят из пыльцы.

Однако, ткани пыльника стимулируют андрогенез и обеспечивают дополнительное питание микроспор в период дифференциации, адсорбируя и трансформируя питательные элементы среды [156].

Использование удвоенных дигаплоидов риса позволяет повысить эффективность селекционного процесса и ускорить получение генетически стабильных линий. Применение метода андрогенеза *in vitro* позволяет ускорить получение гомозиготных удвоенных гаплоидов, а также отобрать полезные линии с заданными признаками (устойчивость к болезням, засухе, холоду, качество зерна и т. д.). Биотехнология получения удвоенных дигаплоидов считается одной из самых экологически чистых и абсолютно безвредных, что позволяет преодолеть недостатки классических методов селекции [157].

1.7 Генетико-селекционные подходы к формированию продуктивности риса и механизмам её повышения

При создании новых селекционных линий злаковых культур необходимо следить за продуктивностью этих растений и на основе результатов проводить выбраковку тех гибридов, несоответствующих определенным параметрам средней/высокой продуктивности. Формирование высокой урожайности риса обычно требует тонкого баланса между различными параметрами, и превосходное значение для одного параметра обычно не приводит к повышению урожайности риса. Хотя потенциал урожайности риса был существенно улучшен за счет селекции за последние несколько десятилетий, механизмы, лежащие в основе этих улучшений урожайности, далеки от выяснения. Понимание того, как эти различные элитные сорта риса достигли своей высокой урожайности, откроет новые возможности для объединения этих превосходных признаков для разработки сортов с дальнейшей улучшенной производительностью [158].

Урожайность является одним из самых важных и сложных признаков риса. Она регулируется генами, известными как локусы количественных признаков, и на нее влияют внешние факторы окружающей среды. У риса урожайность определяется косвенными признаками, такими как высота растения, длина вегетации, способность к кущению, длина метелки, длина зерновки, скорость завязывания семян и количество зерен на метелку, а также прямыми признаками, такими как количество метелок на единицу площади и/или на растение, количество заполненных зерен на метелку и вес 1000 зерен [159].

Важно, чтобы будущие исследования были сосредоточены на понимании природы и силы взаимосвязи между урожайностью и ее компонентами, что повысит эффективность генетического отбора в программах селекции растений. Исследователи уже количественно оценили ассоциации между урожайностью и компонентами урожайности в ряде исследований [160].

Необходимы стратегии по увеличению производства зерна для удовлетворения потребностей в продовольствии постоянно растущего населения. Невозможно увеличить площадь посадки риса, чтобы получить более высокое

производство риса, поэтому увеличение урожайности зерна на единицу площади и частоты сбора урожая является единственным вариантом для получения максимальной прибыли. Разработка гибридного риса привела к быстрому увеличению урожайности риса. Гибридный рис давал более высокий урожай зерна, чем инбредный рис [161]. Гибридный рис выдает на 9% более высокий урожай, чем лучшие инбредные сорта в тропических орошаемых местностях. Другие полевые исследования показали, что урожайность зерна супергибридного риса более чем на 10% выше, чем у инбредного риса. Различные условия окружающей среды приводят к разнице в температуре и радиации, что в конечном итоге влияет на формирование урожайности зерна риса [162].

Более того, ряд исследований показал, что агрономические признаки, такие как число метелок, число колосков на метелку, пустозерность и вес зерна тесно связаны с урожайностью зерна, например, Zhang и др. представили доказательства того, что высокая урожайность зерна гибридного риса была связана с числом колосков на метелку [163]. Huang и др. предположили, что урожайность зерна гибридного риса в значительной степени связана с числом метелок. Ao и др. предположили, что большая продолжительность роста частично отвечает за высокое производство биомассы у гибридного риса, что объясняет высокую урожайность зерна [164]. Кроме того, стабильность урожайности положительно коррелирует с процентом наполнения зерна [165]. Поэтому крайне важно изучить, как региональные изменчивые условия окружающей среды влияют на урожайность гибридных и инбредных сортов риса, а также физиологическую основу гибридных сортов риса, отвечающих за высокую урожайность зерна [166].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

В диссертационной работе использованы сортообразцы риса из коллекции РГП на ПХВ «Института биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, состоящая более 400 образцов, среди них для гибридизации отобраны четыре сорта риса казахстанской селекции – Баканасский, Фатима, Айсауле и Ару. Также в качестве сортов-дифференциаторов были использованы 31 сортообразцов, любезно предоставленные селекционерами из ФГБНУ «Федеральный центр риса» (Краснодар, РФ) на основе Договора о Научно-техническом сотрудничестве от 22 января 2020 года и ФГБНУ «Аграрный научный центр Донской». Была разработана схема скрещивания, где в качестве материнской формы служили отечественные сорта (реципиенты генов устойчивости к пирикуляриозу), а в качестве отцовской формы использовались сортообразцы зарубежной селекции (доноры генов устойчивости к пирикуляриозу).

В селекционной работе также использовались полученные в результате скрещивания 54 гибридных линий. Выращивались данные линий в период 2021-2024 гг.: F_{2-3} Баканасский/7668 *(var. subuzbekistanica Kond.),* F_2 Баканасский/04470 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.),* F_2 Баканасский/7653 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_{2-3} Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 7824/Айсауле *(var. italica Alef.),* F_2 7824/Айсауле *(var. subuzbekistanica Kond.),* F_2 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 7698/ Баканасский *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 7698/ Баканасский *(var. italica Alef.),* F_2 Ару/7701 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/0327 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Айсауле/7679 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 7698/Айсауле *(var. italica Alef.),* F_2 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.),* F_2 Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.),* F_{2-3} Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.),* F_{2-3} Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.),* F_{2-3} Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.),* F_{2-3} Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_{2-3} Баканасский /7667 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.),* F_{2-3} Айсауле/7664 *(var. italica Alef.),* F_{2-3} Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_{2-3} Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_{2-3} Айсауле/04470 *(var. italica Alef.),* F_{2-3} Айсауле/Дон 7712 *(var. sundensis Koern.),* F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.),* F_2 Фатима/7695 *(var. italica Alef.),* F_2 Фатима/7695 *(var. breviaristata Vav.),* F_2 Баканасский/7683 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_2 7698/Ару *(var. erythroceros Koern.),* F_2 7698/Ару *(var. suberythroseros Kan.),* F_{2-3} Баканасский/Дон 7712, F_2 Баканасский/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.),* F_2 Ару/212-05 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Ару/7668 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Айсауле/04468 *(var. italica Alef.),* F_{2-3} Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/7690 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_2 Баканасский/7690 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/04468 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Баканасский/04468 *(var. vulgaris Koern.),* F_{2-3} Ару/7666 *(var. suberythroseros Kan.),* F_2 Фатима/7653 *(var. persica Kan.),* F_{2-3} Фатима/7689 *(var. mutica Vav.),* F_{2-3} Ару/Дон 7712 *(var. erythroceros Koern.),* F_2 Ару/Дон 7712

(var. Desvauxii Koern.), F_2 Ару/Дон 7712 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)* полуостистый, F_2 Ару/7683 *(var. janthoceros Koern.),* F_2 Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.),* F_{2-3} Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*.

Растительные материалы выращивались в три повторности с целью совмещения периода цветения отечественных и зарубежных сортов риса для гибридизации с промежутком 10 дней. Вегетационные опыты по выращиванию риса и гибридизация проведены в РГП на ПХВ «Институт биологии и биотехнологии растений», полевые работы проведены на сортоучастках ТОО Агрофирмы «Бирлик», Балхашского района Алматинской области. Перспективные линии и сорта на устойчивость к пирикуляриозу были испытаны в инфекционном питомнике ВНИИ риса на основе Договора о научном сотрудничестве (г. Краснодар, РФ).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Получение гибридов риса методом традиционной селекции

Гибридизационная программа для получения исходного материала подразумевает посадку образцов риса родительских форм, устойчивых к пирикуляриозу с промежутками по 10 дней между повторностями в целях сопоставления времени цветения. Для скрещивания выбирали наиболее развитые метелки, верхняя часть которых только зацвела. Сам процесс опыления проходит в период цветения риса, который занимает около 14 дней. Посев родительских форм (35 сортообразцов) осуществлялся в периоды - I повторность 24.04.2021, II повторность - 01.05.2021, III повторность - 14.05.2021. В результате проведенных скрещиваний полученные гибридные зерновки также были посажены в три повторности в 2022 году, для дальнейшего опыления сортами-дифференциаторами (таблица 3).

Таблица 3 – Гибридизационная программа для получения F_2 при помощи беккросс скрещивания

Гибриды F_1	Первая повторность	Вторая повторность	Третья повторность
1	2	3	4
♀ Баканасский × ♂ 7668	01.05.2022 г.		
♀ Ару × ♂ Дон 7712	01.05.2022 г.		
♀ Баканасский × ♂ 04470	01.05.2022 г.		
♀ Фатима × ♂ Дон 7712	01.05.2022 г.		
♀ Баканасский × ♂ 7653	01.05.2022 г.		
♀ Баканасский × ♂ 7684	01.05.2022 г.		
♀Ару × ♂ 04888	01.05.2022 г.		
♀ Айсауле × ♂ 04636	01.05.2022 г.		

Продолжение Таблицы 3

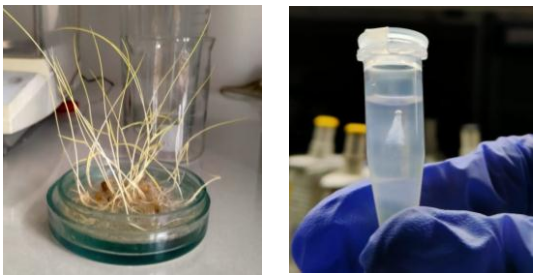
1	2	3	4
♀ 7824 × ♂ Айсауле	01.05.2022 г.		
♀ Ару × ♂ 04468	01.05.2022 г.		
♀ 7698 × ♂ Баканасский	01.05.2022 г.		
♀Ару × ♂ 7701	01.05.2022 г.		
♀ Баканасский × ♂ 0327	01.05.2022 г.		
♀ Айсауле × ♂ 7679	01.05.2022 г.		
♀ 7698 × ♂ Айсауле		08.05.2022 г.	
♀Ару × ♂ 7702		08.05.2022 г.	
♀ Айсауле × ♂ 7689		08.05.2022 г.	
♀ Ару × ♂ 0327		08.05.2022 г.	
♀ Баканасский × ♂ 7667		08.05.2022 г.	
♀ Баканасский × ♂ 7701		08.05.2022 г.	
♀ Айсауле × ♂ 7664		08.05.2022 г.	
♀ Айсауле × ♂ 04470		08.05.2022 г.	
♀ Айсауле × ♂ Дон 7712		08.05.2022 г.	
♀ Фатима × ♂ 7695		08.05.2022 г.	
♀ Айсауле × ♂ 7653		08.05.2022 г.	
♀ Баканасский × ♂ 7683		08.05.2022 г.	
♀ 7698 × ♂ Ару		08.05.2022 г.	
♀ Баканасский × ♂ Дон 7712		08.05.2022 г.	
♀ Ару × ♂ 212-05			12.05.2022 г.
♀Ару × ♂ 7668			12.05.2022 г.
♀ Айсауле × ♂ 04468			12.05.2022 г.
♀ Ару х ♂ 04636			12.05.2022 г.
♀ Баканасский × ♂ 7690			12.05.2022 г.
♀ Баканасский × ♂ 04468			12.05.2022 г.
♀ Ару × ♂ 7666			12.05.2022 г.
♀ Ару × ♂ 7664			12.05.2022 г.
♀ Ару × ♂ 7824			12.05.2022 г.
♀ Фатима × ♂ 7653			12.05.2022 г.
♀ Фатима × ♂ 7689			12.05.2022 г.
♀ Ару × ♂ 7689			12.05.2022 г.
♀Ару × ♂ Дон 7712			12.05.2022 г.
♀ Ару × ♂ 7683			12.05.2022 г.
♀ Баканасский × ♂ 7686			12.05.2022 г.
♀ Айсауле × ♂ 7663			12.05.2022 г.

Гибридизация проводилась в раннее утреннее время, это оптимальное время суток для проведения опыления. Проведены большое количество опыления с целью получить как можно большое количество завязанных зерновок F_1. Степень завязываемости зерновок зависит от разных признаков, таких как вид риса, время опыления, качества пыльцы, разновидность риса и т.д.

2.2.2 Выделение ДНК из этиолированных проростков риса

В ходе исследований для выделения ДНК из анализируемых образцов риса использовали зеленые листья 14-дневных проростков, полученных путем проращивания семян на увлажнённой фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25-27 °С.

ДНК из растительного материала выделяли методом CTAB с внесенными модификациями. В основе метода лежит лизис клеток буфером на основе CTAB (ЦТАБ-цетилтриметиламмонийбромид), депротинизация хлороформом и осаждение ДНК изопропанолом. Навески свежей растительной ткани (проростки) массой 50-120 мг помещали в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл и измельчали. В пластиковые микропробирки добавляли 500 мкл предварительно нагретого до 60°С 2×CTAB-буфера, содержащего 2% CTAB, 1,4 М NaCl, 0,1 М Tris-HCl и 20 мМ ЭДТА. Смесь инкубировали при 65°С в течение 30 минут в водяной бане. После этого к гомогенату добавляли равный объем хлороформа, тщательно перемешивали в течение 20 минут и центрифугировали при 10000 rpm в течение 12 минут. Затем отбирали надосадочную жидкость в новую микропробирку и добавляли 600 мкл изопропанола и осторожно медленно перемешивали до образования видимого осадка и ставили на лед 30 минут. По истечению времени проводилось центрифугирование 5 мин при 10000 оборотах rpm. После осаждения ДНК выливали изопропанол и добавляли 500 мкл 70% спирта для очистки ДНК. Повторяли промывку спиртом два раза. После промывки спирт выливали и микропробирки сушили при комнатной температуре, либо в термоблоке при 37ºС. К осадку добавляли 40 мкл nuclease free water или бидистиллированной воды и 1 мкл RNAse и ставили в термостат на 30 минут при температуре 37ºС, хранили выделенные ДНК при -20 ºС [167].



а б

Рисунок 10 – Выделение ДНК из растительного материала: а – 14дневный проросток; б – изолированная молекула ДНК

2.2.3 Проведение ПЦР анализа на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу

ПЦР-амплификация сортов и линий риса, устойчивых к пирикуляриозу, проводилась с использованием 40-50 нг ДНК в реакционном объеме 15 мкл. Реакционная смесь включала: 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,1 мкМ dNTPs, 25 мМ KCl, 60 мМ Tris-HCl (pH 8,5), 0,1% Тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 1,5 мМ MgCl2 и 1 единицу Taq-полимеразы. А также использовали GoTaq® Green Master – готовый к использованию раствор, содержащий бактериально полученную Taq ДНК-полимеразу, dNTP, MgCl2 и реакционные буферы в оптимальных концентрациях для эффективной амплификации ДНК-матриц методом ПЦР. GoTaq® Green Master Mix (Мэдисон, США) содержит два красителя (синий и желтый), которые позволяют отслеживать ход электрофореза. Реакции, собранные с помощью GoTaq® Green Master Mix, имеют достаточную плотность для прямой загрузки в агарозный гель.

Амплификацию проводили на ДНК-амплификаторе BioRad T100 (США), при этом условия ПЦР были оптимизированы следующим образом: начальная денатурация – 4 минут при температуре 94 °C (1 цикл); далее 35 циклов, включающих денатурацию в течение 30 секунд при 94 °C, отжиг праймеров – 30 секунд при 60 °C (менялся в зависимости от праймера) и синтез – 60 секунд при 72 °C. Завершающий этап синтеза осуществлялся в течение 10 минут при температуре 72 °C (1 цикл). В работе использовали ряд SSR праймеров для идентификации генов устойчивости к пирикуляриозу.

Таблица 4 – Список протестированных SSR праймеров к генам *Pi* комплекса устойчивости к пирикуляриозу

Ген	Локализация на хромосоме	Наименование маркера	Прямой праймер (5′-3′) Обратный праймер (5′-3′)
1	2	3	4
Pi-1	11	Rm 224	F - atcgatcgatcttcacgagg R - tgctataaaaggcattcggg
		Rm144	F - tgccctggcgcaaatttgatcc R - gctagaggagatcagatggtagtgcatg
Pi-2	6	Rm 527	F - ggctcgatctagaaaatccg R - ttgcacaggttgcgatagag
		SSR 140	F - aaggtgtgaaacaagctagcaa R - ttctaggggaggggtgtgaa

Продолжение Таблицы 4

Pi-33	8	Rm 310	F - ccggcgataaaacaatgag R - gcatcggtcctaactaaggg
		Rm 72	F - ccggcgataaaacaatgag R - gcatcggtcctaactaaggg
Pi-ta	12	Rm 310	F - ccggcgataaaacaatgag R - gcatcggtcctaactaaggg
		Rm 72	F - ccggcgataaaacaatgag R - gcatcggtcctaactaaggg
Piz-t	6	Z56592	F - ggacccgcgttttccacgtgtaa R - aggaatctattgctaagcatgac
Pi-54	11	TRS26	F - ggagagccaatctgataagca R - caacaagagaggcaaattctca
Pi-40	6	MSM6	F - tgctgagatagccgagaaatc R - gcacccttttcgctagagg

При ПЦР в качестве положительных контролей, являющихся носителями генов устойчивости, были использованы следующие генотипы: C101-Lac (+) по генам *Pi-1, Pi-33,* C101-A51 (+) по гену *Pi-2* и IR 36 (+) по гену *Pi-ta*. В качестве отрицательного контроля по всем изучаемым генам использовался сорт Флагман (-).

Гель электрофорез. Разделение продуктов амплификации с микросателлитными праймерами проводили путем электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и в 1,5% агарозном геле на основе 1×Трис-боратного буфера (TBE) в камере для вертикального электрофореза (Helicon, Россия) и в камере горизонтального электрофореза BioRad HU13 (Калифорния, США). В работе использовали ДНК маркер компании Синтол 100 bp, а также маркер на 1 kb от Thermo Scientific GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Вильнюс, Литва). Для визуализации гелей использовали систему гель-документирования Gel Doc XR+ от BioRad (Франция).

2.2.4 Скрининг гибридов риса на устойчивость к пирикуляриозу в инфекционном питомнике

Оценка устойчивости гибридных линий риса к популяции возбудителя пирикуляриоза *Magnaporthe oryzae* проводилась в условиях искусственного инфекционного питомника ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» согласно методическим указаниям во время зарубежной стажировки в период 10.04-02.06. 2024 года на основании Договора о Сотрудничестве от 10 мая 2023 года.

2.2.5 Использование методов культуры пыльников в in vitro для стабилизации хозяйственно-ценных признаков у F_2 поколения

Донорные растения выращивали в условиях оранжереи до периода сбора метелок (с 20 июля по 28 августа 2024 года). В фазе трубкования срезали стебли с метелками и подвергали холодовой обработке при температуре +4 ^{0}C в течение 5-7 суток. Перед введением в культуру *in vitro* пыльники в течение 6-7 дней подвергали холодовой предобработке при низких положительных температура 5-7°C. Для индукции каллусогенеза пыльники культивировали на модифицированной питательной среде N6. Для регенерации растений, каллусные агрегаты размером 3-4 мм пассировали на модифицированную среду МС-Р Для индукции ризогенеза, регенеранты переносили на питательную среду, содержащую из половинного набора микро- и макроэлементов среды MS, Fe-хелата. дополненную 1 мг/л ИУК и 30 г/л сахарозы (таблица 5). Растения-регенеранты с хорошо развитой корневой системой после адаптации к условиям *in vivo* выращивали в вегетационных сосудах с почвенно-торфяной смесью в условиях оранжереи при температуре 28ºС.

Таблица 5 – Состав питательных сред, используемых для каллусогенеза регенерации растений в культуре пыльников риса

Среда	Состав
Среда для индукции каллусогенеза	
N6-Д	N6 + 9 г/л мальтозы, 7 г/л агара, 20 мг/л гистидина, 200 мг/л глутамина, 2 мг/л 2,4-Д
N6-Б	N6 + 9 г/л мальтозы, 7 г/л агара, 20 мг/л гистидина, 200 мг/л глутамина, 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК,
Среда для регенерации	
МС-Р	МС + 5 мг/ БАП, 1 мг/л ИУК, 500 мг/л глутамина, 500 мг/л гидролизата казеина.
Среда для индукции ризогенеза	
МС-ИР	МС ½ + 1 мг/л ИУК, 30 г/л сахарозы.

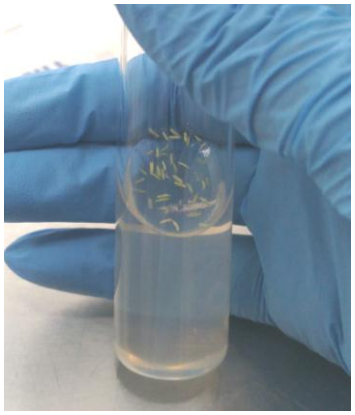


Рисунок 11 – Пыльники, посаженные в питательную среду

2.2.6 Статистический анализ элементов структуры урожая у перспективных гибридов риса у F_2-F_3 поколения

Анализ структурных элементов урожайности гибридных линий риса и оценку продуктивности гибридных линий в сравнении со стандартным районированным сортом Баканасский проводилась по биометрическим показателям элементов структуры урожайности (кустистость, высота растения, длина и ширина флагового листа, масса семян с растения, г, число зерен с главной метелки, шт., масса семян с главной метелки, г, масса 1000 семян, г и т.д.) [168]. Для сравнения средних значений групп данных был проведен дисперсионный анализ (однофакторный ANOVA). Обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2021 с использованием пакета анализа данных, а также использовался метод boxplot.

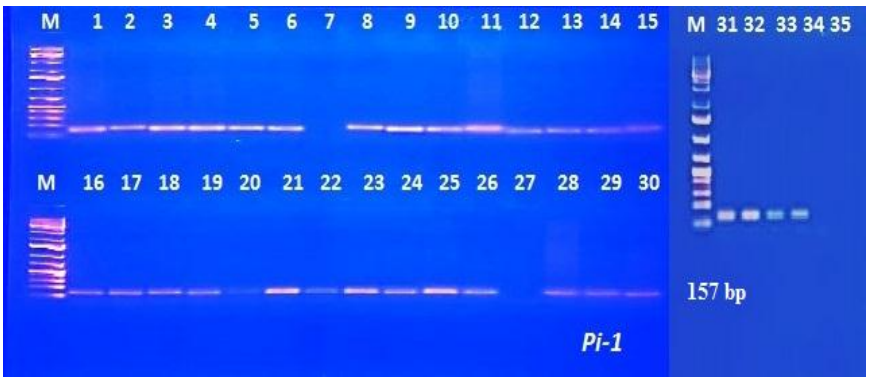
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Скрининг исходных сортообразцов риса отечественной и зарубежной селекции на наличие генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* на основе молекулярно-генетического подхода с использованием генов *Pi* комплекса

Микросателлитные маркеры считаются оптимальной маркерной системой для идентификации генотипов и паспортизации сортов, проведения QTL-анализа (анализа локусов количественных признаков), картирования и клонирования генов, скрининга крупных инсерционных библиотек, а также для реализации маркер-ассистированной селекции риса. Основное преимущество применения MAS в селекции риса заключается прежде всего в сокращении затрат на проведение длительных полевых испытаний, которые обычно продолжаются от 8 до 15 лет, а также на лабораторные анализы при скрининге фенотипических проявлений хозяйственно-ценных признаков. Кроме того, снижаются расходы на оценку устойчивости к стрессовым факторам и качества получаемой продукции, которые, как правило, могут быть достоверно определены лишь после наступления репродуктивной стадии. Около 100000 микросателлитных маркеров были локализованы на генетической карте риса на сайте www.gramene.org.

Главной стратегией получения ценного генетического материала риса с длительной и стабильной устойчивостью к пирикуляриозу в Республике Казахстан является объединение нескольких эффективных для рисосеющих регионов республики генов устойчивости (*Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-40, Piz-t* и *Pi-54*) в высокопродуктивные районированные сорта риса [169]. С этой целью проведен скрининг 35 сортообразцов риса отечественной и зарубежной селекции на наличие генов резистентности к пирикуляриозу с использованием шести SSR маркеров. В результате исследования выявлен генетический полиморфизм исследуемых сортообразцов с использованием молекулярных маркеров RM224, MSM1, Pita, MSM6, Z56592 и TRS26, ассоциированных с генами устойчивости к пирикуляриозу *Pi-1, Pi-2, Pi-ta, Pi-40, Piz-t* и *Pi-54,* соответственно.

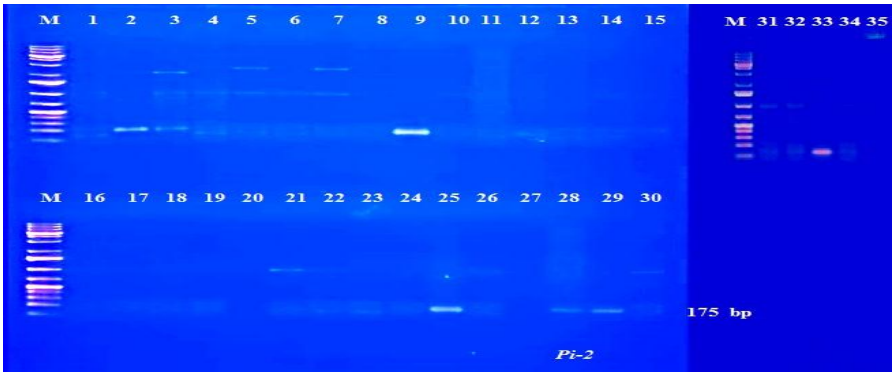
Электрофорез ПЦР продуктов, представленный на рисунке 12 показал, что при применении SSR маркера RM224 локализованного на 11 хромосоме из 35 исследуемых образцов 3 образца не содержат ампликон размером 157 bp, соответствующий гену *Pi-1*. Частота встречаемости гена *Pi-1* в исследуемых сортообразцах составляет 91,4% (таблица 6).



M – 1kb маркер, 1 – 04636 – положительный контроль, 2 – 19-14, 3 – 57-14, 4 – 03-27, 5 – 04468, 6 – 04470, 7 – 04469, 8 – 95-06, 9 – 25-14, 10 – 04888, 11 – 212-05, 12 – 7653, 13 – 7662, 14 – 7663, 15 – 7664, 16 – 7666, 17 – 7667, 18 – 7668, 19 – 7679, 20 – 7683, 21 – 7684, 22 – 7686, 23 – 7689, 24 – 7690, 25 – 7695, 26 – 7698, 27 – 7701 – отрицательный контроль, 28 – 7702, 29 – 7712, 30 – 7824, 31 – Дон 7712, 32 – Баканасский, 33 – Фатима, 34 – Айсауле, 35 – Ару

Рисунок 12 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в сортообразцах риса с использованием SSR маркера RM224, тесно сцепленного с геном *Pi-1* в (157 bp)

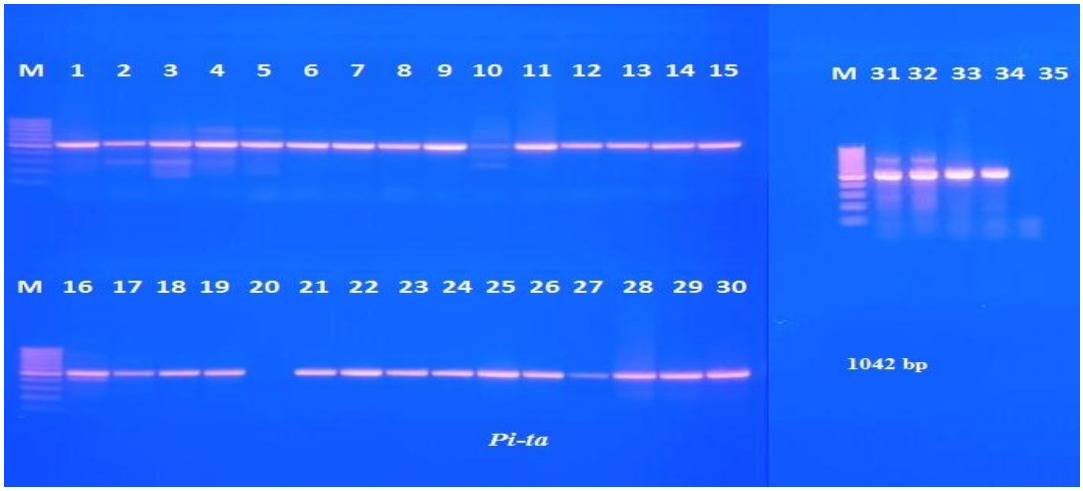
На электрофореграмме рисунка 13 видно, что специфичный ПЦР продукт размером 175 bp при применении SSR маркера MSM1, локализованного на 6 хромосоме, ассоциированного с геном устойчивости к пирикуляриозу *Pi-2*, наблюдается лишь у некоторых анализируемых сортообразцов отсутствие ампликона у большинства исследуемых сортообразцов (рисунок 16). Например, №№ 2, 3, 9, 25, 28. 29, 33. Частота встречаемости данного гена низкая, только у 7 сортообразцов – 14,28% (таблица 6).



M – 1kb маркер, 1 – 04636, 2 – 19-14, 3 – 57-14, 4 – 03-27, 5 – 04468, 6 – 04470, 7 – 04469, 8 – 95-06, 9 – 25-14 – положительный контроль, 10 – 04888, 11 – 212-05, 12 – 7653, 13 – 7662, 14 – 7663, 15 – 7664, 16 – 7666, 17 – 7667, 18 – 7668, 19 – 7679, 20 – 7683, 21 – 7684, 22 – 7686, 23 – 7689, 24 – 7690, 25 – 7695, 26 – 7698, 27 – 7701 – отрицательный контроль, 28 – 7702, 29 – 7712, 30 – 7824, 31 – Дон 7712, 32 – Баканасский, 33 – Фатима, 34 – Айсауле, 35 – Ару

Рисунок 13 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в сортообразцах риса с использованием SSR маркера MSM1, сцепленного с геном *Pi-2* (175 bp)

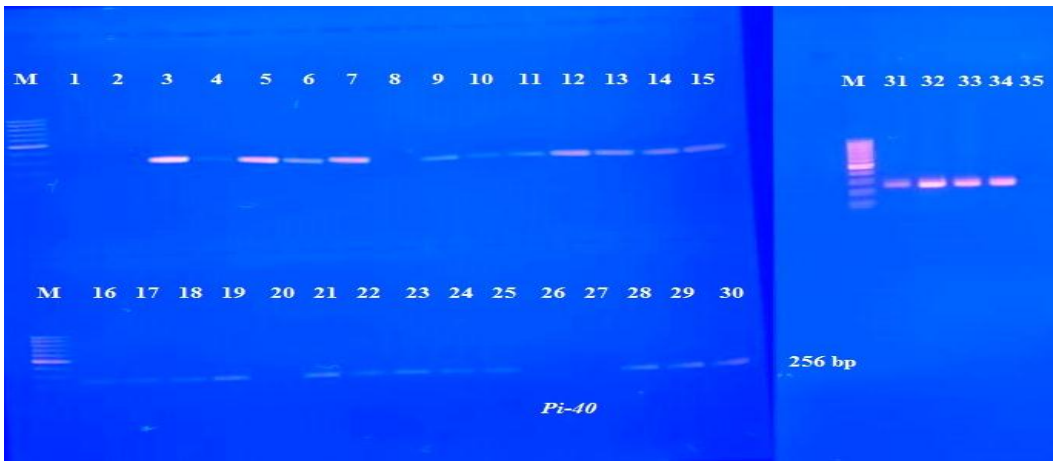
SSR-маркер Pita ассоциирован с геном устойчивости *Pi-ta*, обеспечивающим защиту риса от возбудителя пирикуляриоза *Magnaporthe oryzae*. Ген *Pi-ta* кодирует белок класса NBS-LRR, распознающий авирулентный ген AVR-Pita у патогена, что инициирует реакцию гиперчувствительности и локализует инфекцию. Маркер Pita позволяет эффективно отбирать линии, несущие устойчивость, особенно на ранних этапах селекционного процесса. В случае использования SSR маркера Pita на 12 хромосоме, связанного с геном устойчивости *Pi-ta*, ампликон размером 500 bp (рис. 14) имеется у многих генотипов (94,29%) и отсутствует только у 2 сортообразцов (таблица 6).



M – 100 bp маркер, 1 – 04636 – положительный контроль, 2 – 19-14, 3 – 57-14, 4 – 03-27, 5 – 04468, 6 – 04470, 7 – 04469, 8 – 95-06, 9 – 25-14, 10 – 04888, 11 – 212-05, 12 – 7653, 13 – 7662, 14 – 7663, 15 – 7664, 16 – 7666, 17 – 7667, 18 – 7668, 19 – 7679, 20 – 7683 – отрицательный контроль, 21 – 7684, 22 – 7686, 23 – 7689, 24 – 7690, 25 – 7695, 26 – 7698, 27 – 7701, 28 – 7702, 29 – 7712, 30 – 7824, 31 – Дон 7712, 32 – Баканасский, 33 – Фатима, 34 – Айсауле, 35 – Ару

Рисунок 14 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в сортообразцах риса с использованием SSR маркера Pita, сцепленного с геном *Pi-ta* (500 bp)

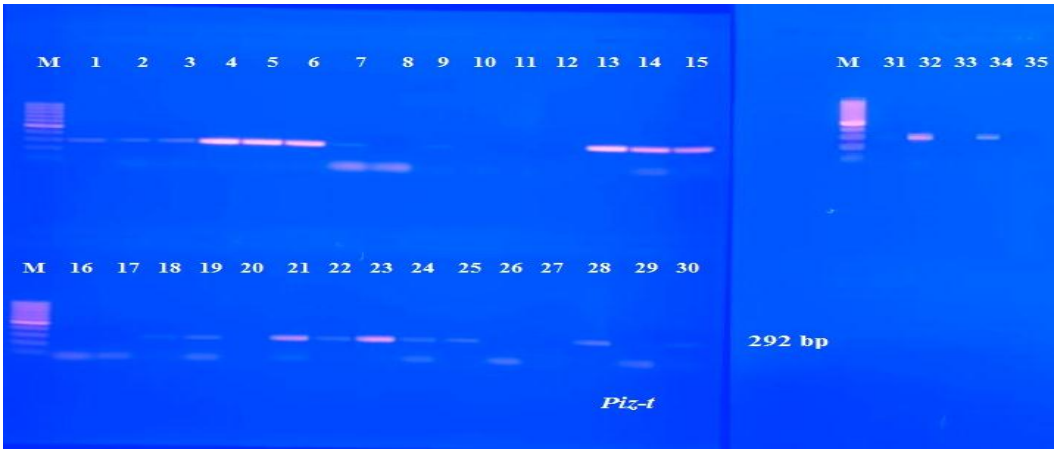
Использование молекулярного маркера MSM6, расположенного на 6 хромосоме, позволил визуализировать наличие гена *Pi-40*, контролирующего устойчивость к грибному патогену, по ПЦР продукту размером 256 bp (рис. 15), частота встречаемости гена – 80,0%.



M – 100 bp маркер, 1 – 04636, 2 – 19-14, 3 – 57-14 – положительный контроль, 4 – 03-27, 5 – 04468, 6 – 04470, 7 – 04469, 8 – 95-06, 9 – 25-14, 10 – 04888, 11 – 212-05, 12 – 7653, 13 – 7662, 14 – 7663, 15 – 7664, 16 – 7666, 17 – 7667, 18 – 7668, 19 – 7679, 20 – 7683, 21 – 7684, 22 – 7686, 23 – 7689, 24 – 7690, 25 – 7695, 26 – 7698, 27 – 7701 – отрицательный контроль, 28 – 7702, 29 – 7712, 30 – 7824, 31 – Дон 7712, 32 – Баканасский, 33 – Фатима, 34 – Айсауле, 35 – Ару

Рисунок 15 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в сортообразцах риса с использованием SSR маркера MSM6, тесно сцепленного с геном *Pi-40* (256 bp)

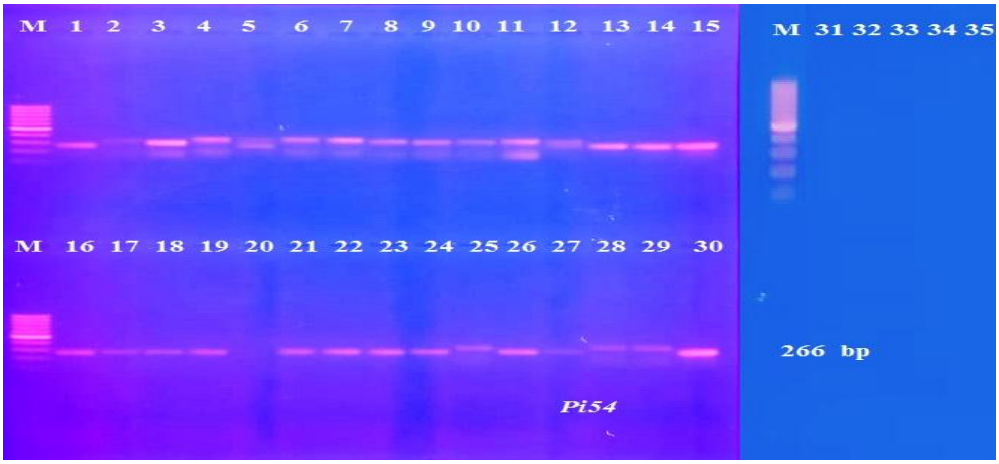
Ген *Piz-t* выявлен при использовании SSR маркера Z56592, локализованного на 6 хромосоме, по наличию ампликона размером 292 bp (рис. 16), частота встречаемости гена – 62,86% (таблица 6).



M – 100 bp маркер, 1 – 04636, 2 – 19-14, 3 – 57-14, 4 – 03-27 – положительный контроль, 5 – 04468, 6 – 04470, 7 – 04469, 8 – 95-06, 9 – 25-14, 10 – 04888, 11 – 212-05, 12 – 7653, 13 – 7662, 14 – 7663, 15 – 7664, 16 – 7666, 17 – 7667, 18 – 7668, 19 – 7679, 20 – 7683, 21 – 7684, 22 – 7686, 23 – 7689, 24 – 7690, 25 – 7695, 26 – 7698, 27 – 7701– отрицательный контроль, 28 – 7702, 29 – 7712, 30 – 7824, 31 – Дон 7712, 32 – Баканасский, 33 – Фатима, 34 – Айсауле, 35 – Ару

Рисунок 16 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в сортообразцах риса с использованием SSR маркера Z56592, тесно сцепленного с геном *Piz-t* (292 bp)

Молекулярный маркер TRS26 расположенный на 11 хромосоме и связанный с геном устойчивости *Pi-54* (рис. 17) определен по наличию ампликона размером 266, частота встречаемости гена – 82,86% (таблица 6). В исследуемых казахстанских сортах данный ген отсутствует.



M – 100 bp маркер, 1 – 04636 – положительный контроль, 2 – 19-14, 3 – 57-14, 4 – 03-27, 5 – 04468, 6 – 04470, 7 – 04469, 8 – 95-06, 9 – 25-14, 10 – 04888, 11 – 212-05, 12 – 7653, 13 – 7662, 14 – 7663, 15 – 7664, 16 – 7666, 17 – 7667, 18 – 7668, 19 – 7679, 20 – 7683 – отрицательный контроль, 21 – 7684, 22 – 7686, 23 – 7689, 24 – 7690, 25 – 7695, 26 – 7698, 27 – 7701, 28 – 7702, 29 – 7712, 30 – 7824, 31 – Дон 7712, 32 – Баканасский, 33 – Фатима, 34 – Айсауле, 35 – Ару

Рисунок 17 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в сортообразцах риса с использованием SSR маркера TRS26, тесно сцепленного с геном *Pi-54* (266 bp)

В результате проведенного ПЦР анализа выведены образцы, содержащие от одного до пяти генов устойчивости. Такой генетический материал может быть эффективно использован в программе гибридизации по созданию устойчивых гибридов и в дальнейшем сортов (таблица 6).

Таблица 6 – Молекулярный скрининг сортообразцов риса зарубежной и отечественной селекции из коллекции риса ИББР на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу с использованием SSR маркеров

Номер каталога	Название образца	Гены						Примечание
		Pi-1	*Pi-2*	*Pi-ta*	*Pi-40*	*Piz-t*	*Pi-54*	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
04636	Линия, ВНИИ риса	1	0	1	0	1	1	(Pi-1+ta+z-t+54)
19-14	IRBL1-La, IRRI Филиппины	1	1	1	0	1	1	(Pi-1+ta+z-t+54)

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9
57-14	IRBL1-C, IRRI Филиппины	1	1	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
03-27	Maratelli	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
04468	Maratelli, Франция	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
04470	Maratelli, Франция	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
04469	Zenit, Франция	0	0	1	1	1	1	(Pi-ta+40+z-t+54)
95-06	IR 64, IRRI Филиппины	1	0	1	0	0	1	(Pi-1+ta+54)
25-14	IRBL IR64, IRRI Филиппины	1	1	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
04888	Магнат, ВНИИЗК, Ростов	1	0	1	1	0	1	(Pi-1+ta+40+54)
212-05	Heibar BC 454	1	0	1	1	0	1	(Pi-1+ta+40+54)
7653	ИЛ Боярин	1	0	1	1	0	1	(Pi-1+ta+40+54)
7662	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7663	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7664	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7666	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	0	1	(Pi-1+ta+40+54)
7667	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	0	1	(Pi-1+ta+40+54)
7668	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7679	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7683	ИЛ Кубояр	1	0	0	0	0	0	(Pi-1)
7684	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7686	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7689	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7690	ИЛ Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7695	ИЛ Кубояр	1	1	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7698	ИЛ Магнат	1	0	1	0	0	1	(Pi-1+ta+54)
7701	ИЛ Кубояр	0	0	1	0	0	1	(Pi-ta+54)
7702	ИЛ Кубояр	1	1	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
7712	Д7506 (Кубояр)	1	1	1	1	0	1	(Pi-1+ta+40+54)
7824	Ил-14 Кубояр	1	0	1	1	1	1	(Pi-1+ta+40+z-t+54)
Дон 7712	Дон 7712 (Кубояр)	1	0	1	1	0	0	(Pi-1+ta+40)
Сорта риса РК	Баканасский	1	0	1	1	1	0	(Pi-1+ta+40+z-t)
	Фатима	1	1	1	1	0	0	(Pi-1+ta+40)
	Айсауле	1	0	1	1	1	0	(Pi-1+ta+40+z-t)
	Ару	0	0	0	0	0	0	0

Согласно стратегии повышения устойчивости риса, желательно присутствие в сортах не одного гена, а 3 и более генов, чтобы обеспечить стабильную и долговременную устойчивость сортов к изменяющимся расам гриба *Magnaporthe oryzae*. Например, в России созданы с помощью маркерной селекции сорта риса, несущие гены устойчивости к пирикуляриозу: Пентаген с пя-

тью генами устойчивости к пирикуляриозу, Магнат, Пируэт, Аргамак, Капитан и др. [170,171].

Оценено присутствие (1) и отсутствие (0) генов *Pi-1 Pi-ta, Pi-2, Pi-40, Piz-t и Pi-54* в исследуемых сортообразцах (таблица 2) путем визуализации ампликонов размером 157 bp, 500 bp, 175 bp, 256 bp, 292 bp и 266 bp, соответственно. Показано наличие генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* в интрогрессивных линиях и сортах зарубежной и отечественной селекции из коллекции риса ИББР. Большинство сортообразцов зарубежной селекции содержат от 1 до 5 генов резистентности к пирикуляриозу, но отечественные сорта риса либо имеют целевые гены в генотипе, либо они отсутствуют, как у сорта Ару.

В результате проведенной работы выделены сорта и линий риса, содержащие несколько генов устойчивости к патогену. Они будут использованы в качестве доноров генов-интереса для повышения устойчивости отечественных сортов риса к *M. oryzae*.

Таким образом, проведен скрининг сортообразцов риса отечественной и зарубежной селекции на наличие генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* на основе молекулярно-генетического подхода (молекулярное маркирование) для использования их в качестве доноров. Отобраны сортообразцы риса с генами, контролирующими устойчивость к *Magnaporthe oryzae*, из рабочей коллекции риса ИББР для гибридизации отечественных сортов риса с донорами генов *Pi-1 Pi-ta, Pi-2, Pi-40, Piz-t и Pi-54*, и выведения устойчивых к пирикуляриозу линий риса.

3.2 Интрогрессия генов устойчивости *Pi* комплекса к пирикуляриозу в казахстанские сорта риса

В 2021 году на основе Договора о научно-техническом сотрудничестве из Федерального Научного Центра риса (г. Краснодар, РФ) было получено 11 образцов риса несущие в своем генотипе различные гены устойчивости к пирикуляриозу и из «Аграрного научного центра Донской» (Ростов на Дону) еще дополнительно получено 20 образцов риса устойчивых к пирикуляриозу (таблица 7). Интрогрессированные линий являются важной и необходимой при подборе доноров, как с одиночными, так и с комбинацией генов *Pi* в программах по созданию резистентных сортов риса [76].

Таблица 7 – Сорта устойчивые к пирикуляриозу, предоставленные ФГБНУ «Федеральный Научный центр риса» (Краснодар) и ФГБНУ «Аграрный научный центр Донской» Зерноград (Ростов на Дону), 2021 г.

Номер каталога, название	Источники генов	Генбанк
1	2	3
04636, Линия, ВНИИ риса	*Pi 1+ Pi-33*	ФНЦ риса
19-14, IRBL1-La, IRRI Филиппины	*Pi-1*	

Продолжение Таблицы 7

1	2	3
57-14, IRBL1-C, IRRI Филиппины	*Pi-1*	
03-27, Maratelli	*Pi-2*	
04468, Maratelli, Франция	*Pi-2*	
04470, Maratelli, Франция	*Pi-2*	
04469, Zenit, Франция	*Pi-2+Pi-z, Pi-zt*	
95-06, IR 64, IRRI Филиппины	*Pi-31t, Pi-30t, Pi-33*	
25-14, IRBL ta2-IR64, IRRI Филиппины	*Pi-33+ Pi-ta2*	
04888, Магнат, ВНИИЗК, Ростов	*Pi-1+Pi-2*	
212-05, Heibar BC 454	окрашенный перикарп	
Колл. обр. 7653	*Pi1+2+33* × Боярин	АНЦ Донской
7662	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7663	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7664	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7666	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7667	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7668	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7679	*Pi1+2+33+ta+b* × Кубояр	
7683	*Pi1+2+33+ta+b* × Кубояр	
7684	*Pi1+2+33+ta+b* × Кубояр	
7686	*Pi1+2+33+ta+b* × Кубояр	
7689	*Pi1+2+33+ta+b* × Кубояр	
7690	*Pi1+2+33+ta+b* × Кубояр	
7695	*Pi40-1-1-1-5-B* ×Кубояр	
7698	*Pi40-1-1-1-5-B* × Магнат	
7701	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7702	*Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр	
7712	Д7506 *(Pi1+2+33+b+ta* × Кубояр)	
7824	Ил-14 *(Pi1+2+33)* × Кубояр	
Дон 7712	Дон 7712 *(Pi40* × Кубояр*)*	

Данные сорта-дифференциаторы являются источниками генов *Pi*-комплекса, которые помогут улучшить отечественные высокопродуктивные сорта и дадут возможность получить гибридные линий устойчивые к пирикуляриозу. Встречаются гены расоспецифичные, так и гены широкого спектра действия. Последние могут обеспечить устойчивость ко многим изолятам одновременно, тем самым обеспечивая эффективность их использования.

В качестве одного из родительских пар использовали районированные казахстанские сорта риса (Ару, Баканасский, Айсауле, Фатима), так как они отличаются по следующим критериям: определенные фаза развития риса и этапы прохождения органогенеза, соответствуют почвенно-климатическим условиям рисосеющих регионов Казахстана, они урожайны и отличаются повышенным

качеством крупы, обладают устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам, имеют отзывчивость на элементы агротехники возделывания.

Сорт риса Ару создан в КазНИИ риса имени И. Жахаева, количества зерновок в метелке составляет 90-100 шт., масса 1000 зерен – 30-32 г, выход крупы 67-68%, выход целого ядра 80-83,6%, потенциальная урожайность 55-60 ц. Сорт «Ару» характеризуется коротким вегетационным периодом – от 90 до 95 дней. Обладает высокой устойчивостью к низким температурам и способен переносить заморозки. С 2006 года включён в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Кызылординской области. Сорт риса «Ару» районирован в 2007 году и относится к числу наиболее раннеспелых и маловодопотребляющих сортов. Продолжительность его вегетационного периода составляет 95-100 дней, что на 12-15 дней короче по сравнению со стандартным сортом «Маржан». За счёт более короткого периода вегетации и высокой водоэкономичности сорт потребляет на 25-35% меньше поливной воды, что обеспечивает получение стабильного урожая даже при неблагоприятных погодных условиях и поздних сроках посева. Сорт характеризуется устойчивостью к полеганию, осыпанию, холоду, а также обладает повышенной толерантностью к засолению почв. Отличается быстрым и энергичным ростом на ранних этапах развития при полном затоплении. В условиях конкурсного сортоиспытания урожайность сорта достигала 6,8-7,2 т/га. «Ару» проявляет высокую отзывчивость на агротехнический уход, особенно на внесение азотных удобрений в фазу начала и завершения кущения. Плёнчатость – 18-19,5%. При качественной и своевременной уборке сорт демонстрирует технологические показатели, сопоставимые с сортом «Маржан»: средняя стекловидность за три года – 78%, трещиноватость – 9%, общий выход крупы – 67,5%, содержание целого ядра – 83,6%. Содержание белка в крупе может достигать 10-11%. Сорт «Ару» рекомендован к возделыванию во всех рисосеющих регионах Казахстана, в особенности в северных районах Кызылординской и Алматинской областей, а также в зонах с резко континентальным климатом и ограниченными водными ресурсами [172].

Сорт риса Баканасский (разновидность *vulgaris*) создан в ИФГБР совместно с агрофирмой ТОО «Бірлік», индивидуальным отбором из местной сортовой популяции риса Дубовский с последующим пересевом и многократным отбором на селективных агрофонах. Форма куста компактная, листья темно-зеленые широколистного типа, опущение в период кущения отсутствует, восковой налет слабо выражен; стебель утолщенный, соломина прочная, окраска стеблевых узлов зеленая; ушки серповидные бесцветные; метелка полуразвесистая остистая светло-желтая длиной 18-20 см средней плотности с числом веточек первого порядка 6-7; ости присутствуют по всей длине метелки, светло-желтые; зерно крупное длиной 8.0 мм, шириной 4.0 мм и толщиной 2.5 мм, с соотношением длины/ширина 2/1, форма зерна округлая, цвет светло-желтый; зерно-шала крупное, цвет светло-желтый; сорт характеризуется высоким каче-

ством и выходом крупы. Сорт обладает следующими характеристиками: период вегетации 100-105 дней, высота растений 105 см, выход крупы 73,6%, урожайность 52,3 ц/га, число зерен в метелке 125 шт., масса 1000 зерен 32,6 г, стекловидность 73,6 % [173].

Сорт риса Айсауле устойчив к засолению почв, к пониженным температурам в фазе всходов. Отличается высокими темпами начального роста. Сорт риса «Айсауле» выведен методом индивидуального отбора. Относится к разновидности *italica* Alef., растение средней высоты (85-95 см), с компактной, средней длины метёлкой (14-17 см), содержащей 110-140 колосков; зерновка белая, продолговато-удлинённая, стекловидная, безостая, с минимальным мучнистым пятном (10-12%). Сорт крупяного направления, отличается хорошим цветом и вкусом каши, характеризуется высокими технологическими показателями: масса 1000 зёрен – 32,4 г, содержание белка – 7,9%, плёнчатость – 12%, стекловидность – 85%, выход крупы – 79%, органолептическая оценка готовой каши – 4 балла. В условиях Кызылординской области (испытания в Жанакорганском, Шиелийском, Жалагашском и Казалинском ГСУ) сорт показал среднюю урожайность 45,1 ц/га, с наибольшим показателем 54,1 ц/га в 2015 году на Жалагашском участке. Обладает устойчивостью к полеганию и осыпанию (4,4 балла), а также высокой толерантностью к заболеваниям и вредителям. Разработан в КазНИИ «Казахский научно-исследовательский институт рисоводства им. И. Жахаева» [174].

Сорт риса Фатима (*subspecies indica Kato., var. gilanica Gust*) получен из сортообразца Дигалоид (ДГ) Ко 293 IRRI мутант методом гаплоидной биотехнологии с последующим индивидуальным отбором. Вегетационный период 115-118 сут., высота растений 96-100 см, длина метелки 19-22 см, количество колосков на метелке 114-115 шт., масса 1000 зерен 25-26 г., общий выход крупы 65-68%, содержание амилозы 27%. Данный сорт получен методом гаплоидной биотехнологии с последующим индивидуальным отбором из сортообразца Дигалоид (ДГ) Ко 293 IRRI-мутант. Растение имеет стебель средней толщины, гибкий, устойчивый к полеганию; листья зелёные, средней ширины, длинные с изогнутой пластинкой; метёлка наклонная, среднеразвесистая; зерновка тонкая, длинная. В условиях Алматинской области (Балхашский ГСУ) показал среднюю урожайность 31-32,9 ц/га в зависимости от предшественника, что превышает стандарт на 7,3-9,6%. В Кызылординской области (Жалагашский, Шиелийский, Казалинский, Жанакорганский ГСУ) средняя урожайность составила 49,4 ц/га, что на 2,8 ц/га (6%) выше стандарта. Сорт характеризуется устойчивостью к полеганию и осыпанию (4,7 балла), а также высокой устойчивостью к болезням и вредителям (5 баллов). Содержание белка – 6,3%, плёнчатость – 21%, стекловидность – 93,6%, выход крупы – 77,2%, органолептические показатели: цвет каши – 4,5 балла, вкус – 3,8 балла, коэффициент развариваемости – 4,6. Оригинаторы: РГП на ПХВ «ИББР» КН МНВО РК (55% соавторство) «Ка-

захский научно-исследовательский институт рисоводства им. И. Жахаева» (45% соавторство) [175].

Искусственная гибридизация растений происходит в три этапа: подготовка материнской метелки (обрезание цветковых чешуи); кастрация; опыление пыльцой. Схема скрещивания приведена снизу, где можно заметить изолятор (рис. 18).

Искусственное опыление заключается в пересадке пыльцы с мужского растения на женское. В этом случае используют одиночные изоляторы. Чешуя при подготовке материнского колоса к кастрации подрезается (рис. 19 а). Колос родительской формы, который вот-вот должен зацвести или у него уже раскрылись один или два цветка, срезают, подрезают чешую (при этом удаляют и ости) и, согревая в руках, ожидают, когда начнется цветение. Тогда раскрывают верхнюю часть изолятора, не снимая его из колоса, вводят колос, который зацвел, и вращают над колосом материнской формы так, чтобы осыпать его пыльцой (рис.19 б, в). Затем колос мужской формы вынимают (либо можно оставить сверху изолятора), углы изолятора загинают, чтобы закрыть отверстие, и скрепляют канцелярской скрепкой (рис. 19 г). Кастрация проводилась с помощью 3-х канального пневмокастратора, который позволяет эффективно проводить гибридизацию, путем удаления пыльников (рис. 20).

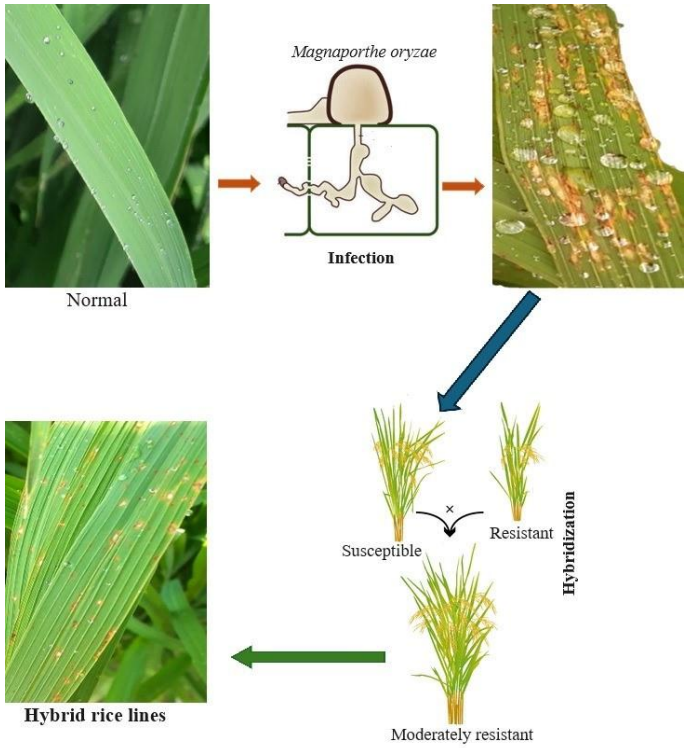


Рисунок 18 – Схема скрещивания сортов с целью получения гибридного поколения [176]



а б в г

Рисунок 19 – Гибридизация растений риса: а – материнская форма (кастрация); б, в – изоляторы с отцовской метелкой внутри; г – опыленные сорта риса



Рисунок 20 – Аппарат для кастрации цветков материнских форм

Для гибридизации сортов риса использовали метод пневмокастрации и «ТВЕЛЛ»-метод опыления [73]. Для этого в вегетационных сосудах выращивали отечественные районированные сорта риса (Баканасский, Айсауле, Фатима, Ару), а также сорта и интрогрессированные линии, имеющие в своем генотипе различные гены устойчивости к пирикуляриозу. Всего использовано 16 генотипов в трех повторностях по дате посева для совмещения цветения (промежуток между повторностями 10-12 дней).

Процесс опыления требует высокой сконцентрированности от специалиста. Процедура проводится в фазе цветения, когда пыльники донорского растения удаляются вручную до момента их раскрытия, чтобы исключить самоопыление. После этого на рыльце пестика наносятся пыльцевые зёрна выбранного родительского сорта. Процесс требует точности и стерильных условий, нередко с использованием специальных инструментов и защитных мешочков на соцветиях, предотвращающих нежелательное опыление.

Питомник вышеуказанных родительских форм для гибридизации выращивали в вегетационных сосудах в три срока (разница по 10 дней) для совмещения времени выметывания и цветения в оранжерейных условиях ИББР. Для

скрещивания выбирали наиболее развитые метелки, верхняя часть которых только зацвела. Кастрацию проводили с помощью трехканального пневмокастратора. Опыление проводили через 1-2 сутки после кастрации (таблица 8). Наивысшие показатели завязываемости семян наблюдалось при опылении через 2 суток.

Таблица 8 – Вовлечение в селекционный процесс казахстанских сортов риса с целью интрогрессии генов устойчивости к пирикуляриозу

Комбинация, где материнская/отцовская форма сорт риса	Вид скрещивания	Общее количество кастрированных и опыленных цветков, шт.	Полученные гибридные зерновки, шт.	Средняя завязываемость гибридных зерновок, %
Ару	Прямое/реципрокное	1310	383	31,35
Айсауле	Прямое/реципрокное	1705	362	21,41
Баканасский	Прямое/реципрокное	1223	327	25,59
Фатима	Прямое/реципрокное	815	145	17,44
ИТОГО		5053	1217	23,94

В 2021 году с целью создания исходных линий для получения отечественного сорта риса устойчивого к пирикуляриозу проведены прямые и обратные (реципрокные) скрещивания нескольких комбинаций с участием 4-х сортов риса казахстанской селекции: Ару, Айсауле, Баканасский, Фатима.

Пневмокастрация включает в себя обрезание цветковых чешуй на 1/3 с последующим удалением пыльников с помощью вакуумной установки. Такой способ кастрации позволило минимально повреждать рыльца цветков риса (рисунок 21). После удаления пыльников основание метелки обворачивали ватой, смоченной дистиллированной водой, и помещали во влажный изолятор с целью избегания быстрого высыхания цветковых чешуй и рылец пестика. Метелки опыляли через 3-4 часа после кастрации.

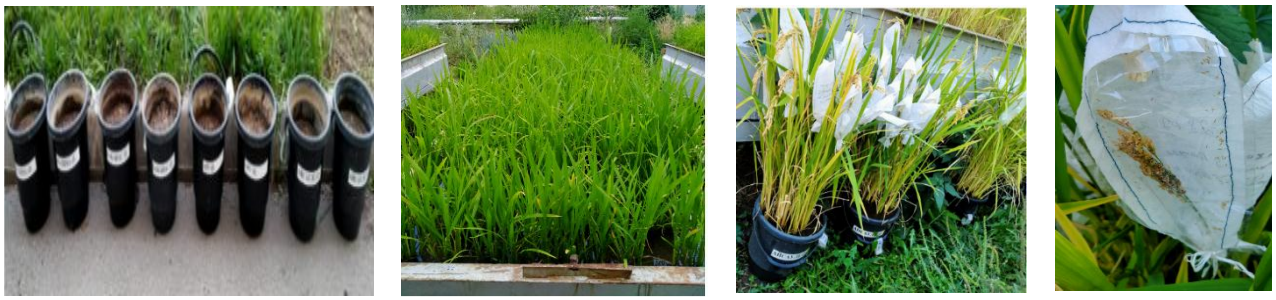


Рисунок 21 – Гибридизация растений с использованием методов пневмокастрации и «ТВЕЛЛ» метода опыления

Наивысшие показатели образования гибридных зерновок наблюдались у сортов риса Ару и Айсауле, завязываемость гибридных зерновок у которых составило 383 и 362 шт. соответственно. Сорт риса Баканасский занимает среднее положение 327 шт. Наименьшее образование гибридных зерновок 145 шт. отмечено у сорта Фатима, который относится к подвиду *indica*. Это еще можно объяснить тем, что дождливая погода и высокая влажность атмосферы способствует максимальному завязыванию гибридных зерновок. В пасмурную погоду рыльце пестика раскрываются полностью и улавливают наибольшее количество пыльцы, что приводит к максимальному завязыванию гибридных зерновок.

Таким образом, в результате гибридизации по созданию перспективных исходных линии риса на устойчивость к пирикуляриозу получено 5053 гибридных зерновок, что достаточно вести полноценные селекционные работы по созданию перспективных линии на устойчивость к пирикуляриозу.

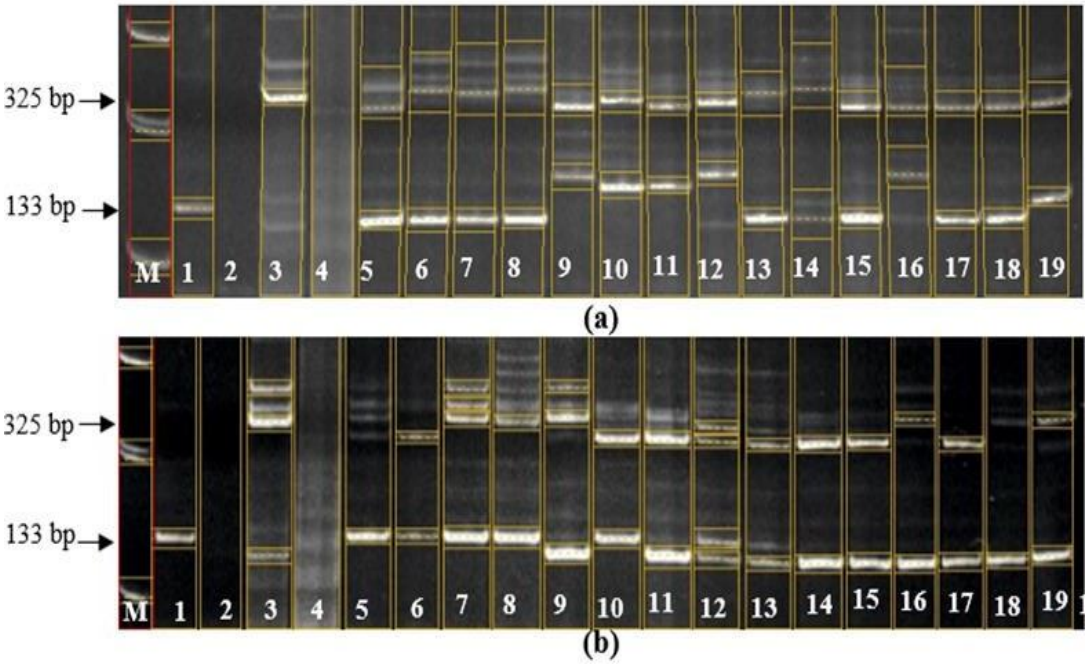
3.2.1 Контроль генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* у интрогрессированных отечественных гибридах и исходных родительских форм

Использование молекулярных маркеров в селекции риса позволяет идентифицировать гены и вводить их в новые линии, полученные путем гибридизации. Созданы гибриды риса, несущие как отдельные гены устойчивости к *Magnaporthe oryzae*, так и гибриды с пирамидированными генами с широким спектром устойчивости к пирикуляриозу. Наибольший эффект от скрещивания удается осуществить в случае совместного действия генов в одном генотипе, что свидетельствует об эффективности стратегии длительной устойчивости риса к пирикуляриозу.

Ген *Pi-1* был идентифицирован в 1992 году [93]. Позднее с использованием RFLP-маркеров установлено, что он локализован в терминальной области 11-й хромосомы риса [177]. Показано, что максимальная устойчивость достигается при сочетании гена *Pi-1* с геном *Pi-2*, расположенным на 6-й хромосоме риса [178]. На электрофореграмме рисунка 22 (a), ген *Pi-1* присутствует в одном 7668 (19 лунка) образце в гомозиготном состоянии. По гену *Pi-2* обнаружены несколько гомозиготных образцов: 03-27 (6 лунка), 04468 (7 лунка), 04470 (8 лунка) и 7662 (14 лунка). На рисунке 22 (b) видно, что образцы 7679 (5 лунка), 7683 (6 лунка), 7684 (7 лунка), 7689 (8 лунка), 7695 (10 лунка) оказались гомозиготами по локусам Rm224 и Rm144, что указывает на наличие доминантного гена устойчивости к пирикуляриозу риса *Pi-1*, поскольку они повторяют ДНК профиль положительного контроля C101-Lac. Гетерозиготными по данному гену являются образцы 7702 (12 лунка) и 7712 (13 лунка). По локусам Rm527 и SSR140 образцы 7684 (7 лунка), 7690 (9 лунка), Баканасский (16 лунка), Айсауле (18 лунка) и Ару (19 лунка) показали идентичное сходство ДНК профиля с сортом дифференциатором C101-A51, что говорит о наличии гена *Pi-2*. Все остальные образцы, взятые на ПЦР анализ, показали в своих ге-

нотипах наличие рецессивных генов устойчивости. Размеры ПЦР-продуктов, соответствующих доминантным генам *Pi-1* и *Pi-2*, составляют 133 п.н. и 325 п.н. соответственно.

Идентификация и скрининг генотипов риса, содержащих *Pi-1* и *Pi-2*, имеют решающее значение для создания устойчивых сортов риса. Эти гены обеспечивают широкий спектр устойчивости к пирикуляриозу риса, и их включение в высокоурожайные сорта риса может способствовать снижению потерь урожая. Селекционеры могут использовать родительские генотипы с этими генами устойчивости для создания новых, более устойчивых к пирикуляриозу сортов риса, которые будут более устойчивы к заболеванию, обеспечивая стабильное и устойчивое снабжение продовольствием [179]. Скрининг на *Pi-1* и *Pi-2* дает полезную генетическую информацию о работе и взаимодействии этих генов устойчивости.



(a): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 3 – C101-A51(контроль «+» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 4 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 5 – 04636, 6 – 03-27, 7 – 04468, 8 – 04470, 9 – 04469, 10 – 25-14, 11 – 04888, 12 – 212-05, 13 – 7653, 14 – 7662, 15 – 7663, 16 – 7664, 17 – 7666, 18 – 7667, 19 – 7668

(b): M – молекулярный маркер 100bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 2 – Флагман (контроль «-» для гена Pi-1 в локусах Rm144 и RM224), 3 – C101-A51(контроль «+» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 4 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 5 – 7679, 6 – 7683, 7 – 7684, 8 – 7689, 9 – 7690, 10 – 7695, 11 – 7701, 12 – 7702, 13 – 7712, 14 – 7824, 15 – Дон 7712, 16 – Баканасский, 17 – Фатима, 18 – Айсауле, 19 – Ару

Рисунок 22 – Электрофореграмма ПЦР анализа сортообразцов на присутствие генов *Pi-1* и *Pi-2*

Понимание этих генетических особенностей критически важно для расширения наших знаний о взаимодействии растений с патогенами. Процедура скрининга в сочетании с генетическими маркерами, связанными с этими генами, позволяет использовать MAS – мощный инструмент селекции. MAS ускоряет процесс селекции, позволяя селекционерам более эффективно выбирать устойчивые генотипы, экономя время и ресурсы, затрачиваемые на выращивание и тестирование большого количества растений в полевых условиях.

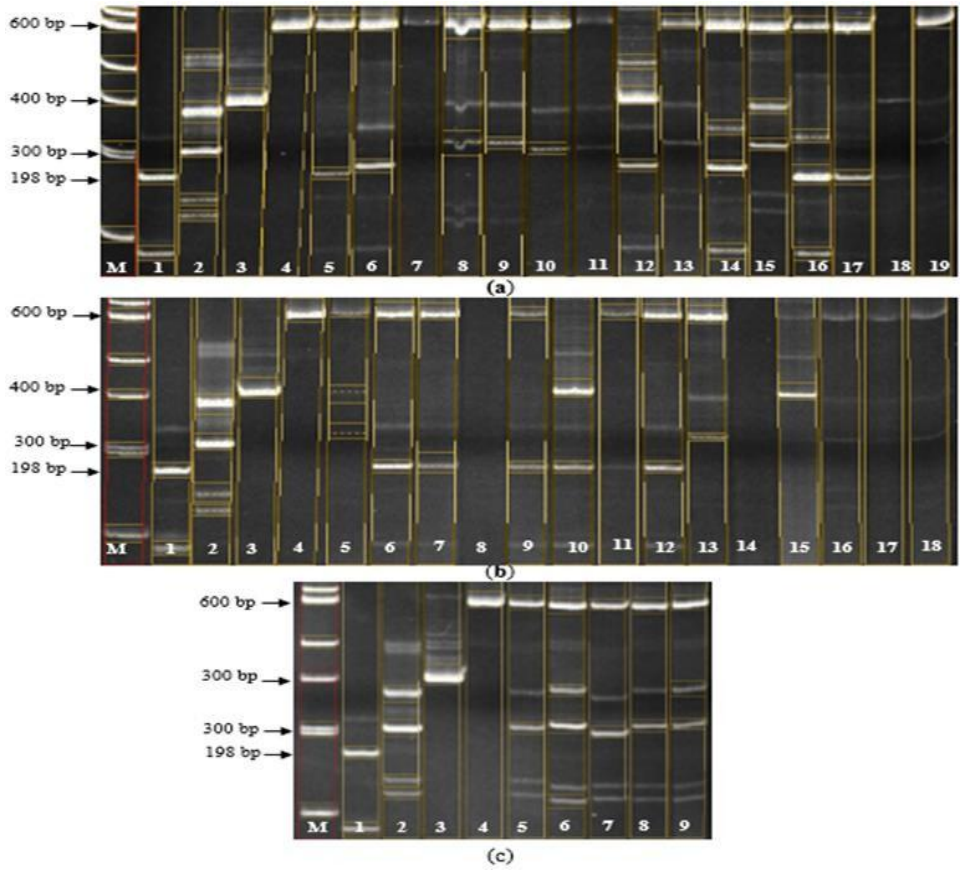
Гены устойчивости *Pi-33 и Pi-ta*. Ген устойчивости к пирикуляриозу Pi-33 локализован на коротком плече 8-й хромосомы риса и идентифицирован у ряда полукарликовых сортов подвида *indica*. Фитопатологические исследования показали высокую эффективность данного гена в обеспечении устойчивости к пирикуляриозу: среди около 2000 изолятов патогена, собранных в 55 странах, вирулентность была отмечена лишь у нескольких штаммов [180]. По электрофореграмме рисунка 22а видно, что образцы 7662 (16 лунка) и 7663 (17 лунка) выявлены как носители гомозиготного доминантного аллеля гена устойчивости *Pi-33*, поскольку эти генотипы повторяют профиль носителя гена резистентности C101-Lac.

Ген *Pi-ta* расположен на 12-й хромосоме и относится к семейству R-генов типа NBS-LRR. Его длина составляет 928 пар нуклеотидов, и он кодирует цитоплазматический рецептор, участвующий в распознавании гена вирулентности. Кластер R-генов, приуроченный к центромере двенадцатой хромосомы, включает аллельные либо тесно сцепленные гены *Pi-ta* и *Pi-ta2*, впервые идентифицированные Киёсава и его коллегами. Взаимодействие между этими двумя генами устойчивости, полученными из подвида *indica*, отличается высокой сложностью, вследствие чего большинство исследователей полагают, что для функционирования гена *Pi-ta* необходим ген *Pi-ta2* [181]. Кроме того, в центромерной области двенадцатой хромосомы локализованы и другие R-гены, включая *Pi-4a(t), Pi-4b(t), Pi-6(t) и Pi-12(t)*. По гену *Pi-ta* обнаружено гетерозиготное состояние гена в генотипах 03-27 (8 лунка) и 04468 (9 лунка), гомозиготами по этому локусу оказались генотипы 25-14 (12 лунка) и 7664 (18 лунка) (рисунок 10А), так как эти генотипы соответствуют ДНК положительному контрольному образцу IR36.

Согласно результатам (рисунок 23b), ген резистентности *Pi-33* показан в гомозиготном состоянии в генотипах 7668 (6 лунка), 7679 (7 лунка), 7684 (9 лунка), 7686 (10 лунка), 7689 (11 лунка) и в 7690 (12 лунка) по сравнению с C101-Lac. В генотипах 7686 (10 лунка) и 7701 (15 лунка) выявлен локус, который косегрегирует с доминантным геном устойчивости *Pi-ta* (рисунок 23B), а также генотип 7667 (5 лунка) показал гетерозиготное состояние гена *Pi-ta*, так как повторяет бэнды как IR36, так и C101-Lac. Размеры продуктов ПЦР, соответствующих доминантным генам *Pi-33* и *Pi-ta*, составляют 198 и 400 п.н., а для рецессивных генов – 300 и 600 п.н., соответственно. По рисунку 23c видно, что

казахстанские сорта не имеют в своих генотипах гены устойчивости *Pi-33* и *Pi-ta*.

По данным электрофореграмм из 4 анализированных казахстанских районированных высокопродуктивных сортов, использованных в качестве материнских линий при скрещиваниях, оказалось, что три сорта Баканасский, Айсауле и Ару содержат ген *Pi-2*. Остальные, изученные нами три гена *Pi-1*, *Pi-33* и *Pi-ta* не содержатся во всех четырех казахстанских генотипах. Следовательно, далее мы провели эксперименты по внедрению и пирамидированию этих генов в отечественные сорта с использованием методов гибридизации и MAS анализа для улучшения устойчивости риса к пирикуляриозу [182].



(a): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72); 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72); 3 – IR36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita); 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita); 5 – 04636; 6 – 19-14; 7 – 57-14; 8 – 03-27; 9 – 04468; 10 – 04470; 11 – 04469; 12 – 25-14; 13 – 04888; 14 – 212-05; 15 – 7653; 16 – 7662; 17 – 7663; 18 – 7664; 19 – 7666

(b): M – молекулярный маркер, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 3 – IR 36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 5 – 7667, 6 – 7668, 7 – 7679, 8 – 7683, 9 – 7684, 10 – 7686, 11 – 7689, 12 – 7690, 13 – 7695, 14 – 7698, 15 – 7701, 16 – 7702, 17 – 7712, 18 – 7824

(c): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 3 – IR36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 5 – Дон 7712, 6 – Баканасский, 7 – Фатима, 8 - Айсауле, 9 – Ару

Рисунок 23 – Электрофореграмма ПЦР анализа сортообразцов на присутствие генов *Pi-33* и *Pi-ta*

Большинство исследовательских работ сосредоточено на создании пирамидальных линий риса, несущих два или более генов устойчивости к пирикуляриозу, с использованием методов MAS и гибридизации. MAS-анализ облегчает идентификацию генов, их внедрение и пирамидирование в новые линии [183,184], что значительно ускоряет селекцию риса. Основная цель селекционеров риса в борьбе с пирикуляриозом – вывести новые сорта и линии с широким спектром и длительной устойчивостью [185–189]. Линии риса, несущие только один основной ген устойчивости, не могут противостоять изменяющейся популяции грибка. В этом случае выведение сортов, несущих не один ген, а целую пирамиду из нескольких генов устойчивости к пирикуляриозу, поможет преодолеть это заболевание [190,191].

Использование нескольких генов устойчивости, таких как *Pi-33* и *Pi-ta*, имеет решающее значение для предотвращения разрушения устойчивости *M. oryzae*. Если в культуре используется только один ген устойчивости, патогены могут эволюционировать, чтобы преодолеть его. Селекционеры могут выводить сорта риса с длительной и широкой устойчивостью путем скрининга и комбинирования *Pi-33* и *Pi-ta*, что снижает вероятность того, что патоген эволюционирует и преодолеет эти генетические барьеры. Это обеспечивает постоянную защиту от пирикуляриоза риса и помогает поддерживать эффективность устойчивости с течением времени [192]. Химические фунгициды часто используются в традиционных методах борьбы с пирикуляриозом риса, что может быть вредно для окружающей среды и способствовать развитию устойчивости патогена. Селекционеры могут снизить или полностью отказаться от использования химических фунгицидов, выявляя гены *Pi-33* и *Pi-ta* и внедряя их в новые сорта риса. Это способствует более устойчивым методам ведения сельского хозяйства, стимулирует применение комплексных методов борьбы с вредителями (IPM) и снижает загрязнение окружающей среды. Эти гены обеспечивают фермерам генетическую устойчивость, необходимую для борьбы с пирикуляриозом риса без значительной зависимости от химикатов, что положительно сказывается на окружающей среде и здоровье человека [193,194]. Ожидается, что пирикуляриоз риса может распространиться более широко, когда погодные условия изменятся в результате глобального изменения климата, особенно в регионах с более высокой влажностью и более высокими температурами. В этих меняющихся условиях устойчивость, обеспечиваемая генами *Pi-33* и *Pi-ta*, может смягчить последствия пирикуляриоза. Селекционеры могут создавать сорта, более устойчивые к давлению болезней и экологическим стрессам, выявляя эти гены. Это особенно важно для сохранения высоких урожаев риса в районах, подверженных риску изменения климата. Это обеспечивает долгосрочную продовольственную безопасность, делая рисоводство более устойчивым к предстоящим погодным условиям.

Скрининг гибридов риса на присутствие генов *Pi-1* и *Pi-2*. На рисунке 24а показано, что 4 гибрида 7824/Айсауле *(var. italica Alef.)* (11 лунка), 7824/Айсауле *(var. subuzbekistanica Kond.)* (12 лунка), 7698/Баканасский *(var.*

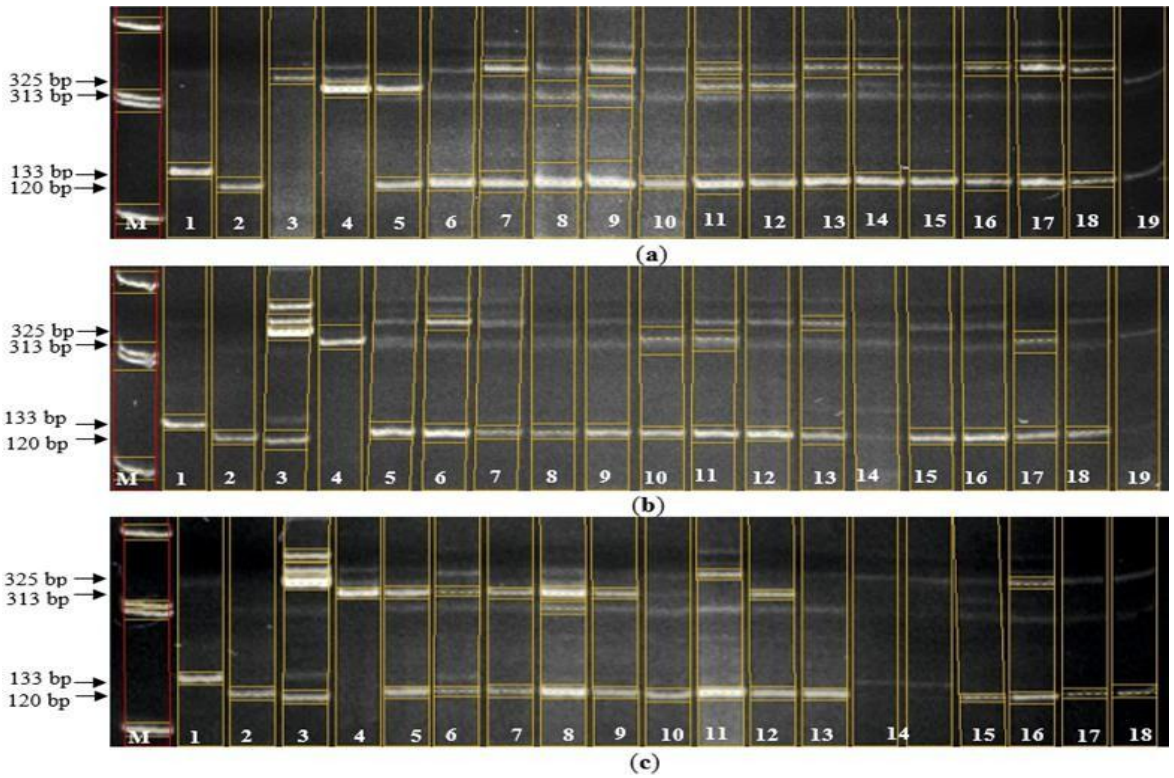
subvulgaris Brsch.) (14 лунка), 7698/Баканасский *(var. italica Alef.)* (15 лунка) являются гетерозиготами по *Pi-2*. Размеры ПЦР-продуктов, соответствующих доминантным генам *Pi-1* и *Pi-2*, составляют 133 и 325 п.н., рецессивным – 120 и 313 п.н. соответственно.

Согласно рисунку 24b следующие 13 гибридов показали содержание в своих генотипах *Pi-1* ген в гомозиготном состоянии: 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)* (5 лунка), Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.)* (6 лунка), Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)* (7 лунка), Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)* (8 лунка), Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)* (9 лунка), Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.)* (10 лунка), Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)* (11 лунка), Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.)* (12 лунка), Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)* (13 лунка), Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)* (15 лунка), Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)* (16 лунка), Айсауле/Дон 7712 *(var. sundensis Koern.)* (17 лунка), Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)* (18 лунка).

Профили ДНК вышеперечисленных гибридных линий были аналогичны профилям сортов-дифференциаторов С101-Lac и С101-А51, что свидетельствует об успешном переносе генов устойчивости к пирикуляриозу. Электрофореграмма на рисунке 24c демонстрирует гетерозиготное состояние гибрида Баканасский /7683 *var. subjanthoseros Brsch.* (лунка 6) по гену *Pi-1*. Гибридная линия Ару/04636 *var. vulgaris Koern.* оказалась доминирующей гомозиготой по этому гену (лунка 14). Однако существуют исследования по оценке устойчивости созданных линий к фитопатогенам на естественном или искусственном инфекционном фоне, позволяющие определить реальную степень устойчивости вновь созданных линий.

Liu и др. разработали несколько линий, содержащих два гена устойчивости к пирикуляриозу (*Pi37/Pid 3*), (*Pi5/Pi54*), (*Pi54/Pid3*) и (*Pigm/Pid37*), которые показали высокую устойчивость к пирикуляриозу листьев и шейки в условиях естественного заражения [195]. Дубина и др. создали пирамидированные линии риса, несущие пять генов устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta и Pi-b*) в гомозиготном состоянии, и получили сорта (Pentagon, Magnate, Pirouette, Argamac, Kapitan, Lenaris). Костылев и др. получили пирамидированные линии риса с 2-6 генами устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b и Pi-40*). Оценка устойчивости пирамидированных линий к грибковой инфекции показала, что линии, содержащие 2 и более гена, более устойчивы по сравнению с моногенными линиями [191]. Ji, Z.J. et al. создали пирамидированную линию с генами Pi1 и Pi2, которая продемонстрировала устойчивость к пирикуляриозу [196].

Положительные результаты, полученные разными исследователями, подтверждают эффективность использования этих комбинаций генов (Pi-1, Pi-2, Pi-33 и Pi-ta) для улучшения защиты риса от пирикуляриоза. Сочетание нескольких генов в одном генотипе показало наибольшую эффективность в стратегии длительной устойчивости риса к пирикуляриозу [197].



(a): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 3 – C101-A51(контроль «+» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 4 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 5 – F_2 Баканасский/7668 *(var. subuzbekistanica Kond.)*, 6 – F_2 Баканасский/04470 *(var. vulgaris Koern.)*, 7 – F_2 Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.)*, 8 – F_2 Баканасский/7653 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 9 – F_2 Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 10 – F_2 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.)*, 11 – F_2 7824/Айсауле *(var. italica Alef.)*, 12 – F_2 7824/Айсауле *(var. subuzbekistanica Kond.)*, 13 – F_2 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 14 – F_2 7698/Баканасский *(var. subvulgaris Brsch.)*, 15 – F_2 7698/Баканасский *(var. italica Alef.)*, 16 – F_2 Ару/7701 *(var. vulgaris Koern.)*, 17 – F_2 Баканасский/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 18 – F_2 Айсауле/7679 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 19 – F_2 7698/Айсауле *(var. italica Alef.)*

(b): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 3 – C101-A51 (контроль «+» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 4 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 5 – 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)*, 6 – Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.)*, 7 – Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*, 8- Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 9 – Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*, 10 – Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 11 – Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*, 12 –Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.)*, 13 – Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*, 14 – Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 15 – Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 16 – Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 17 – Айсауле/Дон 7712 *(var. sundensis Koern.)*, 18 – Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*, 19 – Фатима/7695 *(var. italica Alef.)*

(c): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 – C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-1* в локусах Rm144 и RM224), 3 – C101-A51 (контроль «+» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 4 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-2* в локусах RM-527 и SSR-140), 5 – Фатима/7695 *(var. breviaristata Vav.)*, 6 – Баканасский/7683 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 7 – 7698/Ару *(var. erythroceros Koern.)*, 8 – 7698/Ару *(var. suberythroseros Kan.)*, 9 – Баканасский/Дон 7712, 10 – Баканасский/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)*, 11 – Ару/212-05 *(var. vulgaris Koern.)*, 12 – Ару/7668 *(var. vulgaris Koern.)*, 13 – Айсауле/04468 *(var. italica Alef.)*, 14 – Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*, 15 – Баканасский/7690 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 16 – Баканасский/7690 *(var. vulgaris Koern.)*, 17 – Баканасский/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 18 – Баканасский/04468 *(var. vulgaris Koern.)*

Рисунок 24 – Электрофореграмма ПЦР анализа гибридов на присутствие генов *Pi-1* и *Pi-2*

Однако есть данные, что линии риса, несущие как отдельные гены устойчивости, так и линии с пирамидированными генами, могут иметь широкий спектр устойчивости к *M. Oryzae* [198]. Погода и уровень патогенности штаммов гриба являются основными детерминантами этого.

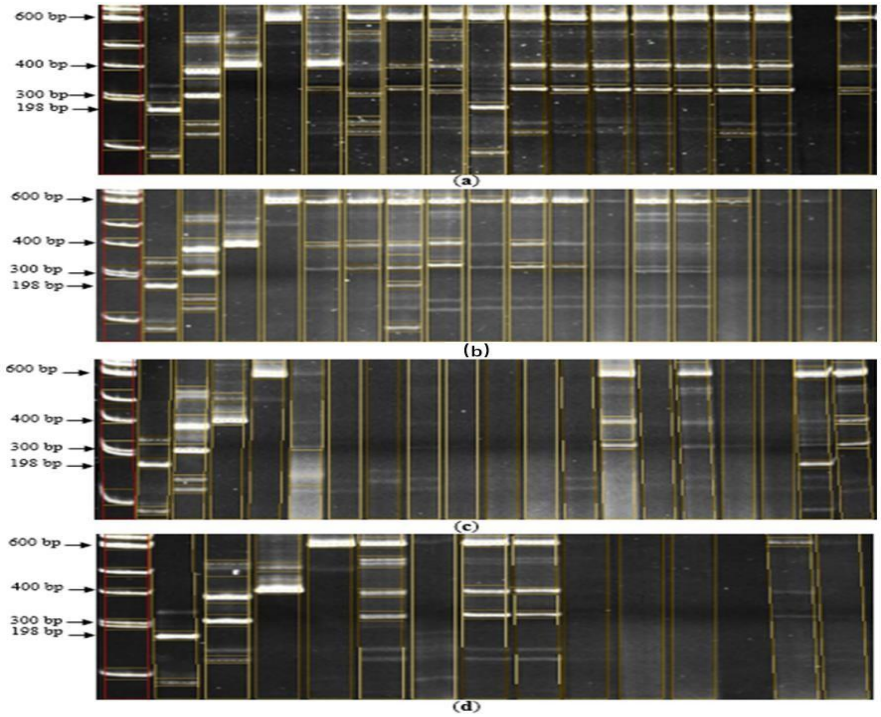
Скрининг гибридов риса на присутствие генов *Pi-33* и *Pi-ta*. Из рисунка 25a видно, что гибрид Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)* (9 лунка) имеет в генотипе целевой *Pi-33* ген в гомозиготном состоянии. Образец Баканасский/7668 *(var. subuzbekistanica Kond.)* (5 лунка) показал наличие доминантного гена устойчивости *Pi-ta.* Размеры ПЦР-продуктов, соответствующих доминантным генам *Pi-33* и *Pi-ta*, составляют 198 и 400 п.н., а рецессивным генам – 300 и 600 п.н. соответственно.

Электрофореграмма рисунка 25b показывает, что гибридная линия Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)* (7 лунка) является гетерозиготным по гену устойчивости *Pi-33*. Согласно рисунку 24b гетерозиготное состояние аллеля *Pi-ta* обнаружилось у 6 гибридных линии: 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)* (5 лунка), Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.)* (6 лунка), Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)* (7 лунка), Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)* (9 лунка), Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.)* (10 лунка), Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)* (11 лунка).

Рисунок электрофореграммы 25c демонстрирует, что линия Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)* (18 лунка) является гетерозиготным по гену *Pi-33*. Линии Ару/7666 *(var. suberythroseros Kan.)* (13 лунка), Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)* полуостистый (15 лунка), Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)* (19 лунка) являются гетерозиготными по гену устойчивости к пирикуляриозу *Pi-ta.* Электрофореграмма рисунка 24d показывает, что линии Баканасский/Дон 7712 (5 лунка), Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)* (7 лунка), Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.)* (8 лунка) и Ару/Дон 7712 *(var. erythroceros Koern.)* (13 лунка) имеют в генотипах гетерозиготное состояние аллеля *Pi-ta*. Следовательно, на электрофорезе ПЦР продуктов генов *Pi-33 и Pi-ta* в гибридном потомстве наблюдается наличие как гомозиготных, так и гетерозиготных линий. Все остальные проанализированные образцы показали соответствие ДНК профиля с неустойчивым сортом контролем Флагманом, то есть показали наличие рецессивного аллеля генов *Pi-33* и *Pi-ta* соответственно.

По данным электрофореграмм ПЦР-продуктов выявлено 27 гибридных линий, генотипы которых содержат гены устойчивости к пирикуляриозу. Из них 7 гибридов являются пирамидированными: 6 гибридов 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.),* Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.),* Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.),* Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.),* Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.),* Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)* содержат 2 гена устойчивости к пирикуляриозу *Pi-1* и *Pi-ta.* В гибриде Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)* пирамидированы 3 гена – *Pi-1, Pi-33* и *Pi-ta*. Остальные гибриды содержат по одному из изученных генов. Хорошо известно, что устой-

чивость сортов риса повышается за счёт пирамидирования нескольких генов устойчивости [199].



(a): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 - C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 3 – IR36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 5 – Баканасский/7668 *(var. subuzbekistanica Kond.)*, 6 – Баканасский/04470 *(var. vulgaris Koern.)*, 7 – F_2 Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.)*, 8 – Баканасский/7653 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 9 –Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 10 – Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.)*, 11 – 7824/Айсауле *(var. italica Alef.)*, 12 – 7824/Айсауле *(var. subuzbekistanica Kond.)*, 13 – 7698/Баканасский *(var. subvulgaris Brsch.)*, 14 – 7698/Баканасский *(var. italica Alef.)*, 15 – Ару/7701 *(var. vulgaris Koern.)*, 16 – Баканасский/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 17 – Айсауле/7679 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 18 – 7698/Айсауле *(var. italica Alef.)*

(b): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 - C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 3 – IR36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 5 – 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)*, 6 – Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.)*, 7 – Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*, 8 – Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 9 – Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*, 10 – Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.)*, 11 – Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*, 12 –Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 13 – Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 14 – Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 15 – Айсауле/Дон 7712 *(var. sundensis Koern.)*, 16 – Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*, 17 – Фатима/7695 *(var. breviaristata Vav.)*, 18 – Баканасский/7683 *(var. subjanthoseros Brsch.)*

(c): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 - C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 3 – IR36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 5 – Ару/212-05 *(var. vulgaris Koern.)*, 6 – Ару/7668 *(var. vulgaris Koern.)*, 7 – Айсауле/04468 *(var. italica Alef.)*, 8 – Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*, 9 – Баканасский/7690 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 10 –Баканасский/7690 *(var. vulgaris Koern.)*, 11 – Баканасский/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 12 – Баканасский/04468 *(var. vulgaris Koern.)*, 13 – Ару/7666 *(var. suberythroseros Kan.)*, 14 – Фатима/7653 *(var. persica Kan.)*, 15 – Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)* полуостистый, 16 – Ару/7683 *(var. janthoceros Koern.)*, 17 – Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.)*, 18 – Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*, 19 – Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*

(d): M – молекулярный маркер 100 bp, 1 - C101-Lac (контроль «+» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 2 – Флагман (контроль «-» для гена *Pi-33* в локусах Rm310 и RM72), 3 – IR36 (контроль "+" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 4 – Флагман (контроль "-" для гена *Pi-ta* в локусах Pita), 5 – Баканасский/Дон 7712, 6 – Фатима/7689 *(var. italica Alef.)*, 7 – Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 8 – Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.)*, 9 – Баканасский/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)*, 10 – Ару/Дон 7712 *(var. vulgaris Koern.)*, 11 – 7698/Ару *(var. erythroceros Koern.)*, 12 – 7698/Ару *(var. suberythroseros Kan.)*, 13 – Ару/Дон 7712 *(var. erythroceros Koern.)*, 14 – Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)*

Рисунок 25 – Электрофореграмма ПЦР гибридных образцов на присутствие генов *Pi-33* и *Pi-ta*

Wang X. и др. сообщили о создании 74 линий путём интрогрессии и пирамидирования генов устойчивости к биотическим факторам, таким как цикадка (BPH), пирикуляриоз, бактериальный ожог (BLB) и гены аромата [168]. Эти улучшенные линии риса (IL), содержащие комбинации от 1 до 4 генов устойчивости к BPH, пирикуляриозу, BLB и генам аромата, характеризовались умеренной или высокой устойчивостью к множественным биотическим стрессам [198].

Следует отметить, что введение и пирамидирование нескольких генов в линии иногда не приводит к повышению устойчивости линий, а иногда даже может иметь отрицательный эффект. Введение нескольких генов в одну линию может быть несовместимым, подавляя действие друг друга и приводя к повышению чувствительности к фитопатогену или снижению урожайности линий [188].

Сложное взаимодействие между соединениями растительного происхождения и химическими веществами может изменять гидрофильность посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Эта модификация улучшает водопоглощение и доставку питательных веществ при выращивании риса. Улучшенная гидрофильность и поверхностное взаимодействие этих комплексов могут способствовать лучшему удержанию влаги в почве и более эффективному усвоению питательных веществ, что влияет на ключевые факторы, критически важные для оптимизации роста и урожайности риса [200–202]. Появление устойчивых к пестицидам сортов риса снизило потребность в химических пестицидах, что благоприятно сказывается на здоровье почвы [203]. Характеристики и рост растений в различных условиях также зависят от свойств почвы. Химикаты часто вызывают дисбаланс микробиома почвы, что может повлиять на плодородие почвы и долгосрочное сельскохозяйственное производство [204]. Фермеры могут уменьшить эти последствия, используя устойчивые сорта риса, которые способствуют созданию более здоровой и устойчивой почвы.

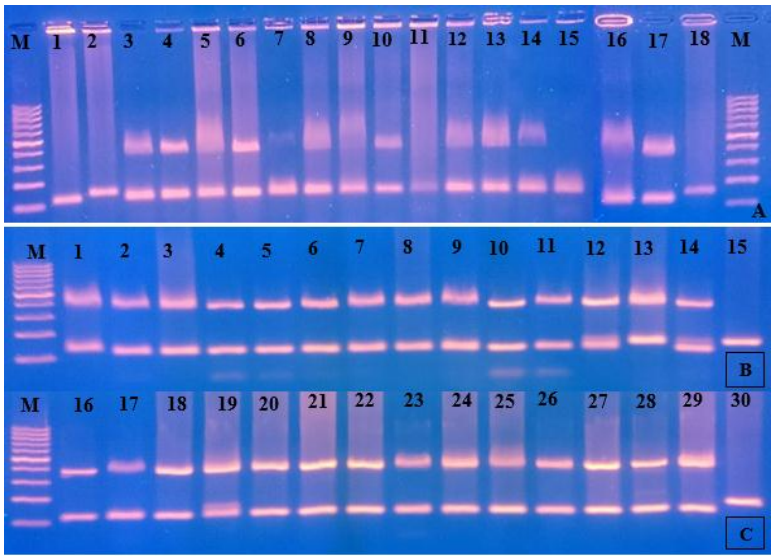
Таким образом, селекция с помощью молекулярных маркеров является эффективным способом повышения устойчивости риса к болезням. Использование MAS в сочетании с методами традиционной селекции позволили создать отечественные высокопродуктивные гибриды риса с повышенной резистентностью к *Magnaporthe oryzae*.

Идентификация генов устойчивости в поколении F_3.

Ген устойчивости *Pi1*. По результатам проведенного молекулярно-генетического скрининга гибридов F_3 поколения на наличие генов резистентности к пирикуляриозу выявлено, что ген *Pi-1* встречается у следующих образцов: F_3 Баканасский/7667 *(var. uzbekistanica Ukl.)* (лунка 16), F_3 Баканасский/7667 *(var. janthoceros Koern.)* (лунка 17), так как они повторяют профиль сорта-дифференциатора IRBL – CL, который является носителем данного гена.

Остальные образцы не показали наличие гена *Pi-1* с размером бэнда 137 bp (рисунок 26А).

Согласно рисунку 26В ген *Pi-1* обнаружен в образцах F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)* (лунка 2), F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 3), F_3 Ару/7666 *(var. erythroceros Koern.)* (лунка 4), F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)* (лунка 5), F_3 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 6), F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.* (лунка 10), F_3 Баканасский/7684 *(var. italica Alef.)* (лунка 14) с бэндом размером 137 bp, соответствующий праймеру RM224. По электрофореграмме 26С наличие гена *Pi-1* наблюдается в гибридных линиях F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)* (лунка 16), F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)* (лунка 18), F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 26), F_3 Баканасский /7689 *(var. suberythroseros Kan.)* (лунка 27), F_3 Баканасский/7689 *(var. erythroceros Koern.)* (28), F_3 Баканасский/7689 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 29).



(A) M - молекулярный маркер 100 bp, 1 - Контроль + для гена Pi1 IRBL – CL, 2 – Контроль – CO 39, 3 - F_3 Баканасский/7668 *(var. italica Alef.)*, 4 - F_3 Баканасский /7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 5 - F_3 Баканасский /7668 *(var. vulgaris Koern.)*, 6 - F_3 Баканасский /7668 *(var. erythroceros Koern.)*, 7 - F_3 Баканасский /7668 *(var. janthoceros Koern.)*, 8 - F_3 Ару/Дон 7712 *(var. italica Koern.)*, 9 - F_3 Ару/Дон 7712 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 10 - F_3 Баканасский /Дон 7712 (var. *vulgaris Koern.*), 11 - F_3 Баканасский /Дон 7712 *(var. philippensis Post.)*, 12 - F_3 Баканасский /Дон 7712 *(var. chambhanica Gust.)*, 13 - F_3 Баканасский /7667 *(var. italica Alef.)*, 14 - F_3 Баканасский /7667 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 15 - F_3 Баканасский /7667 *(var. vulgaris Koern.)*, 16 - F_3 Баканасский /7667 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 17 – F_3 Баканасский /7667 *(var. janthoceros Koern.)*, 18 – Nipponbare

(B) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 1 - F_3 Баканасский /7684 *(var. vulgaris Koern.)*, 2 - F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)*, 3 - F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)*, 4 - F_3 Ару/7666 *(var. erythroceros Koern.)*, 5 - F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)*, 6 - F_3 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 7 - F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 8 - F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. peradenica Gust.)*, 9 - F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. nigrispina Port.)*, 10 - F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)*, 11 - F_3 Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*, 12 - F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*, 13 - F_3 Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*, 14 - F_3 Баканасский /7684 *(var. italica Alef.)*, 15 – Nipponbare

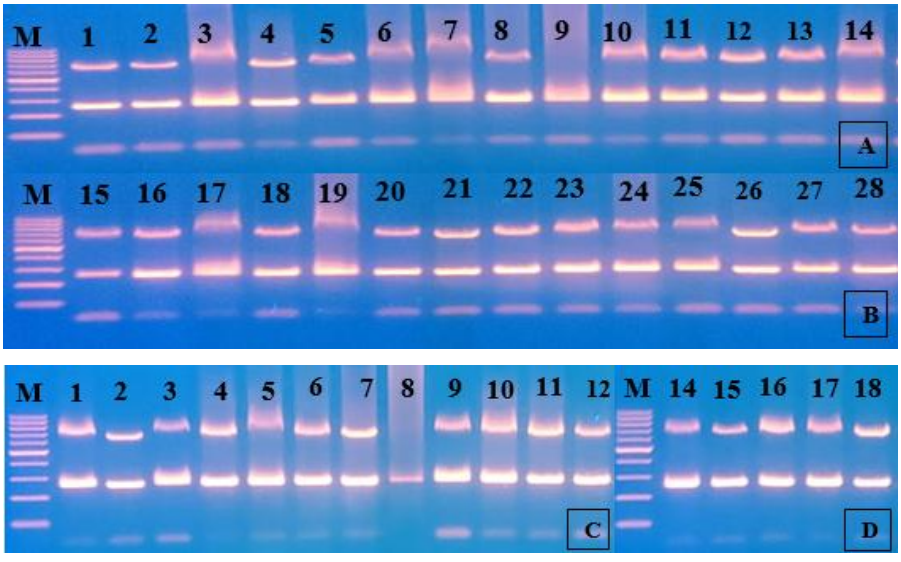
(C) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 16 - F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*, 17 - F_3 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*, 18 - F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)*, 19 - F_3 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*, 20 – F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 21 - F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 22 - F_3 Ару/04468 *(var. italica Alef.)*, 23 - F_3 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 24 - F_3 Ару/04468 *(var. vulgaris Koern.)*, 25 - F_3 Баканасский /7667 *(var. italica Alef.)*, 26 - F_3 Баканасский /7667 *(var. vulgaris Koern.)*, 27 - F_3 Баканасский/7689 *(var. suberythroseros Kan.)*, 28 - F_3 Баканасский /7689 *(var. erythroceros Koern.)*, 29 - F_3 Баканасский/7689 *(var. vulgaris Koern.)*, 30 – Nipponbare

Рисунок 26 – Электрофореграмма ПЦР продуктов F_3 гибридов на наличие гена *Pi-1*

Ген устойчивости *Pi40*. Этот ген был интрогрессирован в геном культурного риса *Oryza sativa* L. из дикорастущего вида *Oryza australiensis* и относится к генам широкого спектра устойчивости, обеспечивающим высокий уровень резистентности к пирикуляриозу. Он локализован на коротком плече шестой хромосомы; установлено, что соответствующий геномный участок имеет протяжённость около 95 тысяч пар оснований. В качестве реципиентного генотипа при интрогрессии использовался корейский сорт подвида *japonica*. В результате была получена линия IR65482-4-136-2-2, несущая данный ген, которая применялась для создания гибридной популяции и проведения картирования гена *Pi-40* [205]. ПЦР скрининг F_3 поколения на наличие гена *Pi-40* показал (рисунок 27A) наличие бэндов размером 256 и 641, соответствующие маркерам MSM6 и 9871.T7E2b у образцов F_3 Баканасский/7668 *(var. italica Alef.)* (лунка 1), F_3 Баканасский/7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)* (лунка 2), F_3 Баканасский/7668 *(var. erythroceros Koern.)* (лунка 4), F_3 Баканасский/Дон 7712 (var. *vulgaris Koern.*) (лунка 8), F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)* (лунка 11), F_3 Баканасский/7667 *(var. subvulgaris Brsch.)* (лунка 12), F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 13), свидетельствующие о том, что данные гибриды имеют в своих генотипах этот ген.

Согласно электрофореграмме на рисунке 27B выявлены следующие гибриды, имеющие в своих генотипах ген *Pi-40:* F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)* (лунка 21), F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)* (лунка 26), F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)* (лунка 28).

Ген *Pi-40,* локализованный на хромосоме 6 (рисунок 27C), был установлен в образцах F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)* (лунка 2), F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)* (лунка 7), F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 12).



(A) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 1 - F_3 Баканасский /7668 *(var. italica Alef.)*, 2-F_3 Баканасский /7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 3-F_3 Баканасский /7668 *(var. vulgaris Koern.)*, 4-F_3 Баканасский /7668 *(var. erythroceros Koern.)*, 5-F_3 Баканасский /7668 *(var. janthoceros Koern.)*, 6-F_3Ару/Дон 7712 *(var. italica Koern.)*, 7-F_3 Ару/Дон 7712 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 8-F_3 Баканасский /Дон 7712 (var. *vulgaris Koern.*), 9-F_3 Баканасский/Дон 7712 *(var. philippensis Post.)*, 10-F_3 Баканасский /Дон 7712 *(var. chambhanica Gust.)*, 11-F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)*, 12-F_3 Баканасский/7667 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 13-F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*, 14-F_3 Баканасский/7667 *(var. uzbekistanica Ukl.)*

(B) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 15-F_3 Баканасский /7667 *(var. janthoceros Koern.)*, 16-F_3 Баканасский/7684 *(var. italica Alef.)*, 17-F_3 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.)*, 18-F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)*, 19-F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)*, 20-F_3 Ару/7666 *(var. erythroceros Koern.)*, 21-F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)*, 22-F_3 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 23-F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 24-F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. peradenica Gust.)*, 25-F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. nigrispina Port.)*, 26-F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)*, 27-F_3 Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*, 28-F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*

(C) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 1-F_3 Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*, 2-F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*, 3-F_3 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*, 4-F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)*, 5-F_3 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*, 6-F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 7-F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 8-F_3 Ару/04468 *(var. italica Alef.)*, 9-F_3 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 10-F_3 Ару/04468 *(var. vulgaris Koern.)*, 11-F_3 Баканасский /7667 *(var. italica Alef.)*, 12-F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*

(D) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 14-F_3 Баканасский/7689 *(var. suberythroseros Kan.)*, 15-F_3 Баканасский /7689 *(var. erythroceros Koern.)*, 16-F_3 Баканасский/7689 *(var. vulgaris Koern.)*, 17-F_3 Баканасский /7689 *(var. italica Alef.)*, 18-F_3 Фатима/7689 *(var. mutica Vav.)*

Рисунок 27 – Электрофореграмма ПЦР продуктов F_3 гибридов на наличие гена *Pi-40*

По рисунку 27D образцы F_3 Баканасский/7689 *(var. erythroceros Koern.)* (лунка 15), F_3 Фатима/7689 *(var. mutica Vav.)* (лунка 18) показали наличие гена *Pi-40.*

Ген устойчивости *Pi54.* Ген устойчивости к пирикуляриозу риса *Pi54*, первоначально идентифицированный в индийском сорте Tetep, обеспечивает широкий спектр устойчивости. Ученые исследовали аллельное разнообразие гена *Pi54* среди 885 индийских генотипов риса, которые оказались устойчивыми в ходе скрининга к полевой смеси естественно существующих штаммов *M. oryzae*, а также к пяти уникальным штаммам [206]. На рисунке 28A, образцы F_3 Баканасский/7668 *(var. italica Alef.)* (лунка 1) и F_3 Баканасский/7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)* (лунка 2) указывают на наличие бэнда размером 216 bp праймера Pikh, который тесно сцеплен с геном *Pi-54.*

На рисунке 28B данный ген встречается в гибридах F_3 Баканасский/7667 *(var. janthoceros Koern.)* (лунка 15), F_3 Баканасский/7684 *(var. italica Alef.)* (лунка 16).

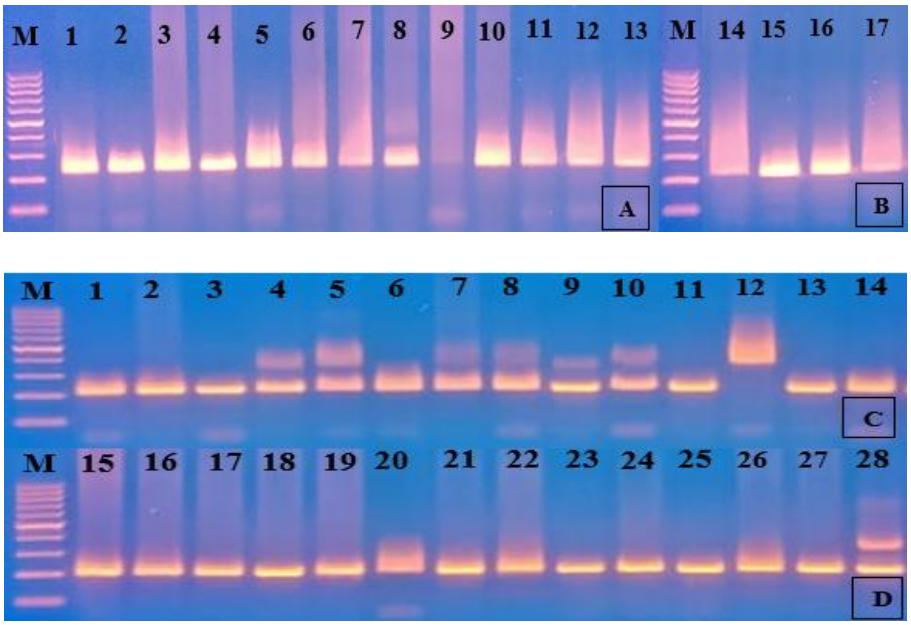
По результатам рисунка 28C, ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-54* обнаружен в гибридах F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)* (лунка 1), F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 2), F_3 Ару/7666 *(var. erythroceros Koern.)* (лунка 3), F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)* (лунка 9), F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)* (лунка 11), F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)* (лунка 13), F_3 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)* (лунка 14).

По рисунку 28D ген *Pi-54* встречается в гибридах F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)* (лунка 15), F_3 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)* (лунка 16), F_3 Айсау-

ле/04470 *(var. italica Alef.)* (лунка 17), F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)* (лунка 18).

Использование устойчивых сортов с несколькими генами R является одним из наиболее эффективных и экологически и экономически устойчивых методов ограничения заболеваемости, что приводит к длительной устойчивости и преодолению опасностей пестицидов. Пирамидирование генов устойчивости представляет собой полезный инструмент для предотвращения заражения и применяется к различным сортам риса во всем мире.

В результате проведенного молекулярного скрининга вывели общую таблицу, которая наглядно показывает какие гены присутствуют в гибридных линиях (таблица 9).



(A) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 1-F_3 Баканасский/7668 *(var. italica Alef.)*, 2-F_3 Баканасский/7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 3-F_3 Баканасский /7668 *(var. vulgaris Koern.)*, 4-F_3 Баканасский /7668 *(var. erythroceros Koern.)*, 5-F_3 Баканасский /7668 *(var. janthoceros Koern.)*, 6-F_3 Ару/Дон 7712 *(var. italica Koern.)*, 7-F_3 Ару/Дон 7712 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 8-F_3 Баканасский /Дон 7712 (var. *vulgaris Koern.*), 9-F_3 Баканасский /Дон 7712 *(var. philippensis Post.)*, 10-F_3 Баканасский /Дон 7712 *(var. chambhanica Gust.)*, 11-F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)*, 12-F_3 Баканасский /7667 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 13-F_3 Баканасский /7667 *(var. vulgaris Koern.)*

(B) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 14-F_3 Баканасский /7667 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, 15-F_3 Баканасский /7667 *(var. janthoceros Koern.)*, 16-F_3 Баканасский/7684 *(var. italica Alef.)*, 17-F_3 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.)*

(C) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 1-F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)*, 2-F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)*, 3-F_3 Ару/7666 *(var. erythroceros Koern.)*, 4-F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)*, 5-F_3 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, 6-F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 7-F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. peradenica Gust.)*, 8-F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. nigrispina Port.)*, 9-F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)*, 10-F_3 Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*, 11-F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*, 12-F_3 Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*, 13-F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*, 14-F_3 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*

(D) Маркер - молекулярный маркер 100 bp, 15-F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)*, 16-F_3 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*, 17-F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, 18-F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 19-F_3 Ару/04468 *(var. italica Alef.)*, 20-F_3 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, 21-F_3 Ару/04468 *(var. vulgaris Koern.)*, 22-F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)*, 23-F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*, 24-F_3 Баканасский/7689 *(var. suberythroseros Kan.)*, 25-F_3 Баканасский/7689 *(var. erythroceros Koern.)*, 26-F_3 Баканасский/7689 *(var. vulgaris Koern.)*, 27-F_3 Баканасский/7689 *(var. italica Alef.)*, 28-F_3 Фатима/7689 *(var. mutica Vav.)*

Рисунок 28 – Электрофореграмма ПЦР продуктов F_3 гибридов на наличие гена *Pi-54*

Ballini и соавторы показали, что около 80% всех генов, отвечающих за устойчивость к пирикуляриозу, находятся вблизи кандидатов NBS-LRR. Это указывает на то, что неслучайное распределение генов устойчивости частично связано с локализацией NBS-LRR-домена, включающего эти гены в геноме [207].

Таблица 9 – Молекулярный скрининг гибридных линии риса на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу с использованием SSR маркеров

Название гибридных линий	Молекулярные маркеры			
	RM 224/ RM1233	MSM6/ 9871.T7E2b	TRS26/ Pikh MAS	Количество встречающихся аллелей
	Гены устойчивости			
	Pi-1	*Pi-40*	*Pi-54*	
	Локализация на хромосоме			
	11	6	11	
1	2	3	4	5
F_3 Баканасский/7668 *(var. italica Alef.)*	0	1	1	2
F_3 Баканасский /7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)*	0	1	1	2
F_3 Баканасский /7668 *(var. vulgaris Koern.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский /7668 *(var. erythroceros Koern.)*	0	1	0	1
F_3 Баканасский /7668 *(var. janthoceros Koern.)*	0	0	0	0
F_3 Ару/Дон 7712 *(var. italica Koern.)*	0	0	0	0
F_3 Ару/Дон 7712 *(var. uzbekistanica Ukl.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский/Дон 7712 (*var. vulgaris Koern.*)	0	1	0	1
F_3 Баканасский/Дон 7712 *(var. philippensis Post.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский/Дон 7712 *(var. chambhanica Gust.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)*	0	1	0	1

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
F_3 Баканасский/7667 *(var. subvulgaris Brsch.)*	0	1	0	1
F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*	0	1	0	1
F_3 Баканасский/7667 *(var. uzbekistanica Ukl.)*	1	0	0	1
F_3 Баканасский/7667 *(var. janthoceros Koern.)*	1	0	1	2
F_3 Баканасский/7684 *(var. italica Alef.)*	1	0	1	2
F_3 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.)*	0	0	0	0
F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)*	1	0	1	2
F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)*	1	0	1	2
F_3 Ару/7666 *(var. erythroceros Koern.)*	1	0	1	2
F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)*	1	1	0	2
F_3 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*	1	0	0	1
F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*	0	0	0	0
F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. peradenica Gust.)*	0	0	0	0
F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. nigrispina Port.)*	0	0	0	0
F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)*	1	1	1	3
F_3 Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*	0	0	0	0
F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*	0	1	1	2
F_3 Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*	0	0	0	0
F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*	0	1	1	2
F_3 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*	0	0	1	1
F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)*	0	0	1	1
F_3 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	0	0	1	1
F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*	0	0	1	1
F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*	0	1	1	2
F_3 Ару/04468 *(var. italica Alef.)*	0	0	0	0
F_3 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*	0	0	0	0
F_3 Ару/04468 *(var. vulgaris Koern.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*	0	1	0	1
F_3 Баканасский/7689 *(var. suberythroseros Kan.)*	0	0	0	0

Продолжение Таблицы 9

1	2	3	4	5
F_3 Баканасский/7689 *(var. erythroceros Koern.)*	0	1	0	1
F_3 Баканасский/7689 *(var. vulgaris Koern.)*	0	0	0	0
F_3 Баканасский/7689 *(var. italica Alef.)*	0	0	0	0
F_3 Фатима/7689 *(var. mutica Vav.)*	0	1	0	1

Таким образом, в результате проведенного молекулярного скрининга гибридов поколения F_3 на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1*, *Pi-40* и *Pi-54*) встречаются пирамидированные гибридные линии. Среди изученных 45 гибридов у 26 обнаружились гены, а именно по одному гену устойчивости в 14 гибридах (F_3 Баканасский/7668 *(var. erythroceros Koern.)*, F_3 Баканасский/Дон 7712 (var. *vulgaris Koern.*), F_3 Баканасский/7667 *(var. italica Alef.)*, F_3 Баканасский/7667 *(var. subvulgaris Brsch.)*, F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*, F_3 Баканасский/7667 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, F_3 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*, F_3 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*, F_3 Ару/04636 *(var. italica Alef.)*, F_3 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*, F_3 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, F_3 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*, F_3 Баканасский/7689 *(var. erythroceros Koern.)*, F_3 Фатима/7689 *(var. mutica Vav.)*); по два гена устойчивости в 11 гибридах (F_3 Баканасский/7668 *(var. italica Alef.)*, F_3 Баканасский /7668 *(var. uzbekistanica Ukl.)*, F_3 Баканасский/7667 *(var. janthoceros Koern.)*, F_3 Баканасский/7684 *(var. italica Alef.)*, F_3 Ару/7666 *(var. italica Alef.)*, F_3 Ару/7666 *(var. vulgaris Koern.)*, F_3 Ару/0327 *(var. italica Alef.)*, F_3 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*, F_3 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*, F_3 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*); а все изученные 3 гена устойчивости встретились в одной гибридной линий - F_3 Ару/0327 *(var. sundensis Koern.)* (таблица 10).

3.3 Проведение фитопатологического теста для оценки созданных гибридов на устойчивость к *Magnaporthe oryzae*

Возбудитель пирикуляриоза относится к карантинным объектам, вызываемое несовершенным грибом *Magnaporthe oryzae*. ИББР не имеет разрешения для работы с особо опасными инфекциями и не располагает соответствующими условиями для работы с данным возбудителем. Поэтому исследования по оценке риса на устойчивость к пирикуляриозу были проведены в ФНЦ риса.

В качестве восприимчивого контроля (sensitive) использовался сорт Победа 65, в то время как устойчивым контролем выбран сорт Авангард (resistance). Заражение растений осуществлялось на стадии кущения путём опрыскивания суспензией конидий гриба *M. oryzae*, полученной из 2-3-недельных колоний. Колонии промывали 20-30 мл воды, встряхивали в течение 10 минут, затем фильтровали через марлю, после чего проводили подсчёт ко-

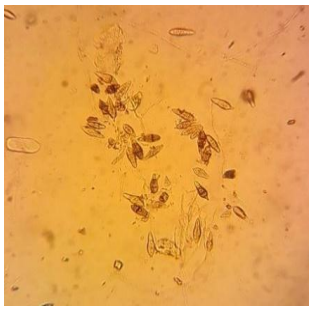
нидий с помощью микроскопа (при увеличении 120×), доводя титр до 100000 конидий/мл (10-14 спор в поле зрения). Опрыскивание осуществлялось из пульверизатора из расчета 0,5 мл суспензии на одно растение. Для улучшения прилипания в раствор добавляли препарат «Tween» (Россия) по расчету 1 капля на 1 литр воды [208].

Учёт степени поражения растений проводился на 14-й день после инокуляции в соответствии с экспресс-методом оценки сортовой устойчивости риса к пирикуляриозу. Оценка включала два показателя: тип реакции (в баллах) и степень поражения (в процентах), основываясь на десятибалльной шкале Международного института риса. К устойчивым относили растения с 0-1 баллом, характеризующиеся отсутствием поражения либо наличием мелких коричневых пятен, занимающих менее 25% площади листовой поверхности. Среднеустойчивыми считались растения с баллами от 2 до 5, на которых наблюдались типичные эллиптические пятна длиной 1-2 см, охватывающие 26-50% поверхности листьев. Неустойчивыми признавались растения с 6-10 баллами, при которых аналогичные пятна покрывали более 51% листовой поверхности. По результатам оценки гибридные линий условно классифицировали на три группы: устойчивые, среднеустойчивые, восприимчивые. Степень устойчивости обозначали следующими обозначениями: устойчивые линии (У), среднеустойчивые (СУ), восприимчивые (В). Интенсивность развития болезни (ИРБ, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИРБ} = \frac{\sum (a*b)}{n*9};$$

где $\sum$ (a*b) – сумма произведений числа зараженных растений на соответствующий балл пораженности, а n – число учтенных растений и штук [209]. Для заражения растений риса возбудителем пирикуляриоза необходимы определенные условия (самая основная из них – влажность) были соблюдены (рис. 29).

Полученные данные подтверждают широкий спектр устойчивости к пирикуляриозу исследованных сортов. В настоящее время в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан, включено 35 сортов риса, из которых 18 отечественной селекции. В результате фитопатологического тестирования было выявлено, что отечественные сорта риса Баканасский, Айсауле, Ару поражались пирикуляриозом на высоком уровне (индекс развития болезни, ИРБ: 55,6; 55,6 и 66,7% соответственно), а длиннозерный сорт риса Фатима являлся среднеустойчивой (ИРБ 44,4%). Данные фитопатологического теста показали, что в основном российские сорта риса устойчивые к пирикуляриозу.





а б в

Рисунок 29 – Фитопатологический скрининг образцов риса на устойчивость к пирикуляриозу в инфекционном питомнике ФНЦ риса (г. Краснодар): а – споры *M. oryzae;* б – процесс опрыскивания инокулятом; в – инфицированный лист

При искусственном заражении следов развития болезни у них не обнаружено. Они являются наиболее универсальным и пластичными сортами, что позволяет их использовать как в широком диапазоне агроэкологических условий, так и при разных технологиях выращивания. В результате исследования установлена степень устойчивости сортов и линий к *Magnaporthe oryzae* (таблица 10).

Таблица 10 – Устойчивость сортов и линий к пирикуляриозу (искусственное заражение)

Название гибридов	ИРБ, %	Степень устойчивости	Реакция сорта
1	2	3	4
F_2 Баканасский/7668 *(var. subuzbekistanica Kond.)*	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Баканасский/04470 *(var. vulgaris Koern.)*	11,1	устойчив	R
F_2 Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.)*	21,1	устойчив	R
F_2 Баканасский/7653 *(var. subjanthoseros Brsch.)*	55,6	неустойчив	S
F_2 Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)*	55,6	неустойчив	S

Продолжение Таблицы 10

1	2	3	4
F_2 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.)*	55,6	неустойчив	S
F_2 7824/Айсауле *(var. italica Alef.)*		не выросла	
F_2 7824/Айсауле *(var. subuzbekistanica Kond.)*	88,9	неустойчив	S
F_2 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*	11,1	устойчив	R
F_2 7698/Баканасский *(var. subvulgaris Brsch.)*	27,8	среднеустойчив	M
F_2 7698/Баканасский *(var. italica Alef.)*	5,6	устойчив	R
F_2 Ару/7701 *(var. vulgaris Koern.)*	38,9	среднеустойчив	M
F_2 Баканасский/0327 *(var. vulgaris Koern.)*	85,6	неустойчив	S
F_2 Айсауле/7679 *(var. subvulgaris Brsch.)*	33,3	среднеустойчив	M
F_2 7698/Айсауле *(var. italica Alef.)*		-	
F_2 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)*		-	
F_2 Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.)*	72,2	неустойчив	S
F_2 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.)*	36,7	среднеустойчив	M
F_2 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.)*	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.)*	72,2	неустойчив	S
F_2 Баканасский/7667 *(var. subjan-thoseros Brsch.)*	61,1	неустойчив	S
F_2 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.)*	38,9	среднеустойчив	M
F_2 Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.)*	72,2	неустойчив	S
F_2 Айсауле/7664 *(var. italica Alef.)*	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)*	47,8	среднеустойчив	M
F_2 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*	32,2	среднеустойчив	M
F_2 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*	5,6	устойчив	R
F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. sundensis Koern.)*	14,4	устойчив	R
F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*	38,9	среднеустойчив	M
F_2 Фатима/7695 *(var. italica Alef.)*	16,7	устойчив	R
F_2 Фатима/7695 *(var. breviaristata Vav.)*		-	
F_2 Баканасский/7683 *(var. subjanthoseros Brsch.)*		-	
F_2 7698/Ару *(var. erythroceros Koern.)*	16,7	устойчив	R

Продолжение Таблицы 10

1	2	3	4
F_2 7698/Ару *(var. suberythroseros Kan.)*	5,6	устойчив	R
F_2 Баканасский/Дон 7712	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Баканасский/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)*	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Ару/212-05 *(var. vulgaris Koern.)*	22,2	устойчив	R
F_2 Ару/7668 *(var. vulgaris Koern.)*	72,2	неустойчив	S
F_2 Айсауле/04468 *(var. italica Alef.)*	48,9	среднеустойчив	M
F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	31,1	среднеустойчив	M
F_2 Баканасский/7690 *(var. subjanthoseros Brsch.)*	11,1	устойчив	R
F_2 Баканасский/7690 *(var. vulgaris Koern.)*	22,2	устойчив	R
F_2 Баканасский/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*	33,3	среднеустойчив	M
F_2 Баканасский/04468 *(var. vulgaris Koern.)*	46,7	среднеустойчив	M
F_2 Ару/7666 *(var. suberythroseros Kan.)*	38,9	среднеустойчив	M
F_2 Фатима/7653 *(var. persica Kan.)*	68,9	неустойчив	S
F_2 Фатима/7689 *(var. italica Alef.)*	35,6	среднеустойчив	M
F_2 Ару/Дон 7712 *(var. erythroceros Koern.)*	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)*	33,3	среднеустойчив	M
F_2 Ару/Дон 7712 *(var. vulgaris Koern.)*	66,7	неустойчив	S
F_2 Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)* полуостистый	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Ару/7683 *(var. janthoceros Koern.)*	44,4	среднеустойчив	M
F_2 Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.)*	55,6	неустойчив	S
F_2 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*	34,4	среднеустойчив	M
Авангард standard	2,2	устойчив	R
Победа 65 standard	95,6	неустойчив	S
Баканасский	55,6	неустойчив	S
Фатима	44,4	среднеустойчив	M
Айсауле	55,6	неустойчив	S
Ару	66,7	неустойчив	S

По результатам фитопатологического теста гибридов F_2 разделились на три группы:

– устойчивые гибриды, ИРБ которых составляет от 5,6% до 22,2%: F_2 Баканасский/04470 (*var. vulgaris Koern.*), F_2 Баканасский/7653 (*var. subuzbekistanica Kond.*), F_2 Ару/04468 *(var. subvulgaris Brsch.)*, F_2 Айсауле/04470 *(var. italica Alef.)*, F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. sundensis Koern.)*, F_2 Фатима/7695

(var. italica Alef.), F_2 Ару/212-05 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/7690 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_2 Баканасский/7690 *(var. vulgaris Koern.);*

– средне-устойчивые гибриды, ИРБ которых составляет от 27,8% до 48,9%: F_2 Баканасский/7668 *(var. subuzbekistanica Kond.),* F_2 Ару/7701 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Айсауле/7679 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Айсауле/7689 *(var. zeravschanica Brsch.),* F_2 Ару/0327 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/7667 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Айсауле/7664 *(var. italica Alef.),* F_2 Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.),* F_2 Баканасский/Дон 7712, F_2 Баканасский/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.),* F_2 Айсауле/04468 *(var. italica Alef.),* F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/04468 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Баканасский/04468 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Ару/7666 *(var. suberythroseros Kan.),* F_2 Фатима/7689 *(var. italica Alef.),* F_2 Ару/Дон 7712 *(var. erythroceros Koern.),* F_2 Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.),* F_2 Ару/Дон 7712 *(var. Desvauxii Koern.)* полуостистый, F_2 Ару/7683 *(var. janthoceros Koern.),* F_2 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.);*

– неустойчивые гибриды, ИРБ которых составляет от 55,6% до 88,9%: F_2 Баканасский/7653 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_2 Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.),* F_2 Баканасский/7684 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Баканасский/0327 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Ару/7702 *(var. erythroceros Koern.),* F_2 Ару/0327 *(var. subpyrocarpa Alef.),* F_2 Баканасский/7667 *(var. subjanthoseros Brsch.),* F_2 Баканасский/7701 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Ару/7668 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Фатима/7653 *(var. persica Kan.),* F_2 Ару/Дон 7712 *(var. vulgaris Koern.),* F_2 Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.).*

Таким образом, результаты теста на устойчивость к пирикуляриозу показали, что исследованные отечественные сорта риса, такие как Баканасский, Айсауле и Ару показали неустойчивость, длиннозерный сорт риса Фатима являлся среднеустойчивым. Этот факт еще раз доказывает необходимость вовлечения в селекционный процесс устойчивых форм и линии риса к пирикуляриозу для создания отечественных сортов риса.

Селекция с помощью маркеров является эффективным способом повышения устойчивости риса к болезням; использование MAS позволяет определить устойчивость к болезни на генном уровне, что позволяет сократить время отбора перспективных линий. В практике селекции устойчивости к болезням сельскохозяйственных культур повторное использование одного гена в течение длительного времени может легко привести к потере устойчивости, поэтому пирамидирование генов устойчивости широкого спектра обычно рассматривается как эффективный способ решения этой проблемы. Пирамидирование нескольких генов, которое способствует расширению спектра устойчивости и повышению устойчивости сельскохозяйственных культур, является важным подходом для улучшения сортов риса.

Если в ряде научно-исследовательских центров, специализирующихся на изучении культуры риса, селекционные программы были направлены на объ-

единение нескольких генов *Pi* в одном генотипе с целью формирования долговременной устойчивости к пирикуляриозу, то в условиях ИББР нами в результате пирамидирования генов устойчивости к этому заболеванию было получено 7 гибридов. Фитопатологическая оценка пирамидированных линий показала, что среди отобранных 7 пирамидированных гибридов 1 линия не выросла в условиях инфекционного питомника. В результате из оставшихся 6 пирамидальных линий 2 линии – Баканасский/7667 *var. vulgaris* и Айсауле/7664 *var. italica* (несущие 2 гена устойчивости *Pi-1* и *Pi-ta*) и 1 линия – Айсауле/7689 *var. zeravschanica* (несущая 3 гена - *Pi-1*, *Pi-33* и *Pi-ta*) проявили умеренную устойчивость (MR) (таблица 11) [182].

Таблица 11 – Фитопатологическая оценка устойчивости к пирикуляриозу полученных пирамидированных гибридов и местных сортов риса

Сорта и гибриды	Устойчивость к пирикуляриозу			
	Интенсивность развития болезни, %	Степень устойчивости к пирикуляриозу	Гены резистентности	Реакция линий
Баканасский	55,6	восприимчивый	*Pi-2*	S
Айсауле	55,6	восприимчивый	*Pi-2*	S
Ару	66,7	восприимчивый	*Pi-2*	S
Фатима	44,4	умеренно устойчивый	-	MR
Ару/7702 *var. erythroceros*	61,1	восприимчивый	*Pi-1*, *Pi-ta*	S
Айсауле/7689 *var. zeravschanica*	36,7	умеренно устойчивый	*Pi-1*, *Pi-33*, *Pi-ta*	MR
Баканасский /7667 *var. subjanthoseros*	61,1	восприимчивый	*Pi-1*, *Pi-ta*	S
Баканасский/7667 *var. vulgaris*	38,9	умеренно устойчивый	*Pi-1*, *Pi-ta*	MR
Баканасский /7701 *var. vulgaris*	72,2	восприимчивый	*Pi-1*, *Pi-ta*	S
Айсауле/7664 *var. italica*	44,4	умеренно устойчивый	*Pi-1*, *Pi-ta*	MR

MR (medium resistance) – умеренно устойчивый, S (susceptible) – восприимчивый.

Таким образом, в результате проведенного молекулярного и фитопатологического скрининга выявлены пирамидированные линии с несколькими генами устойчивости, а также их способность противостоять пирикуляриозу в разной степени.

3.4 Получение растений-регенерантов в культуре изолированных пыльников для создания дигаплоидных растений с целью закрепления признака устойчивости к пирикуляриозу

В селекции риса применяются биотехнологические методы, способствующие повышению эффективности создания новых сортов. Для ускорения селекционного процесса используется метод гаплоидной биотехнологии, который позволяет получить стабильные растения за одно поколение. При использовании традиционных селекционных подходов формирование гомозиготных линий требует 5-7 поколений. Наиболее эффективным способом массового получения гаплоидов риса является культура изолированных пыльников и микроспор. Метод гаплоидной биотехнологии широко используется в селекции риса для ускоренного получения гомозиготных линий. Этот метод позволяет за один цикл получить полностью гомозиготные растения через андрогенез или гиногенез, минуя многолетние этапы самоопыления. Гаплоидные растения подвергаются хромосомному дублированию, после чего становятся пригодными для оценки по агрономическим признакам и последующего отбора. Использование гаплоидной технологии повышает эффективность селекции, сокращает сроки выведения новых сортов и способствует стабильной передаче ценных признаков. В частности, данный метод применяется для создания сортов, устойчивых к болезням, засухе и другим стрессовым факторам.

В настоящее время для интенсификации селекционных программ широко используется гаплоидная биотехнология, позволяющая получать гомозиготные линии. Применение гаплоидных растений в селекции имеет существенные преимущества, поскольку они содержат одинарный набор хромосом, что обеспечивает прямое проявление мутаций и облегчает их выявление. В результате полиплоидизации гаплоидов формируются гомозиготные дигаплоиды, что значительно повышает эффективность отбора по качественным и количественным признакам. При скрещивании таких гомозиготных линий получают высокопродуктивное потомство. Кроме того, гомозиготные линии широко используются в генетических исследованиях для анализа взаимодействия генов, установления групп сцепления, построения генетических карт с применением молекулярных маркеров, а также для идентификации локусов количественных признаков (QTL) [210, 211].

Селекция самоопыляющихся растений включает три ключевых этапа: создание изменчивости через традиционное скрещивание, стабилизация признаков при помощи самоопыления или беккросса на протяжении нескольких поколений и отбор желаемых рекомбинантов.

Однако данный метод все еще не получил широкого применения в практической селекции из-за низкой частоты получения зеленых растений-регенерантов. Одной из проблем, связанных с гаплоидией, является трудность получения зеленых регенерантов из длительно культивируемых каллусов. Эффективность получения гаплоидов в культуре пыльников определяется рядом

факторов, включая генотип и условия выращивания донорных растений, состав индукционной питательной среды, тип стрессовой обработки, стадию развития микроспор, а также условия культивирования пыльников in vitro. Для индукции каллусообразования пыльники риса выращивают на агаризованных или жидких питательных средах [212, 213].

Поэтому в данном исследовании был применен метод получения дигаплоидов риса в культуре пыльников. Изменчивость, возникающая при *in vitro* культивировании микроспор, позволяет достигать генетического разнообразия растений с хозяйственно-ценными признаками.

В работе по культуре пыльников *in vitro* использованы сорт селекции ИББР (Баканасский) и 49 гибридов F_2 с генами устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1, Pi-ta, Pi-33*) (таблица 12). Все донорные растения генотипов риса для культуры пыльников выращивали в оранжерее ИББР.

Таблица 12 – Генотипы, использованные в культуре пыльников

№	Генотип	Питательные среды, кол-во посаженных пыльников (шт)	
		N6-Д	N6-Б
1	2	3	4
1	F_2 Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.)*	90	90
2	F_2 Ару/Дон 7712 *(var. vulgaris Koern.)*	150	150
3	F_2 Ару/7683 *(var. janthoceros Koern.)*	60	60
4	F_2 Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.)*	120	120
5	Баканасский	330	300
6	F_2 Айсауле/Дон 7712/03-27	120	90
7	F_2 Фатима/04888 *(var. italica Alef.)*	120	120
8	F_2 Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)*	180	180
9	F_2 Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.)*	90	60
10	F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	330	–
11	F_2 Баканасский/7824 *(var. italica Alef.)*	180	–
12	F_2 Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)*	150	330
13	F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	–	240
14	F_2 Ару/7653 *(var. subvulgaris Brsch.)*	120	90
15	F_2 Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)*	330	60
16	13/1 Баканасский/03-27/7701	240	240
17	13/1 Баканасский/03-27/7701	270	240
18	F_2 Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)*	120	360
19	F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*	180	180
20	F_2 Ару/7653 *(var. subvulgaris Brsch.)*	240	240
21	F_2 7695/Айсауле *(var. nigro-apiculata Gust.)*	400	380

Продолжение Таблицы 12

1	2	3	4
22	F_2 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*	540	540
23	F_2 Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)*	690	690
24	F_2 Фатима/7698 *(var. breviaristata Vav.)*	240	210
25	F_2 Айсауле/7667 *(var. italica Alef.)*	240	240
26	F_2 Айсауле/7684 *(var. italica Alef.)*	270	270
27	F_2 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*	210	190
28	F_2 7698/Ару *(var. suberythroseros Kan.)*	240	240
29	F_2 Айсауле/7662 *(var. subvulgaris Brsch.)*	210	210
30	F_2 Баканасский/7702 *(var. vulgaris Koern.)*	160	160
31	F_2 Айсауле/7679 *(var. subvulgaris Brsch.)*	180	–
32	F_2 Айсауле/7663 *(var. italica Alef.)*	300	280
33	F_2 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)*	160	160
34	F_2 Баканасский/7695 *(var. subvulgaris Brsch.)*	200	180
35	F_2 Айсауле/7683 *(var. italica Alef.)*	200	200
36	F_2 7698/Айсауле *(var. suberythroseros Kan.)*	200	200
37	F_2 Фатима/7702 *(var. mutica Vav.)*	210	210
38	F_2 Айсауле/Дон 7712 *(var. italica Alef.)*	180	210
39	F_2 Айсауле/7686 *(var. italica Alef.)*	240	220
40	F_2 Фатима/7663 *(var. mutica Vav.)*	300	280
41	F_2 Баканасский/7695 *(var. subvulgaris Brsch.)*	220	330
42	F_2 Фатима/7689 *(var. mutica Vav.)*	220	220
43	F_2 Айсауле/04470 *(var. subvulgaris Brsch.)*	100	100
44	F_2 Фатима/212-05 *(var. pseudovialonica Vasc.)*	100	120
45	F_2 Фатима/7695 *(var. mutica Vav.)*	180	–
46	F_2 Айсауле/7667 *(var. italica Alef.)*	150	–
47	Баканасский	240	–
48	F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	100	–
49	F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	160	–
50	F_2 Ару/04636 *(var. vulgaris Koern.)*	220	–
	Итого:	9760	8980

Пыльники, содержащие микроспоры на одноядерной стадии развития, являются наиболее пригодными для индукции каллусообразования или прямой регенерации растений риса. Для проведения холодовой предобработки стебли с метелками срезали и помещали в холодильник при температуре +4 °С на период 5-7 суток. Установлено, что применение холодового стресса способствует значительному повышению частоты индукции каллусов в культуре пыльников риса.

В биотехнологии для получения максимального возможного количества регенерантов используют 3 типа сред:

1) Среда для индукции каллуса;

2) Среда для регенерации;

3) Среда для образования и развития корней [154].

В ходе экспериментов на двух вариантах среды N6 для индукции каллусогенеза было высажено 18740 пыльников. Из 50 тестированных генотипов способность к индукции каллусогенеза показали 12 генотипов (таблица 13). Частота индукции каллусогенеза была наиболее высокой у гибрида Ару/7683/7824 (5,8 %) и сорта Кубань 3 (3,3%). Средняя частота образования каллусов была у гибридов Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)* (2.7%), Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.)* (2.2%), Баканасский/7701 (1.3%), Баканасский/7702 *(var. mutica Vav.)* (1.2%) и сорта Баканасский (1,5%). Наименьшая у гибридов Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.)* (1.0%), Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)* (0.6%), Ару/7653 *(var. subvulgaris Brsch.)* (0.4%), Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)* (0.3%), Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)* (0.2%). Следует отметить, что индукция каллусогенеза наблюдалась в основном на среде N6-Д. На среде N6-Б только гибрид Ару/7683/7824 формировал каллусы с частотой 1,1%. По данным литературы известно, что способность к индукции морфогенеза in vitro, в частности каллусогенеза и регенерации обусловлены отдельными блоками генов [214, 215]. Вероятно, это обусловлено тем, что при расщеплении в F_2 поколении не все гибридные растения получили гены, ответственные за способность к каллусообразованию.

Полученные каллусы переносили на питательную среду для регенерации. Из 12 генотипов, показавших способность к образованию каллусов только у гибрида Айсауле/7712 *(var. italica Alef.)* получены зеленые регенеранты. Частота регенерации составила соответственно 5,4% и 36,3%. Полученные результаты находятся в соответствии результатами других исследований, где показана зависимость способности к регенерации во многом обуславливается генотипом [216–218] (рисунок 30).



а б в г д

а - введение в культуру и индукция каллусогенеза; б - рост каллуса; в - индукция ризогенеза; г, д - регенерация дигаплоидных растений

Рисунок 30 – Этапы морфогенеза в культуре пыльников риса.

Для цитологического анализа подсчета хромосом использовали корешки проростка дигаплоида. Материал фиксировали в утренние часы в свежеприготовленном реактиве Карнуа (в соотношении 3 этанол:1 ЛУК), промывали в этиловом спирте несколько раз, окрашивали 2% растворе ацетокармина [219].

В практике для преодоления стерильности гаплоидные регенеранты переводят в диплоидный уровень колхицинированием или продолжительным культивированием меристем гаплоидных регенерантов на дедифференцирующей среде (метод зачаточных метелок или стеблевых узлов). В наших исследованиях был применен метод зачаточных метелок. В некоторых случаях при переносе на дедифференцирующую среду наряду с диплоидными регенерантами могут возникать также тетраплоиды или анеуплоиды. Для подтверждения плоидности полученного дигаплоида сорта Айсауле проведен цитологический анализ в сравнении с исходным сортом. Микроскопический анализ на плоидность подтвердил диплоидный набор хромосом (2n=24) у дигаплоида Айсауле/7668 *(var. italica Alef)*. Фотографии цитогенетических исследовании представлены в Приложении К.



Рисунок 31 – Дигаплоидные регенеранты гибрида Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)*

Установлено, что полученные дигаплоидная линия превышала по ряду хозяйственно-ценных признаков исходный гибрид. Так, дигаплоидная линия ДГ Айсауле/7668 *(var. italica Alef),* превосходил исходный гибрид Айсауле/7668 *(var. italica Alef)* по показателям: кустистость в 3 раза, количество зерновок с главной метелки в 1,2 раза; масса зерна с главной метелки в 1,3 раза, масса зерен с 1-го растения в 3,3 (таблица 14).

Таблица 14 – Оценка дигаплоидных регенерантных гибридов по структурному анализу

Линии	Кустистость, шт	Кол-во зерновок с гл. метелки, шт	Масса зерна с гл. метелки, г.	Масса зерен с 1 раст., г.
Айсауле/7668 *(var. italica Alef)* (Исходная линия)	2,0±0,0	84,0±13,1	1,6±0,4	2,7±0,6
ДГ-1 Айсауле/7668 *(var. italica Alef)*	6,0±0,5	103,0±13,8	2,13±0,02	10,82±1,5

Таблица 13 – Каллусогенез у сортов и F_2 гибридов риса

№	Генотип	Питательные среды					
		N6-Д			N6-Б		
		Кол-во пыльников	Кол-во каллусов	% Каллусогенеза	Кол-во пыльников	Кол-во каллусов	% Каллусогенеза
2	Баканасский	330	5	1.5	300	–	–
3	Ару/7683/7824	120	7	5.8	90	1	1.1
4	Баканасский/7684 *(var. subvulgaris Brsch.)*	180	5	2.7	180	–	–
5	Баканасский/7653 *(var. subuzbekistanica Kond.)*	90	2	2.2	90	–	–
6	Баканасский/03-27/7701	510	7	1.3	480	–	–
7	Баканасский/7702 *(var. mutica Vav.)*	160	2	1.2	160	–	–
8	Ару/7683 *(var. vulgaris Koern.)*	90	1	1.0	90	–	–
9	Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)*	330	2	0.6	60	–	–
10	Ару/7653 *(var. subvulgaris Brsch.)*	240	1	0.4	240	–	–
11	Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)*	690	2	0.3	690	–	–
12	Айсауле/7664 *(var. subvulgaris Brsch.)*	690	2	0.2	690	–	–

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что оптимальной для индукции каллусогенеза в культуре пыльников испытанных генотипов является среда N6 содержащая 9 г/л мальтозы, 7 г/л агара, 20 мг/л гистидина, 200 мг/л глутамина, 2 мг/л 2,4-Д. Наиболее отзывчивой к индукции процессов морфогенеза и регенерации является линия Айсауле/7668 *(var. italica Alef).*

Полученные дигаплоидные гибриды превосходят исходные гибриды по хозяйственно-ценным признакам (кустистость, количество зерновок с главной метелки, масса зерна с главной метелки, масса зерен с 1-го растения). Выделен дигаплоидный гибрид Айсауле/7668 *(var. italica Alef)* несущая 2 гена (*Pi-1* и *Pi-ta*) резистентности к *Magnaporthe oryzae* перспективная для вовлечения в селекционный процесс по созданию устойчивых к пирикуляриозу форм риса.

3.5 Анализ элементов структуры урожая перспективных гибридов F_2 -F_3 поколении

Исследование внутривидового разнообразия риса дает возможность выявить ключевые параметры, на основе которых отбираются генотипы, наиболее соответствующие селекционным и производственным требованиям конкретного рисосеющего региона [220]. У риса описано более 400 генов и их аллелей, которые контролируют около 150 различных количественных и качественных признаков. Полученные в результате гибридизации гибриды и родительские формы, выращенные в полевых условиях Алматинской области, изучали по следующим наиболее важным хозяйственно-ценным признакам: кустистость, высота растений, длина метелки, длина флагового листа, количество колосков с главной метелки, пустозерность, масса зерна с растения, масса 1000 зерен, диаметр стебля и т.д.

Гибридный материал F_2 и F_3 поколений классифицированы на разновидности риса *Oryza sativa* L. согласно А.Г. Ляховкину [221]. Наблюдается расщепление гибридов в F_2 и F_3 поколений по разновидностям, отличающихся морфологическими признаками: наличием или отсутствием остей, цветом и формой остей, окраской цветковых пленок и голой зерновки и др. Представлены результаты структурного анализа гибридов риса поколения F_2 по нескольким важным признакам, влияющим на урожайность и устойчивость растений.

Анализ структурных компонентов продуктивности гибридов на материнской основе сорта риса ***Айсауле*** выявил значительный генетический потенциал данной группы, реализующийся преимущественно через механизмы положительного гетерозиса. Установлено, что большинство гибридных комбинаций второго поколения (в частности, Н-02-F_2 7824/Айсауле (*var. subuzbekistanica Kond.*) и Н-06-F_2 Айсауле/7663 (*var. italica Alef.*)) достоверно превосходят материнскую форму по количеству зерновок с метелки, достигая максимума в 156 шт. при 108 шт. у контроля. При этом селекционная ценность образца Н-05-F_2 Айсауле/04470 (*var. subvulgaris Brsch.*) подтверждается оптимальным сочетанием крупнозерности, унаследованной от отцовской линии 04470, и высокой вы-

полненности соцветия, что обеспечило лидирующие позиции по массе зерна с главной метелки (3,4 г). Важным аспектом является существенное снижение уровня пустозерности у гибридов Н-04-F_2 Айсауле/04470 (var. italica Alef.), Н-05-F_2 Айсауле/04470 (*var. subvulgaris Brsch.*) и Н-10-F_2 Айсауле/Дон 7712 (*var. sundensis Koern.*) (менее 10%) по сравнению с высокостерильными родительскими формами 7689 и 7664, что указывает на трансгрессивное наследование признаков фертильности. Итоговая продуктивность растений в данной группе во многом детерминирована потенциалом отцовского компонента 7698, обеспечивающего наиболее высокие показатели общей массы зерна, что в сочетании со стабильностью гибрида Н-04-F_2 Айсауле/04470 (*var. italica Alef.)* позволяет выделить данные направления как приоритетные для дальнейшего отбора». Данные по статистическому анализу boxplot представлены в Приложении А.

Сравнительная оценка гибридных комбинаций на фоне материнского сорта ***Ару*** выявила существенный вклад отцовских компонентов в формирование структуры урожая потомства F_2. В отличие от родительских форм 7702 и 7666, характеризующихся низкой озерненностью и высокой пустозерностью (медиана до 28%), большинство гибридов (в частности Н-13-F_2 Ару/04468 (*var. subvulgaris Brsch.*), Н-15-F_2 Ару/7666 (*var. suberythroseros Kan.*), Н-17-F_2 Ару/Дон 7712 (*var. Desvauxii Koern.*)) продемонстрировали положительную трансгрессию по количеству зерновок с метелки, достигая значений 130-140 шт. Особую селекционную ценность представляет отцовская форма 03-27, которая стабильно передает потомству высокую массу 1000 зерен (медиана 33,5 г). Интегральный показатель массы зерна с главной метелки достиг максимума у комбинации Н-13-F_2 Ару/04468 (*var. subvulgaris Brsch.*) (3,5 г), что обусловлено эффектом высокой озерненности и низкой пустозерности (около 16%). Характерно, что сорт Ару проявляет себя как мощный донор общей продуктивности: медианная масса зерна с растения у материнской формы (11,3 г) превосходит показатели всех ее гибридов, что указывает на депрессивный характер расщепления данного признака в F_2 или на высокую специфическую комбинационную способность (СКС) сорта в чистом виде. При этом минимальный уровень пустозерности у гибрида Н-14-F_2 Ару/04636 (*var. vulgaris Koern.*) на фоне высокой стабильности признака (минимальный межквартильный размах – IQR (Interquartile Range)) позволяет рассматривать данную линию как наиболее генетически уравновешенную для дальнейшего отбора». Данные по статистическому анализу boxplot представлены в Приложении Б.

Анализ структурных компонентов продуктивности гибридов F_2 поколения на материнской основе сорта ***Баканасский*** (гибриды Н-19-Н-27) выявил значительный размах вариабельности, обусловленный генетическим разнообразием отцовских форм. Установлено, что гибрид Н-23-F_2 Баканасский/7684 (*var. subvulgaris Brsch.*) демонстрирует максимальный потенциал озерненности, достигая показателей свыше 200 зерновок на метелку, что в сочетании с высокой массой зерна с метелки (4,4 г) выделяет его как наиболее продуктивный гено-

тип в данной группе. Влияние отцовской линии Дон 7712 в комбинации Н-24-F_2 Баканасский/7701 (*var. vulgaris Koern.*) обеспечило формирование наиболее крупного зерна (масса 1000 зерен – 34,5 г) при относительно низком уровне варьирования данного признака. Особого внимания заслуживает гибрид Н-22-F_2 Баканасский/7683 (*var. subjanthoseros Brsch.*), который, несмотря на средние показатели продуктивности, проявил наивысшую фертильность (пустозерность менее 10%), что контрастирует с линиями Н-20-F_2 Баканасский/7667 (*var. vulgaris Koern.*) и Н-27-F_2 7698/Баканасский (*var. subvulgaris Brsch.*), где зафиксирован высокий уровень стерильности (до 35-40%). Общая продуктивность растений в этой группе достигает пиковых значений у гибридов Н-23-F_2 Баканасский/7684 (*var. subvulgaris Brsch.*) и Н-24-F_2 Баканасский/7701 (*var. vulgaris Koern.*) (9,0-9,5 г), что подтверждает высокую комбинационную способность сорта Баканасский при создании высокоурожайных форм риса.

Закономерности формирования структуры урожайности и корреляционная сопряженность признаков. В результате проведенного корреляционного анализа по методу Пирсона была установлена сложная иерархическая зависимость между морфометрическими параметрами вегетативной сферы и показателями продуктивности изучаемых генотипов. Анализ полной корреляционной матрицы позволил выявить ключевые биологические детерминанты, определяющие потенциал валового сбора зерна.

Морфогенетическая сопряженность параметров габитуса и метелки. Установлено наличие сильных положительных связей в блоке признаков, отвечающих за архитектонику растения. Длина метелки (TR.03) находится в тесной корреляционной зависимости от высоты растения (TR.02, $r = 0,75$) и длины флагового листа (TR.04, $r = 0,81$). Данный факт свидетельствует о морфогенетическом единстве развития осевых органов и ассимиляционной поверхности, где флаговый лист выступает основным донором пластических веществ для формирования репродуктивных органов.

Факторный анализ продуктивности растения и побега. Интегральный показатель массы зерна с растения (TR.09) формируется за счет двух равнозначных векторов:

– Интенсивности побегообразования: выявлена высокая связь с кустистостью (TR.01, $r = 0,69$).

– Мощности главного побега: значимая корреляция с длиной метелки (TR.03, $r = 0,65$) и массой зерна с нее (TR.08, $r = 0,62$).

– Примечательно, что продуктивность главной метелки (TR.08) на 76% (коэффициент детерминации $R^2 = 0,76$) обусловлена количеством зерен в ней (TR.06, $r = 0,87$), что делает данный признак приоритетным при отборе на высокую озерненность.

Биологические антагонизмы и лимитирующие факторы. Исследование выявило критические отрицательные корреляции, отражающие физиологические компромиссы в распределении ресурсов растения. Масса 1000 зерен

(TR.10) находится в обратной зависимости от ширины флагового листа (TR.05, *r* = -0,57 и количества зерен на метелке (TR.06, *r* = -0,48). Это указывает на доминирование экстенсивной стратегии продуктивности в изученном материале: увеличение числа репродуктивных единиц ведет к закономерному снижению их индивидуальной выполненности (массы налива). Слабая связь пустозерности (TR.07) с основными компонентами урожая подтверждает, что в данных условиях бесплодие колосков не является генетически детерминированным ограничением (рис. 32).

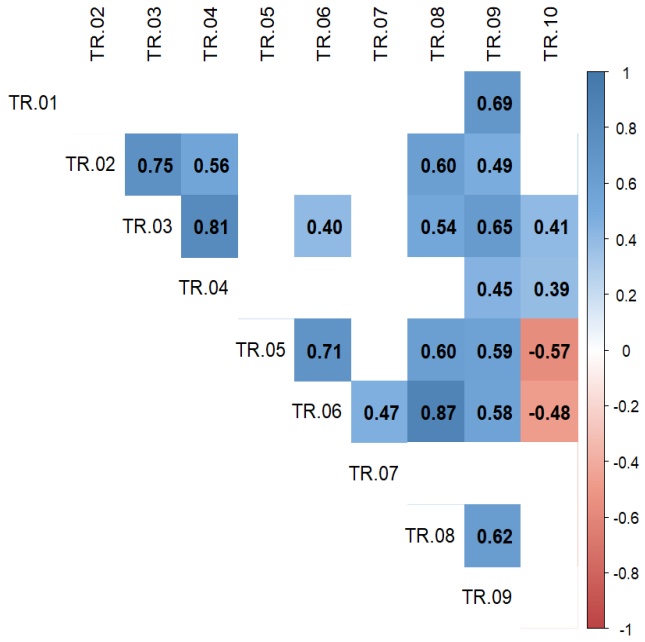


Рисунок 32. Корреляционный анализ по Пирсону между главными признаками продуктивности гибридов поколения F_2

Примечание: TR-01 – Кустистость, шт; TR-02 – Высота растений, см; TR-03 – Длина метелки, см; TR-04 – Длина флаг. листа, см; TR-05 – Ширина флаг. листа, см; TR-06 – Количество зерен с гл. метелки, шт; TR-07 – Пустозерность; TR-08 – Масса зерна с гл. метелки, г; TR-09 – Масса зерна с 1 раст., г; TR-10 – Масса 1000 зерен, г.

Таким образом, наиболее эффективными критериями косвенного отбора на продуктивность являются длина метелки и длина флагового листа в сочетании с оптимальным коэффициентом кустистости. Однако селекционная стратегия должна быть направлена на преодоление выявленного антагонизма между озерненностью (TR.06) и крупностью зерна (TR.10) путем поиска трансгрессивных генотипов, способных поддерживать высокую массу 1000 зерен при максимальной плотности метелки.

Комплексный мониторинг структурных параметров продуктивности в поколении F_3 на фоне материнского сорта Айсауле свидетельствует о процессах формообразовательной стабилизации ряда гибридных линий. В отличие от F_2, в данной популяции зафиксировано существенное снижение варьирования признака "масса зерна с одного растения" у гибридов Н-04-F_3 Айсауле/7689 (*var. zeravschanica Brsch.*) и Н-05-F_3 Айсауле/Дон7712 (*var. italica Alef.*), что подтверждается сужением межквартильного размаха (IQR) и указывает на повышение гомозиготности семей. Особого внимания заслуживает гибрид Н-03-F_3 Айсауле/7663 (*var. italica Alef.*), проявивший максимальную массу зерна с главной метелки (свыше 3,0 г) за счет высокой выполненности соцветия, несмотря на средние показатели озерненности. Влияние отцовского компонента 04470 продолжает отчетливо доминировать в наследовании крупнозерности, обеспечивая стабильное преимущество по массе 1000 зерен (32-34 г) в семьях Н-01-F_3 Айсауле/04470 (*var. italica Alef.*). Показатели пустозерности в F_3 демонстрируют положительную динамику: линии Н-02-F_3 Айсауле/04470 (*var. subvulgaris Brsch.*) и Н-05-F_3 Айсауле/Дон7712 (*var. italica Alef.*) сохраняют высокий уровень фертильности (пустозерность менее 12%), в то время как гибрид Н-04-F_3 Айсауле/7689 (*var. zeravschanica Brsch.*), несмотря на высокую озерненность, проявил значительный разброс по степени стерильности цветков, что требует дальнейшего бракеража нестабильных форм. В целом, поколение F_3 подтверждает селекционную ценность комбинации с линией Дон 7712, обеспечивающей сбалансированную продуктивность и выравненность потомства». Данные по статистическому анализу boxplot представлены в Приложении Г.

Изучение структурных компонентов урожайности в поколении F_3 на фоне материнского генотипа Ару выявило отчетливую тенденцию к консолидации признаков у ограниченного числа перспективных гибридов (Н-11-F_3 Ару/7666 (*var. erythroceros Koern.*), Н-12-F3 Ару/7666 (*var. italica Alef.*), Н-13-F_3 Ару/7666 (*var. vulgaris Koern.*)). В отличие от расщепляющихся популяций прошлых поколений, гибрид Н-13-F_3 Ару/7666 (*var. vulgaris Koern.*) в третьем поколении подтвердил свой статус лидера по числу зерновок с главной метелки (медиана около 150 шт.), демонстрируя при этом высокую выравненность признака (узкий IQR). Влияние отцовской формы 03-27 обеспечило сохранение высоких показателей крупнозерности у гибрида Н-12-F_3 Ару/7666 (*var. italica Alef.*), масса 1000 зерен которого достигла максимума в данной группе (35-37 г), что свидетельствует о положительной трансгрессии относительно обоих родителей. Особо следует отметить гибрид Н-13-F_3 Ару/7666 (*var. vulgaris Koern.*), который за счет синергии высокой озерненности и крайне низкого уровня пустозерности (стабильно менее 10-12%) обеспечил наибольший выход зерна с метелки (3,5 г). Хотя по общей массе зерна с растения гибриды все еще не превосходят высокопродуктивный материнский сорт Ару, линия Н-13-F_3 Ару/7666 (*var. vulgaris Koern.*) проявила наилучшую адаптивную способность, сочетая продуктивность соцветия с минимальным разбросом значений стерильности». Данные по статистическому анализу boxplot представлены в Приложении Д.

Комплексный анализ гибридов поколения F_3, полученных на основе материнской формы Баканасский, подтвердил статус данной группы как наиболее высокопродуктивной по числу зерновок. Установлено, что гибрид Н-23-F_3 Баканасский/7668 (*var. italica Alef.*) сохраняет экстремально высокую озерненность (медиана свыше 200 шт.) и максимальную массу зерна с главной метелки (4,3-4,5 г), что свидетельствует о закреплении мощного потенциала продуктивности в третьем поколении. Влияние отцовского компонента Дон 7712 наиболее отчетливо проявилось в линии Н-24-F_3 Баканасский/7668 (*var. uzbekistanica Ukl.*), которая обеспечила стабильную крупнозерность (масса 1000 зерен 33-34 г) и высокую выравненность (минимальный IQR) по данному признаку. Анализ фертильности показал, что гибриды Н-22-F_3 Баканасский/7668 (*var. erythroceros Koern.*) и Н-14-F_3 Баканасский/7667 (*var. italica Alef.*) характеризуются наиболее низким уровнем пустозерности (менее 12%), в то время как у лидера по озерненности (Н-23-F_3 Баканасский/7668 (*var. italica Alef.*)) сохраняется существенный разброс значений стерильности, что указывает на продолжающееся формообразовательное расщепление. По общей продуктивности растения (масса зерна 8,5-10,0 г.) лидирующие позиции занимают семьи Н-23-F_3 Баканасский/7668 (*var. italica Alef.*) и Н-18-F_3 Баканасский/7667 (*var. vulgaris Koern.*), в то время как линии Н-15-F_3 Баканасский/7667 (*var. janthoceros Koern.*) и Н-20-F_3 Баканасский/7689 (*var. erythroceros Koern.*) демонстрируют частичную депрессию признаков урожайности на данном этапе селекции». Данные по статистическому анализу boxplot представлены в Приложении Е.

Оценка гибридной комбинации Н-25-F_3 Фатима/7689 (*var. mutica Vav.*), полученной на основе материнской формы Фатима, в поколении F_3 свидетельствует о специфическом характере наследования признаков продуктивности. Данный гибрид характеризуется умеренной озерненностью (медиана около 115-120 шт.), сопоставимой с показателями материнской формы, однако превосходит её по массе 1000 зерен, которая стабилизировалась на уровне 32,5 г. Особого внимания заслуживает высокая фертильность данной комбинации: уровень пустозерности у Н-25-F_3 Фатима/7689 (*var. mutica Vav.*) является одним из самых низких в опыте (менее 10%) и отличается исключительной выравненностью (минимальный IQR). По массе зерна с главной метелки (около 2,8-3,0 г.) и общей продуктивности растения гибрид демонстрирует средние значения, что указывает на сбалансированный тип развития без выраженного гетерозисного скачка, но с высокой степенью генетической стабильности, унаследованной от родительских форм». Данные по статистическому анализу boxplot представлены в Приложении Ж.

Сравнительный анализ корреляционных связей в расщепляющейся популяции гибридов F_3. В поколении F_3 структура корреляционных плеяд претерпевает определенную трансформацию, обусловленную генетическим расщеплением и фиксацией новых комбинаций количественных признаков. Анализ полной и сокращенной матриц (рис. 33) позволяет выделить специфику формирования урожайности на данном этапе селекционного процесса.

Стабильность морфометрических зависимостей. В вегетативном блоке сохраняется высокая степень сопряженности параметров, хотя наблюдается некоторое снижение коэффициентов по сравнению с F_2. Связь между высотой растения (TR.02) и длиной метелки (TR.03) остается на умеренном уровне (r = 0,44), так же, как и корреляция высоты с массой зерна главной метелки (TR.08, r = 0,54). Это подтверждает устойчивость ростовых процессов как фундаментальной базы для формирования продуктивности в последующих поколениях.

Трансформация структуры продуктивности в F_3. Наиболее значимые изменения зафиксированы в блоке признаков, определяющих мощность главного побега:

- Доминирование озерненности: сохраняется жесткая детерминация продуктивности метелки (TR.08) числом зерен (TR.06), при этом коэффициент корреляции достигает r = 0,80.
- Автономия общей урожайности: в поколении F_3 связь между массой зерна с растения (TR.09) и кустистостью (TR.01) существенно ослабевает (r = 0,30), равно как и связь с параметрами главной метелки. Это указывает на возрастающую роль межлинейной конкуренции и экологической пластичности в реализации потенциала урожайности целого растения (рис. 33).

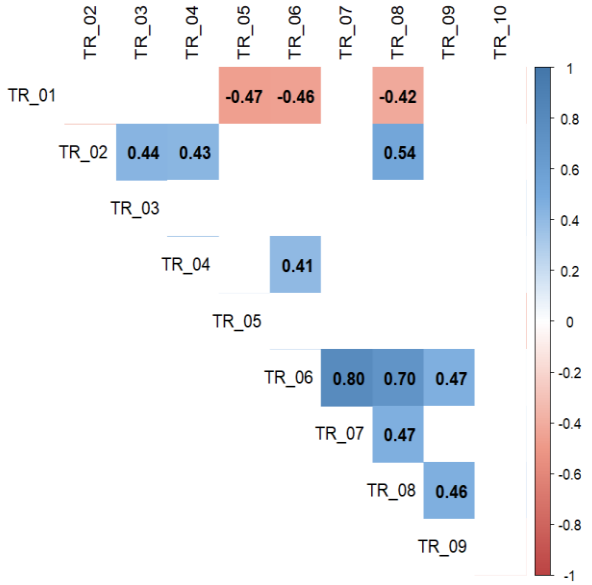


Рисунок 33. Корреляционный анализ по Пирсону между главными признаками продуктивности гибридов поколения F_3

Примечание: TR-01 – Кустистость, шт; TR-02 – Высота растений, см; TR-03 – Длина метелки, см; TR-04 – Длина флаг. листа, см; TR-05 – Ширина флаг. листа, см; TR-06 – Количество зерен с гл. метелки, шт; TR-07 – Пустозерность; TR-08 – Масса зерна с гл. метелки, г; TR-09 – Масса зерна с 1 раст., г; TR-10 – Масса 1000 зерен, г.

Специфика антагонистических связей. Отрицательные корреляции, связанные с массой 1000 зерен (TR.10), в поколении F_3 становятся менее выраженными или статистически незначимыми (связь TR.06 с TR.10 снижается до уровня r = 0,01, TR.05 с TR.10 до r = - 0,29). С одной стороны, это свидетельствует о частичном разрыве нежелательных связей (break of linkage disequilibrium), что открывает возможности для отбора генотипов, сочетающих многозерность с крупнозерностью. С другой стороны, наблюдается усиление отрицательного влияния кустистости (TR.01) на ширину листа (r = - 0,47) и количество зерен в метелке (r = - 0,46), что отражает конкуренцию между побегами за ресурсы внутри растения (рис. 33).

Таким образом, для поколения F_3 характерно усиление влияния пустозерности (TR.07) на продуктивность метелки (r = 0,47), что делает данный признак важным критерием браковки на ранних этапах. Ослабление жестких отрицательных корреляций между числом и массой семян в F_3 является благоприятным селекционным фактором, позволяющим проводить более эффективный индивидуальный отбор высокопродуктивных элитных растений, сочетающих оптимальные параметры структуры урожая. Анализируемые гибриды демонстрируют значительное варьирование по исследуемым признакам, что позволяет выделить перспективные генотипы для дальнейшей селекционной работы.

Оценка продуктивности была создана из 6 отобранных гибридов риса (Ару/7702 *var. erythroceros*, Баканасский/7667 *var. subjanthoseros*, Баканасский/7667 *var. vulgaris*, Баканасский/7701 *var. vulgaris*, Айсауле/7664 *var. italica*, Айсауле/7689 *var. zeravschanica*) путем анализа элементов структуры урожайности. Линии оценивались по основному признаку продуктивности, такому как «масса 1000 семян, г». Дисперсионный анализ показал, что пирамидированные гибриды уступают стандарту по характеристике урожайности, поскольку между группами наблюдалась значительная разница, p-значение <0,001.

Таблица 15 – Анализ продуктивности пирамидированных гибридов риса с помощью однофакторного дисперсионного анализа

Масса 1000 зерен, г						
	SS	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between	367.12	6	61.19*	27.07	0.00	3.25
Within	97.18	43	2.26			
Масса зерна с одного растения, г						
Between	323.13	6	53.86*	38.93	0.00	3.25
Within	59.48	43	1.38			
Масса зерна с главной метелки, г						
Between	16.38	6	2.73*	15.39	0.00	3.25
Within	7.62	43	0.18			
Количество зерновок с главной метелки, шт.						
Between	23154.91	6	3859.15*	77.17	0.00	3.25
Within	2150.31	43	50.01			

Следует учитывать, что это гибриды F_2 поколения.

Таким образом, проведенная оценка селекционного материала риса (F_2-F_3 гибриды) по основным хозяйственно-ценным признакам позволяет отобрать наиболее перспективные линии риса. Выявленные в ходе исследования суперэлитные селекционные образцы будут служить исходным материалом для дальнейшего размножения в селекции риса на устойчивость к пирикуляриозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

Проведён скрининг 35 сортообразцов риса отечественной и зарубежной селекции на наличие генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* с использованием молекулярно-генетического подхода (молекулярное маркирование). В результате выделены сорта-доноры генов резистентности *Pi-1*, *Pi-ta*, *Pi-2*, *Pi-40*, *Piz-t* и *Pi-54*, контролирующих устойчивость к возбудителю пирикуляриоза. Сорта-дифференциаторы использовали для введения и пирамидирования генов устойчивости в высокопродуктивные казахстанские сорта риса. На основе введения и пирамидирования генов резистентности к *Magnaporthe oryzae* в высокопродуктивные районированные в Казахстане сорта риса получены 54 гибридные потомства $F_{1-3.}$

Отобраны 27 перспективных гибридов риса F_2, несущих гены резистентности к *Magnaporthe oryzae* с помощью MAS. Среди них 7 гибридов являются пирамидированными: 6 гибридов (7698/Айсауле var. *suberythroseros* Kan., Ару/7702 var. *erythroceros* Koern., Баканасский/7667 var. *subjanthoseros* Brsch., Баканасский/7667 var. *vulgaris* Koern., Баканасский/7701 var. *vulgaris* Koern., Айсауле/7664 var. *italica* Alef.) содержат 2 гена устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1* и *Pi-ta*), 1 гибрид Айсауле/7689 var. *zeravschanica* Brsch содержат 3 гена устойчивости к пирикуляриозу (*Pi-1, Pi-33* и *Pi-ta),* 16 гибридов F_3 содержат 1 ген резистентности (*Pi-1).*

Фитопатологическая оценка гибридов показала, что среди пирамидированных гибридов: 2 гибрида – Баканасский/7667 *var. vulgaris* и Айсауле/7664 *var. italica*, несущие 2 гена устойчивости *Pi-1* и *Pi-ta* и 1 гибрид – Айсауле/7689 *var. zeravschanica*, несущая 3 гена – *Pi-1*, *Pi-33* и *Pi-ta*, проявили умеренную устойчивость. Создан председекционный материал из перспективных гибридов–прототипов отечественных сортов риса, характеризующийся высокой урожайностью и повышенной резистентностью к казахстанской популяции *Magnaporthe oryzae*.

Получена дигаплоидная линия F_2 Айсауле/7668 *(var. italica Alef)* несущая 2 гена (*Pi-1* и *Pi-ta*) резистентности к *Magnaporthe oryzae* перспективная для вовлечения в селекционный процесс по созданию устойчивых к пирикуляриозу форм риса.

Статистический анализ показал, что пирамидированный гибрид Н-23-F_3 Баканасский/7668 (*var. italica Alef.*) несущий гены устойчивости *Pi-40* и *Pi-54*; обладает высокой озерненностью (свыше 200 шт.); гибрид Н-13-F_3 Ару/7666 (*var. vulgaris Koern.*), несущий гены устойчивости *Pi-1* и *Pi-54* обладает высокой озерненностью (свыше 140 шт.) и крайне низким уровнем пустозерности (менее 10-12%); гибрид Н-05-F3 Айсауле/Дон7712 (*var. italica Alef.*) несущий гены устойчивости *Pi-40* и *Pi-54* обладает высокой выполненностью соцветия (массе зерна с главной метелки 3.4 г).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao P. и др. Identification of Elite R-Gene Combinations against Blast Disease in Geng Rice Varieties // Int J Mol Sci. 2023. Т. 24, № 4. С. 3984.
2. Liu M. и др. Genome- wide association study identifies an NLR gene that confers partial resistance to Magnaporthe oryzae in rice // Plant Biotechnol J. 2020. Т. 18, № 6. С. 1376–1383.
3. Sharma S. K. и др. Recent Insights in Rice Blast Disease Resistance. 2021. С. 89–123.
4. Chen Q. и др. Evaluation of Rice Blast Resistance and R Gene Analysis in Japonica Rice Varieties Tested in the Anhui Region // Agronomy. 2025. Т. 15, № 5. С. 1008.
5. Рсалиев А. С. и др. Мофолого-культуральные особенности роста гриба Pyricularia oryzae на агаризованных питательных средах // Новости науки Казахстана. 2015. Т. 3, № 125. С. 97–110.
6. Mohapatra P. K., Sahu B. B. Panicle Architecture of Rice and its Relationship with Grain Filling. Cham: Springer International Publishing, 2022. 27–48 с.
7. Костылев П. И. Методы селекции, семеноводства и сортовой агротехники риса. Ростов н/Д: Книга, 2011. 288 с.
8. Li H. и др. ChinaRiceCalendar – seasonal crop calendars for early-, middle-, and late-season rice in China // Earth Syst Sci Data. 2024. Т. 16, № 4. С. 1689–1701.
9. Ramadhani F. и др. Mapping a cloud-free rice growth stages using the integration of proba-v and sentinel-1 and its temporal correlation with sub-district statistics // Remote Sens (Basel). MDPI AG, 2021. Т. 13, № 8.
10. Counce P. A., Moldenhauer K. A. K. Morphology of Rice Seed Development and Its Influence on Grain Quality. 2019. С. 57–74.
11. Ye Z. и др. Estimation of rice seedling growth traits with an end-to-end multi-objective deep learning framework // Front Plant Sci. 2023. Т. 14.
12. Khan F. и др. Phosphorus Plays Key Roles in Regulating Plants' Physiological Responses to Abiotic Stresses // Plants. 2023. Т. 12, № 15. С. 2861.
13. Shi Y. и др. Effects of chilling at different growth stages on rice photosynthesis, plant growth, and yield // Environ Exp Bot. 2022. Т. 203. С. 105045.
14. Mohapatra P. K. и др. Tillering Behavior of Rice Plant. Singapore: Springer Nature Singapore, 2025. 105–139 с.
15. Sheng R. T. C. и др. Rice Growth Stage Classification via RF-Based Machine Learning and Image Processing // Agriculture (Switzerland). MDPI, 2022. Т. 12, № 12.
16. Nawaz A., Farooq M. Rice Physiology // Rice Production Worldwide. Cham: Springer International Publishing, 2017. С. 455–485.
17. Qin J. и др. Deep-Learning-Based Rice Phenological Stage Recognition // Remote Sens (Basel). 2023. Т. 15, № 11. С. 2891.

18. Dunand R. Rice growth and development. Handbook. 5/14 Rev / под ред. Saichuk J. Louisiana: Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, 2014.
19. Parida A. K. и др. Effect of Panicle Morphology on Grain Filling and Rice Yield: Genetic Control and Molecular Regulation // Front Genet. 2022. Т. 13.
20. Ma K., Zhou Y. Physiological and biochemical mechanisms of taste decrease in high tasting japonica rice under warming at growth stages // Sci Rep. 2025. Т. 15, № 1. С. 17316.
21. Tan S. и др. Machine Learning Approaches for Rice Seedling Growth Stages Detection // Front Plant Sci. 2022. Т. 13.
22. Mohapatra P. K., Sahu B. B. Genetic Analyses of Floral Development on Rice Panicle // Panicle Architecture of Rice and its Relationship with Grain Filling. Cham: Springer International Publishing, 2022. С. 97–106.
23. Cai W. и др. Rice Growth-Stage Recognition Based on Improved YOLOv8 with UAV Imagery // Agronomy. 2024. Т. 14, № 12. С. 2751.
24. Mohapatra P. K., Sahu B. B. Fertilization and Seed Development in Rice // Panicle Architecture of Rice and its Relationship with Grain Filling. Cham: Springer International Publishing, 2022. С. 63–86.
25. Liu K. и др. A Lightweight Recognition Method for Rice Growth Period Based on Improved YOLOv5s // Sensors. 2023. Т. 23, № 15. С. 6738.
26. Mohapatra P. K., Sahu B. B. Panicle Architecture of Rice and its Relationship with Grain Filling. Cham: Springer International Publishing, 2022. 1–25 с.
27. Cherlinka V. Rice Growth Stages: Roadmap Of Timely Crop Management [Электронный ресурс] // EOS Data Analytics, Inc. 2024.
28. Lu Y., Xu Y., Li N. Early Domestication History of Asian Rice Revealed by Mutations and Genome-Wide Analysis of Gene Genealogies // Rice. 2022. Т. 15, № 1. С. 11.
29. Cheng C. и др. Polyphyletic Origin of Cultivated Rice: Based on the Interspersion Pattern of SINEs // Mol Biol Evol. 2003. Т. 20, № 1. С. 67–75.
30. Londo J. P. и др. Phylogeography of Asian wild rice, Oryza rufipogon, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, Oryza sativa // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. Т. 103, № 25. С. 9578–9583.
31. Rakshit S. и др. Large-scale DNA polymorphism study of Oryza sativa and O. rufipogon reveals the origin and divergence of Asian rice // Theoretical and Applied Genetics. 2007. Т. 114, № 4. С. 731–743.
32. Fuller D. Q. Agricultural Origins and Frontiers in South Asia: A Working Synthesis // J World Prehist. 2006. Т. 20, № 1. С. 1–86.
33. Gao L., Innan H. Nonindependent Domestication of the Two Rice Subspecies, Oryza sativa ssp. indica and ssp. japonica, Demonstrated by Multilocus Microsatellites // Genetics. 2008. Т. 179, № 2. С. 965–976.
34. Molina J. и др. Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011. Т. 108, № 20. С. 8351–8356.

35. Huang X. и др. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice // Nature. 2012. Т. 490, № 7421. С. 497–501.
36. Yang C. -c. и др. Independent Domestication of Asian Rice Followed by Gene Flow from japonica to indica // Mol Biol Evol. 2012. Т. 29, № 5. С. 1471–1479.
37. Choi J. Y. и др. The rice paradox: Multiple origins but single domestication in Asian rice // Mol Biol Evol. 2017. С. msx049.
38. Li W. и др. Molecular Evolution of Rice Blast Resistance Gene bsr-d1 // Rice Sci. 2024. Т. 31, № 6. С. 700–711.
39. Tagliapietra B.L., Soares C.F., Clerici M. T. P. S. Rice (*Oryza sativa* L.) and its products for human consumption: general characteristics, nutritional properties, and types of processing // Food Science and Technology. 2024. Т. 44.
40. Shahbandeh M. Leading countries based on the production of milled rice in 2022/2023 (in million metric tons) [Электронный ресурс] // Statistica. 2024.
41. Abeysekara I., Rathnayake I. Global Trends in Rice Production, Consumption and Trade // SSRN Electronic Journal. 2024.
42. Taw P. и др. Healthy Rice Consumption Behaviour in Nay. Thailand, 2024. 16 с.
43. Mohapatra P. K., Sahu B. B. Importance of Rice as Human Food // Panicle Architecture of Rice and its Relationship with Grain Filling. Cham: Springer International Publishing, 2022. С. 1–25.
44. Samal P. и др. The global rice agriculture towards 2050: An inter-continental perspective // Outlook Agric. 2022. Т. 51, № 2. С. 164–172.
45. Shahbandeh M. World production volume of milled rice from 2008/2009 to 2024/25 (in million metric tons) [Электронный ресурс] // Statista. 2025.
46. Eckardt N. A. Sequencing the Rice Genome // Plant Cell. 2000. Т. 12, № 11. С. 2011–2017.
47. Garris A. J. и др. Genetic Structure and Diversity in Oryza sativa L. // Genetics. 2005. Т. 169, № 3. С. 1631–1638.
48. Song S. и др. Rice Genomics: Over the Past Two Decades and into the Future // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2018. Т. 16, № 6. С. 397–404.
49. Devanna B. N. и др. Understanding the Dynamics of Blast Resistance in Rice-*Magnaporthe oryzae* Interactions // Journal of Fungi. 2022. Т. 8, № 6. С. 584.
50. Rice Genomics, Genetics and Breeding / под ред. Sasaki T., Ashikari M. Singapore: Springer Singapore, 2018. 12 с.
51. Wing R. A., Purugganan M. D., Zhang Q. The rice genome revolution: from an ancient grain to Green Super Rice // Nat Rev Genet. 2018. Т. 19, № 8. С. 505–517.
52. Sharma T. R. и др. Rice Blast Management Through Host-Plant Resistance: Retrospect and Prospects // Agricultural Research. 2012. Т. 1, № 1. С. 37–52.
53. Kaundal R., Kapoor A. S., Raghava G. P. Machine learning techniques in disease forecasting: a case study on rice blast prediction // BMC Bioinformatics. 2006. Т. 7, № 1. С. 1–16.
54. Wang X. и др. Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease // Rice - Germplasm, Genetics and Improvement. InTech, 2014. С. 195–217.
55. Kato H. Rice blast disease // Pesticide Outlook. 2001. Т. 12, № 1. С. 23–25.

56. Gnanamanickam S. S. Rice and Its Importance to Human Life // Biological Control of Rice Diseases. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. С. 1–11.
57. Mukund Variar M. V. Pathogenic variation in <i>Magnaporthe grisea<i> and breeding for blast resistance in India. // A differential system for blast resistance for stable rice production environment. Proceedings of a workshop, Los Baños, Philippines, 29 August 2006 / под ред. Fukuta Y., Vera Cruz C. M., Kobayashi N. Japan, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 2007. С. 87–95.
58. Койшыбаев М. Болезни риса в Казахстане. Защита и карантин растений / (12). 2013. С. 34–35.
59. Жакибаева М. О главной сельскохозяйственной культуре региона [Электронный ресурс] // Kzvesti.kz ақпараттық агенттігі. 2021.
60. Dean R. и др. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology // Mol Plant Pathol. 2012. Т. 13, № 4. С. 414–430.
61. Wilson R. A. Magnaporthe oryzae // Trends Microbiol. 2021. Т. 29, № 7. С. 663–664.
62. Wilson R. A., Talbot N. J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by Magnaporthe oryzae // Nat Rev Microbiol. 2009. Т. 7, № 3. С. 185–195.
63. Baudin M. и др. Pyricularia oryzae: Lab star and field scourge // Mol Plant Pathol. 2024. Т. 25, № 4.
64. Eseola A. B. и др. Investigating the cell and developmental biology of plant infection by the rice blast fungus Magnaporthe oryzae // Fungal Genetics and Biology. 2021. Т. 154. С. 103562.
65. Tan J. и др. The Devastating Rice Blast Airborne Pathogen Magnaporthe oryzae-A Review on Genes Studied with Mutant Analysis // Pathogens. 2023. Т. 12, № 3. С. 379.
66. Мынбаева Д. О. и др. Пирикуляриоз риса и методы борьбы // Bulletin of the Karaganda University “Biology medicine geography Series”. 2023. Т. 109, № 1. С. 98–109.
67. Van Der Plank J. E. Plant Diseases: Epidemics and Control. revised. Elsevier, ISBN 1483262138, 9781483262130, 2013. 366 с.
68. Motoyama T., Yun C.-S., Osada H. Biosynthesis and biological function of secondary metabolites of the rice blast fungus Pyricularia oryzae // J Ind Microbiol Biotechnol. 2021. Т. 48, № 9–10.
69. Mentlak T. A. и др. Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by Magnaporthe oryzae Is Necessary for Rice Blast Disease // Plant Cell. 2012. Т. 24, № 1. С. 322–335.
70. Yang C. и др. Binding of the Magnaporthe oryzae Chitinase MoChia1 by a Rice Tetratricopeptide Repeat Protein Allows Free Chitin to Trigger Immune Responses // Plant Cell. 2019. Т. 31, № 1. С. 172–188.
71. Kim S. и др. Two nuclear effectors of the rice blast fungus modulate host immunity via transcriptional reprogramming // Nat Commun. 2020. Т. 11, № 1. С. 5845.

72. Wang B., Ebbole D. J., Wang Z. The arms race between Magnaporthe oryzae and rice: Diversity and interaction of Avr and R genes // J Integr Agric. 2017. Т. 16, № 12. С. 2746–2760.
73. Césari S. и др. The <scp>NB</scp> - <scp>LRR</scp> proteins <scp>RGA</scp> 4 and <scp>RGA</scp> 5 interact functionally and physically to confer disease resistance // EMBO J. 2014. Т. 33, № 17. С. 1941–1959.
74. Devanna N. B., Vijayan J., Sharma T. R. The Blast Resistance Gene Pi54of Cloned from Oryza officinalis Interacts with Avr-Pi54 through Its Novel Non-LRR Domains // PLoS One. 2014. Т. 9, № 8. С. e104840.
75. Li W. и др. Recent advances in broad-spectrum resistance to the rice blast disease // Curr Opin Plant Biol. 2019. Т. 50. С. 114–120.
76. Dai Y. и др. Diversification and evolution of the avirulence gene AVR-Pita1 in field isolates of Magnaporthe oryzae // Fungal Genetics and Biology. 2010. Т. 47, № 12. С. 973–980.
77. Jin Y. и др. Correction: Jin et al. Resistance Spectrum Analysis and Breeding Utilization of Rice Blast Resistance Gene Pigm-1. Plants 2025, 14, 535 // Plants. 2025. Т. 14, № 21. С. 3313.
78. Wang L. и др. Large-scale identification and functional analysis of NLR genes in blast resistance in the Tetep rice genome sequence // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019. Т. 116, № 37. С. 18479–18487.
79. Sallaud C. и др. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy // Theoretical and Applied Genetics. 2003. Т. 106, № 5. С. 794–803.
80. Koizumi S. Durability of resistance to rice blast disease // JIRCAS Work. Rep. 2007. Т. 53. С. 1–10.
81. Lin F. и др. The Blast Resistance Gene Pi37 Encodes a Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat Protein and Is a Member of a Resistance Gene Cluster on Rice Chromosome 1 // Genetics. 2007. Т. 177, № 3. С. 1871–1880.
82. Imbe T., Matsumoto S. Inheritance of resistance of rice varieties to the blast fungus strains virulent to the variety «Reiho». // Japanese Journal of Breeding. 1985. Т. 35, № 3. С. 332–339.
83. Zhu X. и др. Differentiation ability of monogenic lines to <i>Magnaporthe grisea<i> in indica rice // Acta Phytopathol Sin. 2004. Т. 34. С. 361–368.
84. Lei C. L. и др. Molecular mapping of a blast resistance gene in an indica rice cultivar Yanxian No. 1 // Rice Genet. Newsl. 2005. Т. 22. С. 76–77.
85. Wang Z. и др. The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine- rich repeat class of plant disease resistance genes // The Plant Journal. 1999. Т. 19, № 1. С. 55–64.
86. Wu K.-S., Tanksley S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice // Mol Gen Genet. 1993. Т. 241–241, № 1–2. С. 225–235.
87. Pan Q. H., Tanisaka T., Ikehashi H. Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice VII. Gene analysis for the blast resistance of Indian native cultivar, Aus 373 // Breed Sci. 1997. Т. 47, № (Suppl. 1). С. 35.

88. Naqvi N. I. и др. Identification of RAPD markers linked to a major blast resistance gene in rice // Molecular Breeding. 1995. Т. 1, № 4. С. 341–348.
89. Ahn S. N. и др. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast // Rice Genet. Newsl. 1996. Т. 13. С. 74–76.
90. Hayashi K., Yoshida H., Ashikawa I. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes // Theoretical and Applied Genetics. 2006. Т. 113, № 2. С. 251–260.
91. Qu S. и др. The Broad-Spectrum Blast Resistance Gene Pi9 Encodes a Nucleotide-Binding Site–Leucine-Rich Repeat Protein and Is a Member of a Multigene Family in Rice // Genetics. 2006. Т. 172, № 3. С. 1901–1914.
92. Pan Q. и др. Identification of a New Blast Resistance Gene in the indica Rice Cultivar Kasalath Using Japanese Differential Cultivars and Isozyme Markers // Phytopathology. 1996. Т. 86, № 10. С. 1071–1075.
93. Mackill D. J. Inheritance of Blast Resistance in Near-Isogenic Lines of Rice // Phytopathology. 1992. Т. 82, № 7. С. 746.
94. Chen X. и др. A B- lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance // The Plant Journal. 2006. Т. 46, № 5. С. 794–804.
95. Deng Y. и др. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus Pigm(t) tightly linked to Pi2 and Pi9 in a broad-spectrum resistant Chinese variety // Theoretical and Applied Genetics. 2006. Т. 113, № 4. С. 705–713.
96. Causse M. A. и др. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. // Genetics. 1994. Т. 138, № 4. С. 1251–1274.
97. Wang G. L. и др. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. // Genetics. 1994. Т. 136, № 4. С. 1421–1434.
98. Zenbayashi K. и др. Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32 // Theoretical and Applied Genetics. 2002. Т. 104, № 4. С. 547–552.
99. Gowda M., Roy- Barman S., Chattoo B. B. Molecular mapping of a novel blast resistance gene Pi38 in rice using SSLP and AFLP markers // Plant Breeding. 2006. Т. 125, № 6. С. 596–599.
100. Fujii K. и др. Genetical mapping based on the RFLP analysis for the panicle blast resistance derived from a rice parental line St. No. 1 // Breed. Sci. 1995. Т. 45, № Suppl. 1. С. 209.
101. Fujii K. и др. Identification of a RFLP Marker Tightly Linked to the Panicle Blast Resistance Gene, Pb1, in Rice. // Breed Sci. 2000. Т. 50, № 3. С. 183–188.
102. Chen D.-H. и др. Molecular mapping of the blast resistance gene, Pi44(t), in a line derived from a durably resistant rice cultivar // Theoretical and Applied Genetics. 1999. Т. 98, № 6–7. С. 1046–1053.
103. Sharma T. R. и др. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the Pi-k h gene of rice, which confers resistance to Magnaporthe grisea // Molecular Genetics and Genomics. 2005. Т. 274, № 6. С. 569–578.

104. Hittalmani S. и др. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice // Theoretical and Applied Genetics. 2000. Т. 100, № 7. С. 1121–1128.
105. Li L.-Y. и др. The Pik m gene, conferring stable resistance to isolates of Magnaporthe oryzae, was finely mapped in a crossover-cold region on rice chromosome 11 // Molecular Breeding. 2007. Т. 20, № 2. С. 179–188.
106. Hayasaka H. и др. RFLP mapping of a rice blast resistance gene Pi-k // Breed Sci. 1996. Т. 46, № Suppl. 2. С. 68.
107. Fjellstrom R. и др. Development of DNA Markers Suitable for Marker Assisted Selection of Three Pi Genes Conferring Resistance to Multiple Pyricularia grisea Pathotypes // Crop Sci. 2004. Т. 44, № 5. С. 1790–1798.
108. Goto I. Genetic Studies on the Resistance of Rice Plant to the Blast Fungus // Japanese Journal of Phytopathology. 1970. Т. 36, № 5. С. 304–312.
109. Goto I. Genetic studies on resistance of rice plant to blast fungus. II. Difference in resistance to the blast disease between fukunishiki and its parental cultivar, Zenith. // Japanese Journal of Phytopathology. 1976. Т. 42, № 3. С. 253–260.
110. Ahn S. N. и др. Mapping of genes conferring resistance to Korean isolates of rice blast fungus using DNA markers // Korean J. Breed. 1997. Т. 29. С. 416–423.
111. Tabien R. E. и др. Blast resistance genes from Teqing and Lemont. In Rice Genetics III: (In 2 Parts) // World Scientific: Singapore. 1996. С. 451–455.
112. Tabien R. и др. Mapping QTLs for field resistance to the rice blast pathogen and evaluating their individual and combined utility in improved varieties // Theoretical and Applied Genetics. 2002. Т. 105, № 2. С. 313–324.
113. Inukai T. и др. Genetic analysis of blast resistance in tropical rice cultivars using near-isogenic lines. In Rice Genetics III: (In 2 Parts) // World Scientific: Singapore. 1996. С. 447–450.
114. Nakamura S. и др. Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene Pi-ta2 using a highly representative rice BAC library // Mol Gen Genet. 1997. Т. 254, № 6. С. 611–620.
115. Iwata N. Registration of new gene symbols // Rice Genet. Newsl. 1996. Т. 13. С. 12–18.
116. Ashkani S. и др. Molecular progress on the mapping and cloning of functional genes for blast disease in rice (Oryza sativa L.): current status and future considerations // Crit Rev Biotechnol. 2016. Т. 36, № 2. С. 353–367.
117. Liu H. и др. NBS-LRR Protein Pik-H4 Interacts with OsBIHD1 to Balance Rice Blast Resistance and Growth by Coordinating Ethylene-Brassinosteroid Pathway // Front Plant Sci. 2017. Т. 8.
118. Kang S. G. и др. Rice Lesion Mimic Mutants (LMM): The Current Understanding of Genetic Mutations in the Failure of ROS Scavenging during Lesion Formation // Plants. 2021. Т. 10, № 8. С. 1598.
119. Rai A. K. и др. Functional complementation of rice blast resistance gene Pi-kh (Pi54) conferring resistance to diverse strains of Magnaporthe oryzae // J Plant Biochem Biotechnol. 2011. Т. 20, № 1. С. 55–65.

120. Singh J. и др. Blast resistance gene Pi54 over-expressed in rice to understand its cellular and sub-cellular localization and response to different pathogens // Sci Rep. 2020. Т. 10, № 1. С. 5243.
121. Kumari A. и др. Mining of rice blast resistance gene Pi54 shows effect of single nucleotide polymorphisms on phenotypic expression of the alleles // Eur J Plant Pathol. 2013. Т. 137, № 1. С. 55–65.
122. Sarkar C. и др. Variation in the LRR region of Pi54 protein alters its interaction with the AvrPi54 protein revealed by in silico analysis // PLoS One. 2019. Т. 14, № 11. С. e0224088.
123. Lieberherr D. и др. A Sphingolipid Elicitor-Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase Is Regulated by the Small GTPase OsRac1 and Heterotrimeric G-Protein in Rice //Plant Physiol. 2005. Т. 138, № 3. С. 1644–1652.
124. Arora K. и др. Deciphering the role of microRNAs during Pi54 gene mediated Magnaporthe oryzae resistance response in rice // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2021. Т. 27, № 3. С. 633–647.
125. Singh P. K. и др. Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen avirulence genes in rice-Magnaporthe oryzae pathosystem // Fungal Genetics and Biology. 2018. Т. 115. С. 9–19.
126. Kearsey D. M., Pooni D. H. Genetical Analysis of Quantitative Traits. Garland Science, 2020.
127. Lopez J. Mapping QTL controlling durable resistance to rice blast in the cultivar Oryzica Llanos 5. 2006.
128. Zenbayashi-Sawata K., Ashizawa T., Koizumi S. Pi34-AVRPi34: A new gene-for-gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by Magnaporthe grisea // Journal of General Plant Pathology. 2005. Т. 71, № 6. С. 395–401.
129. Latif M. A. и др. Microsatellite and minisatellite markers based DNA fingerprinting and genetic diversity of blast and ufra resistant genotypes // C R Biol. 2011. Т. 334, № 4. С. 282–289.
130. Kou Y., Wang S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance // Curr Opin Plant Biol. 2010. Т. 13, № 2. С. 181–185.
131. Devi S. J. S. R. и др. Identification and Characterization of a Large Effect QTL from Oryza glumaepatula Revealed Pi68(t) as Putative Candidate Gene for Rice Blast Resistance // Rice. 2020. Т. 13, № 1. С. 17.
132. Zhao H. и др. The rice blast resistance gene Ptr encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance // Nat Commun. 2018. Т. 9, № 1. С. 2039.
133. Wang J. и др. A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice // Cell Res. 2019. Т. 29, № 10. С. 820–831.
134. Li Y. и др. Dynamic QTL analysis for rice blast resistance under natural infection conditions // Australian Journal of Crop Science Southern Cross Journals©. 2008. Т. 2, № 2. С. 73–82.
135. Puri K. D. и др. Leaf and neck blast resistance reaction in tropical rice lines under green house condition // Euphytica. 2009. Т. 165, № 3. С. 523.

136. Kumar V. и др. Understanding Rice-Magnaporthe Oryzae Interaction in Resistant and Susceptible Cultivars of Rice under Panicle Blast Infection Using a Time-Course Transcriptome Analysis // Genes (Basel). 2021. Т. 12, № 2. С. 301.
137. Noenplab A. и др. QTL mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali105 and Jao Horn Nin recombinant inbred lines // ScienceAsia. Science Society of Thailand under Royal Patronage, 2006. Т. 32, № 2. С. 133–142.
138. Hayashi N. и др. Durable panicle blast-resistance gene Pb1 encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication // The Plant Journal. 2010. Т. 64, № 3. С. 498–510.
139. Kalia S., Rathour R. Current status on mapping of genes for resistance to leaf- and neck-blast disease in rice // 3 Biotech. 2019. Т. 9, № 6. С. 209.
140. Zhuang J.-Y. и др. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice // Euphytica. 2002. Т. 128, № 3. С. 363–370.
141. Khanna A. и др. Development and evaluation of near-isogenic lines for major blast resistance gene(s) in Basmati rice // Theoretical and Applied Genetics. 2015. Т. 128, № 7. С. 1243–1259.
142. Nguyet N. T. M. и др. Diversity and Distribution of Rice Blast (Pyricularia oryzae Cavara) Races in Vietnam // Plant Dis. 2020. Т. 104, № 2. С. 381–387.
143. Lantos C. и др. Development of In Vitro Anther Culture for Doubled Haploid Plant Production in Indica Rice (Oryza sativa L.) Genotypes // Plants. 2023. Т. 12, № 9. С. 1774.
144. Pattnaik S. и др. Anther Culture Efficiency in Quality Hybrid Rice: A Comparison between Hybrid Rice and Its Ratooned Plants // Plants. 2020. Т. 9, № 10. С. 1306.
145. Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture // Proc Jpn Acad. 1968. Т. 44, № 6. С. 554–557.
146. Hooghvorst I. и др. Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2018. Т. 134, № 2. С. 205–215.
147. Doubled Haploid Technology / под ред. Segui-Simarro J. M. New York, NY: Springer US, 2021. Т. 2287.
148. Tripathy K. S. и др. Elucidation of the genetic basis of anther culture response and its breeding perspective in rice // European Journal of Biotechnology and Bioscience. 2018. Т. 6, № 2. С. 26–30.
149. Goncharova Y. K., Vereshchagina S. A., Gontcharov S. V. nutrient media for double haploid production in anther culture of rice hybrids//Original Research Article Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology. 2019. Т. 20, № 24. С. 1215–1223.
150. Kapusi E. и др. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants // Plant Mol Biol. 2013. Т. 81, № 1–2. С. 149–160.

151. Fan Y. и др. Using QTL mapping to investigate the relationships between abiotic stress tolerance (drought and salinity) and agronomic and physiological traits // BMC Genomics. 2015. Т. 16, № 1. С. 43.
152. Tripathy Swapan K. и др. Marker aided selection of double haploids for drought tolerance in upland rice // Frontiers of rice research for improving productivity, profitability and climate resilience. Cuttack, India: 3rd ARRW Int. symposium—2018, 2018. С. 159.
153. Jiang G. H. и др. The genetic basis of stay-green in rice analyzed in a population of doubled haploid lines derived from an indica by japonica cross // Theoretical and Applied Genetics. 2004. Т. 108, № 4. С. 688–698.
154. Гончарова Ю. К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. Краснодар: ВНИИ риса, 2012. 57 с.
155. Mishra R., Rao G. J. N. In-vitro Androgenesis in Rice: Advantages, Constraints and Future Prospects // Rice Sci. 2016. Т. 23, № 2. С. 57–68.
156. Батурин С. О., Амброс Е. В. Изменчивость в агамоспермном потомстве крупноплодной земляники [FBAGAB/AX ANANASSA DUCH.) по фертильности пыльцы // Научные ведомости. Серия Естественные науки. 2011. Т. 9 (104), № 15/1. С. 204–209.
157. Usenbekov B. и др. Creation of rice doubled haploids with low amylose content using in vitro anther culture // Brazilian Journal of Biology. 2024. Т. 84.
158. Chang S. и др. Architectural and Physiological Features to Gain High Yield in an Elite Rice Line YLY1 // Rice. 2020. Т. 13, № 1. С. 60.
159. Zeng D. и др. Rational design of high-yield and superior-quality rice // Nat Plants. 2017. Т. 3, № 4. С. 17031.
160. Huang M. и др. Relationship Between Grain Yield and Yield Components in Super Hybrid Rice // Agric Sci China. 2011. Т. 10, № 10. С. 1537–1544.
161. Mo Z. и др. Shading during the grain filling period increases 2-acetyl-1-pyrroline content in fragrant rice // Rice. 2015. Т. 8, № 1. С. 9.
162. Liu K. и др. Radiation Use Efficiency and Source- Sink Changes of Super Hybrid Rice under Shade Stress during Grain- Filling Stage // Agron J. 2019. Т. 111, № 4. С. 1788–1798.
163. Zhang Y. и др. Yield potential and radiation use efficiency of “super” hybrid rice grown under subtropical conditions // Field Crops Res. 2009. Т. 114, № 1. С. 91–98.
164. Ao H. и др. Study on yield stability and dry matter characteristics of super hybrid rice // Scientia Agricultura Sinica. 2008. Т. 41. С. 1927–1936.
165. Huang L. и др. Responses of candidate green super rice and super hybrid rice varieties to simplified and reduced input practice // Field Crops Res. 2018. Т. 218. С. 78–87.
166. Zhao H. и др. Relationships between grain yield and agronomic traits of rice in southern China // Chil J Agric Res. 2020. Т. 80, № 1. С. 72–79.

167. Williams C. E., Ronald P. C. PCR template-DNA isolated quickly from monocot and dicot leaves without tissue homogenization // Nucleic Acids Res. 1994. Т. 22, № 10. С. 1917–1918.
168. Roy B., Surje D. T. Specific Characteristics Features of Farmers' Varieties of Rice (Oryza sativa L.) for Testing of Distinctiveness // Indian Journal of Plant Genetic Resources. 2016. Т. 29, № 2. С. 163.
169. Pak D. и др. Management of rice blast (Pyricularia oryzae): implications of alternative hosts // Eur J Plant Pathol. 2021. Т. 161, № 2. С. 343–355.
170. Dubina E. и др. The Use of DNA Markers in Rice Breeding for Blast Resistance and Submergence Tolerance as a Weed Control Factor // Plants. 2025. Т. 14, № 12. С. 1815.
171. Kostylev P. I. и др. Combination of rice blast resistance genes in the genotypes of russian rice varieties with the use of marker assisted selection // Ecological genetics. 2017. Т. 15, № 3. С. 54–63.
172. Об утверждении Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан, и Перечня перспективных сортов сельскохозяйственных растений: 434 // Приказ Министра сельского хозяйства. Республика Казахстан: https://adilet.zan.kz/rus/docs/V1600013099, 2016.
173. Рис посевной Баканасский: пат. №533. Зарегистрировано в Государственном реестре селекционных достижений РК, 2015.
174. ТОО «Казахский НИИ рисоводства им. И. Жахаева». Рис сорт АйСауле [Электронный ресурс]. 2015.
175. ТОО «Казахский НИИ рисоводства им. И. Жахаева». Рис сорт Фатима [Электронный ресурс] // ТОО «Казахский НИИ рисоводства им. И. Жахаева».
176. Лось Г. Д. Методика гибридизации риса // Рисоводство. 2007. Т. 10. С. 42–50.
177. Yu J. и др. A Draft Sequence of the Rice Genome (Oryza sativa L. ssp. indica) // Science (1979). 2002. Т. 296, № 5565. С. 79–92.
178. Hua L. и др. The isolation of Pi1, an allele at the Pik locus which confers broad spectrum resistance to rice blast // Theoretical and Applied Genetics. 2012. Т. 125, № 5. С. 1047–1055.
179. Sahu P. K. и др. Advancement in the Breeding, Biotechnological and Genomic Tools towards Development of Durable Genetic Resistance against the Rice Blast Disease // Plants. 2022. Т. 11, № 18. С. 2386.
180. Berruyer R. и др. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1 // Theoretical and Applied Genetics. 2003. Т. 107, № 6. С. 1139–1147.
181. Jia Y. и др. Natural Variation at the Pi-ta Rice Blast Resistance Locus // Phytopathology. 2003. Т. 93, № 11. С. 1452–1459.
182. Dana M. и др. Enhancing Rice Blast Resistance through Gene Pyramiding and Marker-Assisted Selection: Implications for Sustainable Agriculture and Environmental Impact // ES Energy & Environment. 2024.

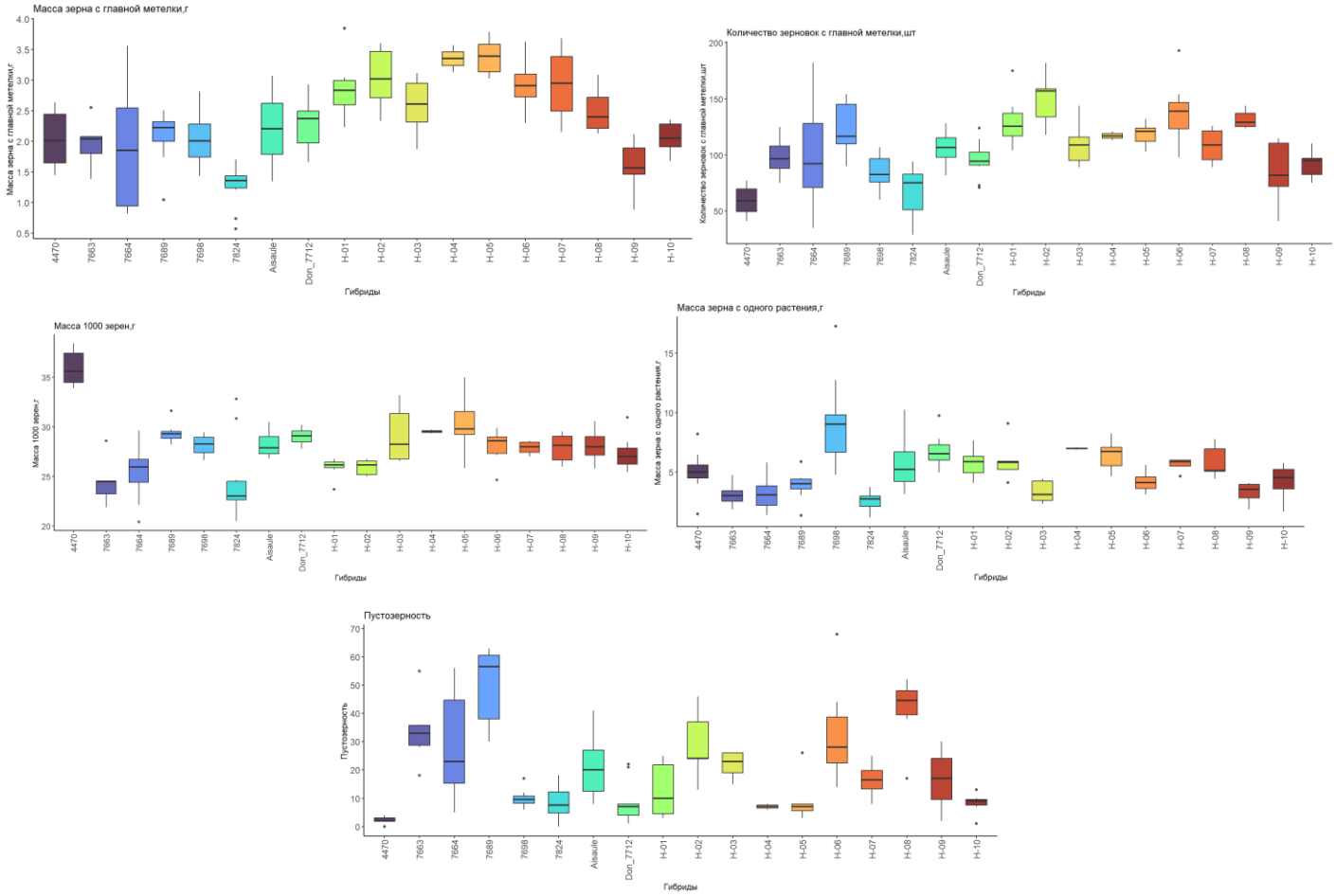
183. Peng P. и др. Pyramiding of Multiple Genes to Improve Rice Blast Resistance of Photo-Thermo Sensitive Male Sterile Line, without Yield Penalty in Hybrid Rice Production // Plants. 2023. Т. 12, № 6. С. 1389.
184. Ospanova A. и др. Molecular screening for the presence of Magnaporthe oryzae resistance Pi-b gene in rice hybrids // BIO Web Conf. 2024. Т. 100. С. 03012.
185. Jiang H. и др. Development and evaluation of improved lines with broad-spectrum resistance to rice blast using nine resistance genes // Rice. 2019. Т. 12, № 1. С. 29.
186. Jain P. и др. Deciphering signalling network in broad spectrum Near Isogenic Lines of rice resistant to Magnaporthe oryzae // Sci Rep. 2019. Т. 9, № 1. С. 16939.
187. Haque M. A. и др. Recent Advances in Rice Varietal Development for Durable Resistance to Biotic and Abiotic Stresses through Marker-Assisted Gene Pyramiding // Sustainability. 2021. Т. 13, № 19. С. 10806.
188. Ning X., Yunyu W., Aihong L. Strategy for Use of Rice Blast Resistance Genes in Rice Molecular Breeding // Rice Sci. 2020. Т. 27, № 4. С. 263–277.
189. Ramalingam J. и др. Improvement of Stable Restorer Lines for Blast Resistance through Functional Marker in Rice (Oryza sativa L.) // Genes (Basel). 2020. Т. 11, № 11. С. 1266.
190. Amirova A. и др. Selection of rice breeding lines for resistance to biotic and abiotic stresses // Brazilian Journal of Biology. 2024. Т. 84.
191. Dubina E. и др. Rice Breeding in Russia Using Genetic Markers // Plants. 2020. Т. 9, № 11. С. 1580.
192. Nizolli V. O., Pegoraro C., Oliveira A. C. de. Rice blast: strategies and challenges for improving genetic resistance // Crop Breeding and Applied Biotechnology. 2021. Т. 21, № spe.
193. Mrozik W. и др. Environmental impacts, pollution sources and pathways of spent lithium-ion batteries // Energy Environ Sci. 2021. Т. 14, № 12. С. 6099–6121.
194. Izah S. C. и др. Integrating the One Health Approach and Statistical Analysis for Sustainable Aquatic Ecosystem Management and Trace Metal Contamination Mitigation // ES Food & Agroforestry. 2023.
195. Liu Z. и др. Recent Progress in Rice Broad-Spectrum Disease Resistance // Int J Mol Sci. 2021. Т. 22, № 21. С. 11658.
196. Ji Z. и др. Pyramiding blast, bacterial blight and brown planthopper resistance genes in rice restorer lines // J Integr Agric. 2016. Т. 15, № 7. С. 1432–1440.
197. Hasan N. и др. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2021. Т. 19, № 1. С. 128.
198. Wang X. и др. Development of New Rice (Oryza. sativa L.) Breeding Lines through Marker-Assisted Introgression and Pyramiding of Brown Planthopper, Blast, Bacterial Leaf Blight Resistance, and Aroma Genes // Agronomy. 2021. Т. 11, № 12. С. 2525.

199. Nguyen T. T. и др. Identification of a Saltol-Independent Salinity Tolerance Polymorphism in Rice Mekong Delta Landraces and Characterization of a Promising Line, Doc Phung // Rice. 2022. Т. 15, № 1. С. 65.
200. Yessimova O. и др. Wetting ability of a phytopreparation and their associates with polyelectrolytes // Rasayan Journal of chemistry. 2020. Т. 13, № 01. С. 481–487.
201. Abdiyev K. Zh. и др. Flocculating properties of 2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid-co-allylamine polyampholytic copolymers // Polymer Bulletin. 2022. Т. 79, № 12. С. 10741–10756.
202. Aetov A. U. и др. Oxidation of Phenol and Acetone in a Model Water Flow in Continuous Mode at High Pressure // Eurasian Chemico-Technological Journal. 2024. Т. 26, № 1. С. 21–27.
203. Rahman G. и др. Phytoremediation of Heavy Metals from Soil and their Effects on Plant Physiology - A Review // ES Materials & Manufacturing. 2024.
204. Kassenova Z. и др. Bioremediation of Oil-Polluted Soils Using Humic Substances and Microorganisms // ES Food & Agroforestry. 2024.
205. Jeung J. U. и др. A novel gene, Pi40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice // Theoretical and Applied Genetics. 2007. Т. 115, № 8. С. 1163–1177.
206. Vasudevan K., Gruissem W., Bhullar N. K. Identification of novel alleles of the rice blast resistance gene Pi54 // Sci Rep. 2015. Т. 5, № 1. С. 15678.
207. Ballini E. и др. A Genome-Wide Meta-Analysis of Rice Blast Resistance Genes and Quantitative Trait Loci Provides New Insights into Partial and Complete Resistance // Molecular Plant-Microbe Interactions®. 2008. Т. 21, № 7. С. 859–868.
208. Коваленко Е. Д. и др. Методические указания по оценке устойчвости сортов риса к возбудителю пирикуляриоза // М.: ВАСХНИЛ. 1988. С. 30.
209. Standardization evaluation system for rice // IRRI. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 2013. Т. 1099, № 5: 18.
210. Forster, B. P. and Thomas, W. T. B. Doubled Haploids in Genetics and Plant Breeding // Plant Breeding Reviews. - 2005. - V.25. - P.57-88.
211. Jana Murovec and Borut Bohanec Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding // Plant Breeding. - 2012. - V.12. - P.352.
212. Puspasree Puhan, Ebrahimali Abubacker Siddiq. Protocol optimization and evaluation of rice varieties response to in vitro regeneration // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013 - V.4. - P.647-653.
213. Bishnoi R.K., Jain K.R., Gupta V.K. Chowdhury & J.B. Chowdhury. High frequency androgenesis in indica × Basmati rice hybrids using liquid culture media // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. - 2000. - V.61. - P.153-159.
214. Dunwell J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // Plant Biotechnol J. 2010. Т. 8, № 4. С. 377-424.
215. Germanà M. A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding // Plant Cell Rep. 2011. Т. 30, № 5. С. 839–857.

216. Tripathy S. K. и др. Exploring factors affecting anther culture in rice (Oryza sativa L.) // J Appl Biol Biotechnol. Open Science Publishers LLP Inc., 2019. Т. 7, № 2. С. 87–92.
217. Sandaruvini P. L. P. S., Ratnasekera D. Anther culture performances of selected < em> Indica rice varieties in Sri Lanka: ability of callus induction and plant regeneration // Tropical Agricultural Research and Extension. 2022. Т. 25, № 3. С. 311.
218. Sun B. и др. Unveiling the Genetic Basis Underlying Rice Anther Culturability via Segregation Distortion Analysis in Doubled Haploid Population // Genes (Basel). 2023. Т. 14, № 11. С. 2086.
219. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. Естественные науки.
220. Коротенко Т.Л., Чухирь И.Н., Хорина Т.А., Петрухненко А.А. Генетическое разнообразие коллекции риса и аспекты его использования в почвенно-климатических условиях Кубанской зоны рисосеяния // Труды Кубанского государственного аграрного университета. - 2017. - № 66. - С.131-137.
221. Ляховкин А. Г. Рис. – 2005.

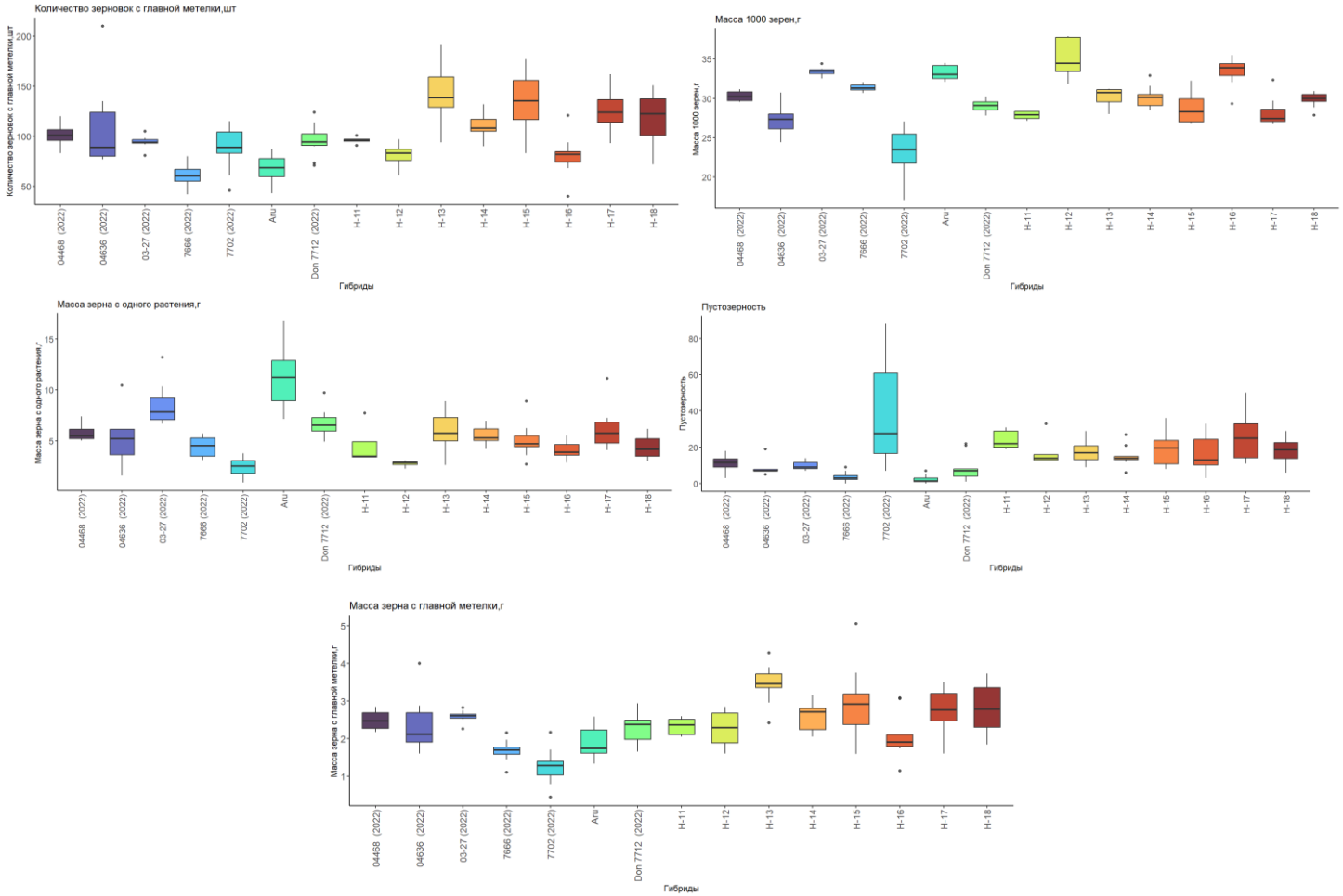
Приложение А

Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_2 по материнской форме Айсауле



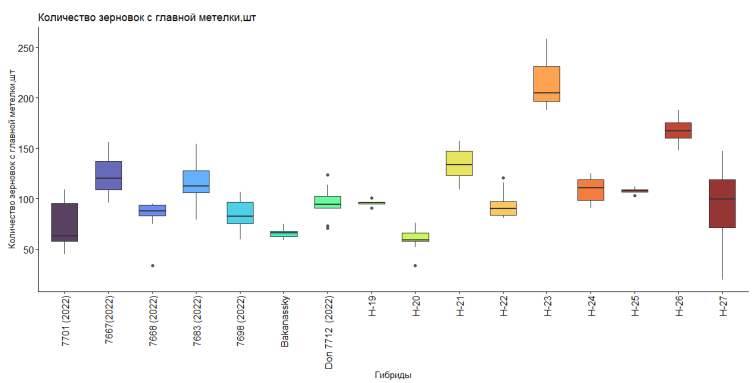
Приложение Б

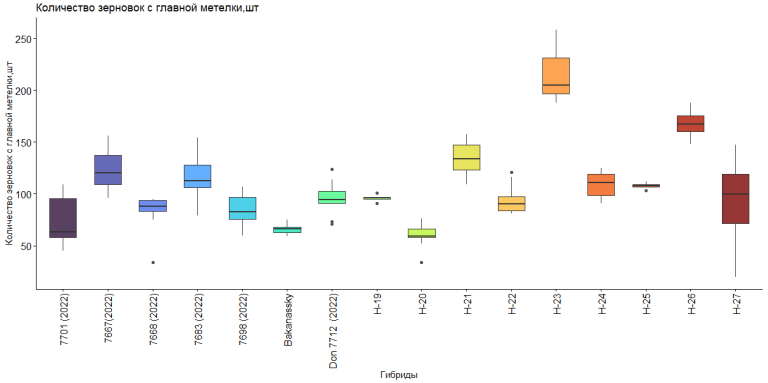
Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_2 по материнской форме Ару

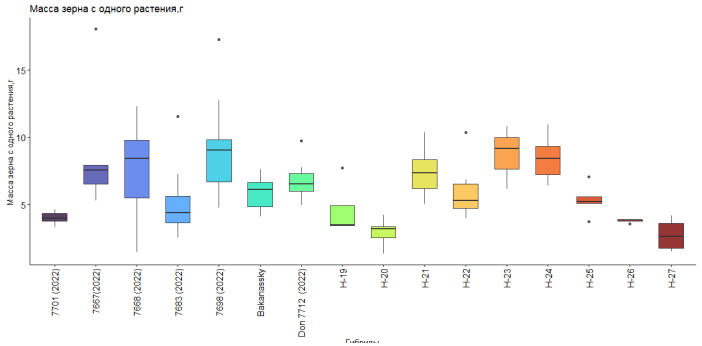


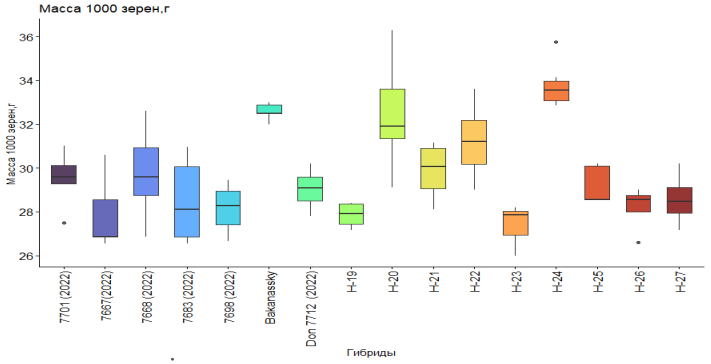
Приложение В

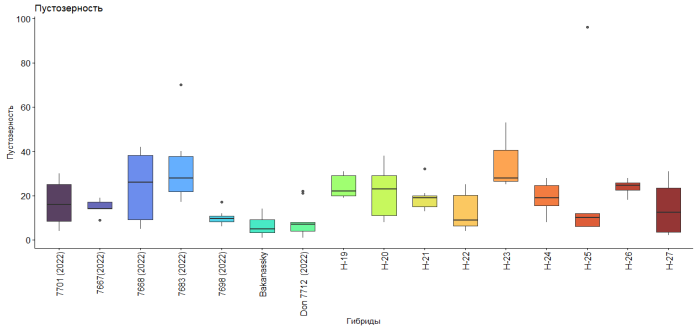
Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_2 по материнской форме Баканасский





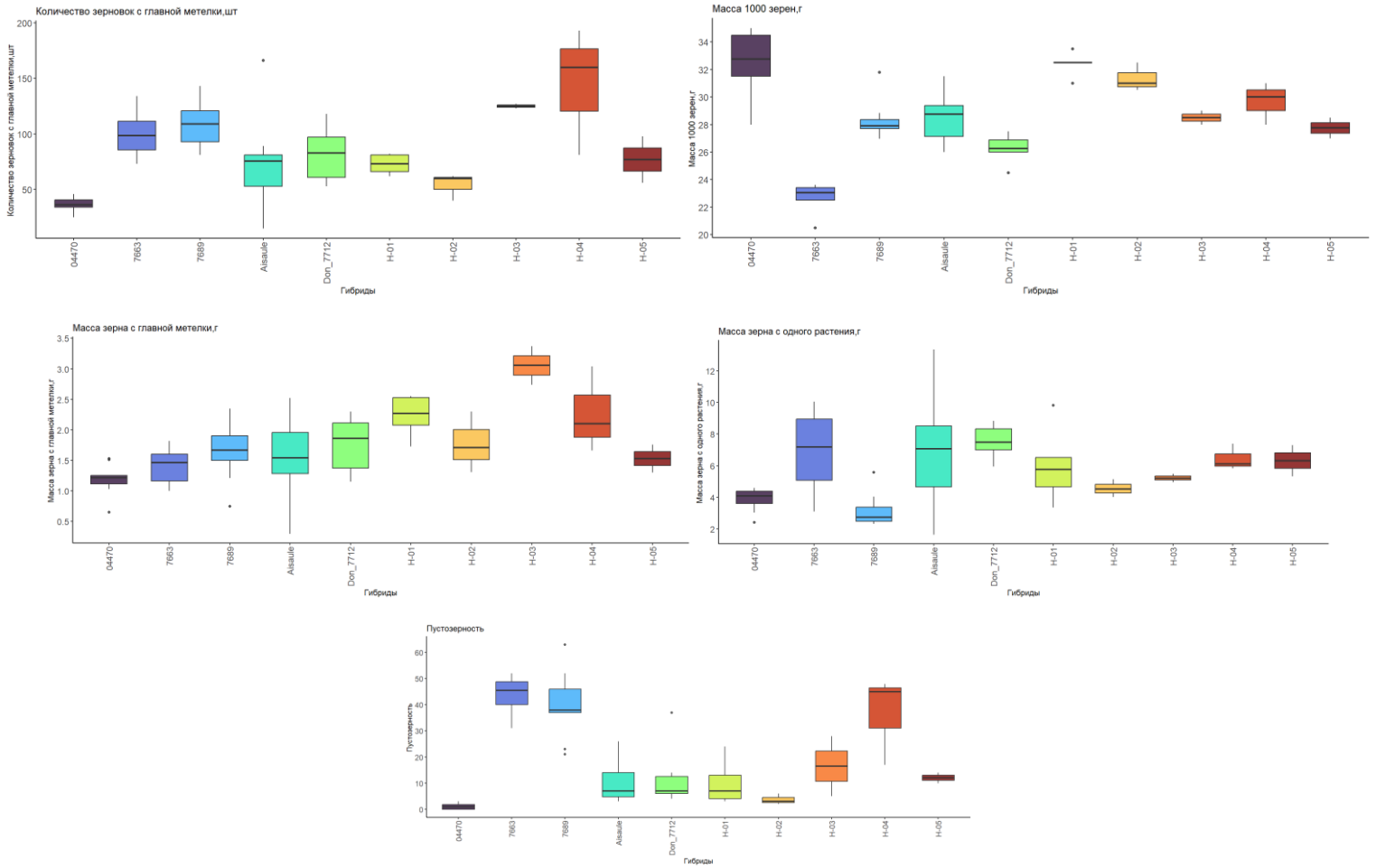






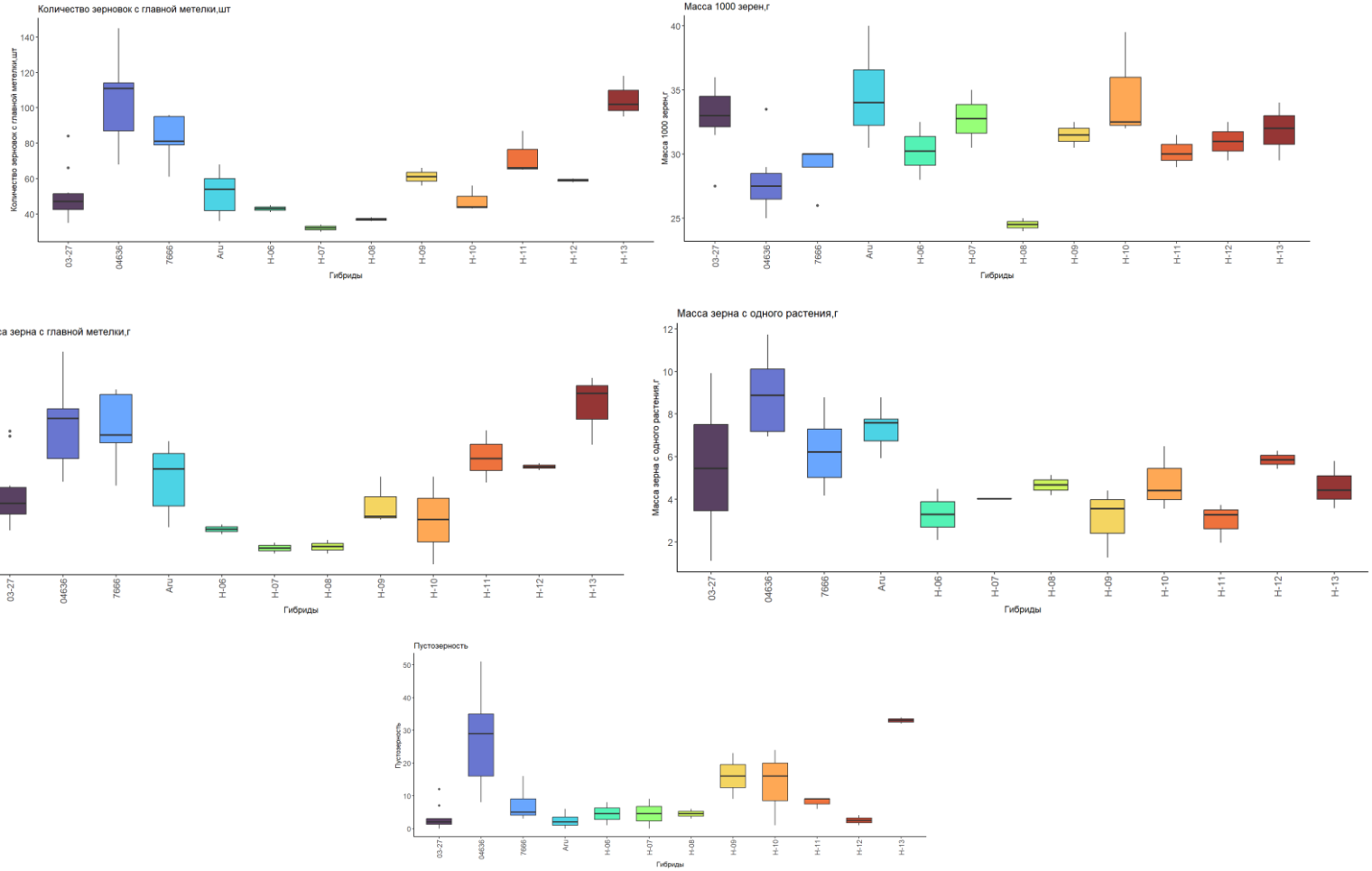
Приложение Г

Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_3 по материнской форме Айсауле



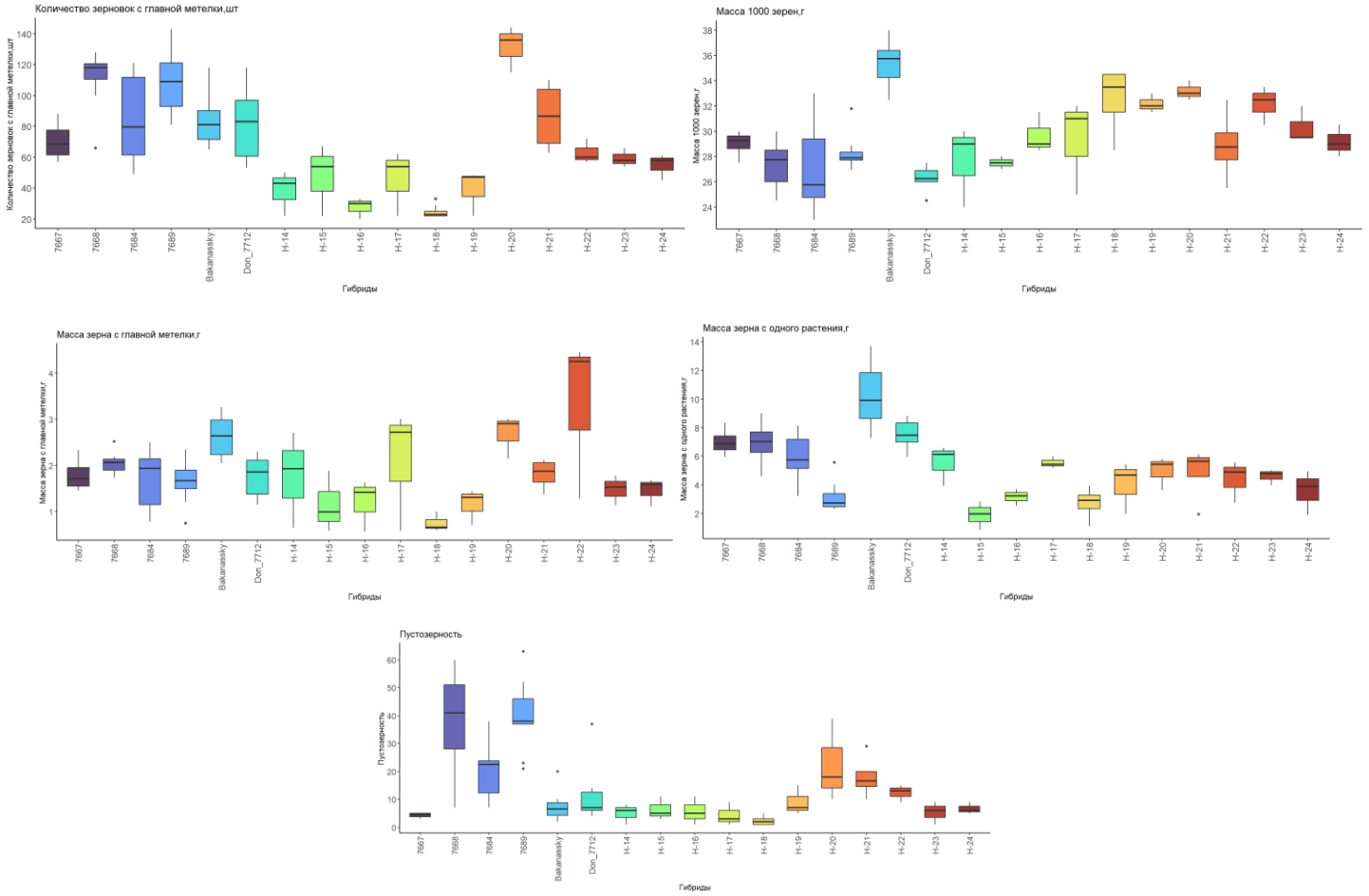
Приложение Д

Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_3 по материнской форме Ару



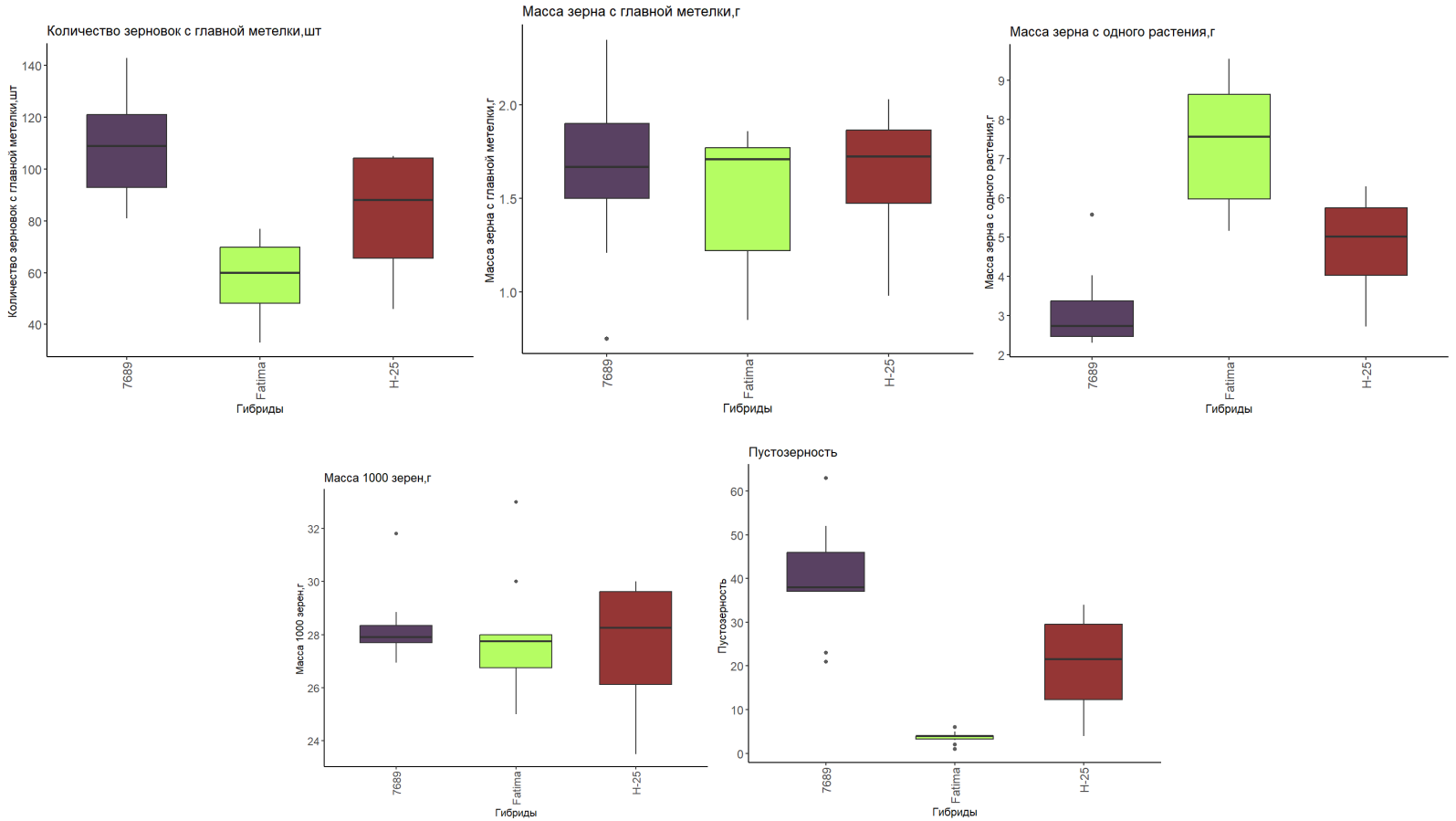
Приложение Е

Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_3 по материнской форме Баканасский



Приложение Ж

Статистический анализ (*boxplot)* структурных компонентов продуктивности гибридов F_3 по материнской форме Фатима



Приложение 3

Таблицы 3 – Анализ элементов структуры урожая гибридов F_2

Генотип	Кустистость, шт	Высота растений, см	Длина гл. метелки, см	Длина флаг. листа, см	Ширина флаг. листа, см	Кол-во зерновок с гл. метелки, шт	Пустозерность	Масса зерна с гл. метелки, г	Масса зерна с 1 растения, г	Масса 1000 зерен, г
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_2 Баканасский/7668 (var. *subuzbekistanica Kond.*)	3,2±0,6	98,7±6,7	16,9±0,8	23,4±2,4	1,1±0,1	134,8±15,7	18,9±5,5	3,2±0,5	7,4±1,7	29,9±1,1
F_2 Баканасский/7684 (*var. subvulgaris Brsch.*)	2,7±0,5	93,0±4,9	18,1±1,1	27,2±2,9	1,2±0,0	217,0±32,7	35,3±13,8	4,3±0,2	8,7±2,1	27,4±1,1
F_2 7824/Айсауле (*var. italica Alef.*)	2,5±0,5	89,9±5,5	15,0±0,5	17,1±2,3	1,1±0,1	130,1±21,1	12,6±9,1	2,9±0,5	5,7±1,2	25,9±0,9
F_2 Ару/04468 (*var. subvulgaris Brsch.*)	1,8±0,4	107,2±6,1	17,2±1,0	27,9±4,9	1,0±0,1	142,7±26,5	17,7±6,1	3,4±0,5	5,8±1,9	30,3±1,1
F_2 7698/Баканасский (*var. subvulgaris Brsch.*)	1,8±0,5	89,4±6,5	13,9±2,4	16,3±3,3	0,9±0,1	91,5±49,4	14,5±12,9	2,8±0,8	2,7±1,2	28,6±1,2

Продолжение Таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_2 7698/Баканасский (*var. italica Alef.*)	1,0±0,0	98,1±3,7	16,7±0,9	21,5±5,5	1,02±0,05	167,8±15,4	23,8±3,9	3,8±0,1	3,8±0,1	28,2±0,9
F_2 7824/Айсауле (*var. subuzbekistanica Kond.*)	2,8±0,4	80,5±4,9	15,8±1,1	18,4±5,1	1,1±0,3	150,0±23,3	28,8±12,1	3,02±0,5	6,02±1,7	25,9±0,7
F_2 7698/Айсауле (*var. suberythroseros Kan.*)	1,6±0,8	86,0±6,9	14,8±0,9	18,1±5,4	0,9±0,2	110,6±20,3	21,8±4,5	2,6±0,5	3,3±0,9	29,2±2,8
F_2 Ару/7702 (*var. erythroceros Koern.*)	2,6±0,5	88,3±4,3	15,01±1,3	15,9±1,7	0,7±0,1	80,7±19,8	16,6±9,9	2,1±0,6	4,1±0,9	33,5±1,7
F_2 Айсауле/7689 (*var. zeravschanica Brsch.*)	2,7±0,5	78,8±2,2	15,02±0,7	18,9±2,1	1,1±0,1	131,7±7,9	40,8±12,02	2,5±0,4	5,8±1,4	27,9±1,4
F_2 Ару/0327 (*var. vulgaris Koern.*)	1,4±0,5	93,6±4,7	17,2±1,005	26,6±3,4	0,8±0,1	80,8±12,7	17,8±8,1	2,3±0,5	2,8±0,3	32,1±2,5
F_2 Ару/0327 (*var. subpyrocarpa Alef.*)	2,6±0,8	83,0±3,2	14,6±0,6	22,5±2,6	0,9±0,1	96,0±3,4	24,2±5,1	2,3±0,2	4,6±1,8	27,9±0,5
F_2 Баканасский/7667 (*var. vulgaris Koern.*)	2,6±0,5	80,7±6,2	16,3±2,1	25,01±4,3	0,8±0,05	59,8±11,6	22,1±10,7	1,3±0,3	2,9±0,8	32,3±1,9
F_2 Баканасский/7701 (*var. vulgaris Koern.*)	3,4±0,5	103,0±3,9	18,9±1,4	27,2±2,4	0,9±0,1	109,3±12,1	18,9±6,4	2,8±0,3	8,5±1,4	33,7±0,8

Продолжение Таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_2 Айсауле/7664 (*var. italica Alef.*)	2,8±0,5	96,0±4,9	16,1±0,9	21,4±4,5	1,1±0,1	108,3±16,3	16,5±6,5	2,9±0,6	5,6±0,6	27,9±0,7
F_2 Айсауле/04470 (*var. subvulgaris Brsch.*)	2,8±0,9	95,4±6,5	16,9±0,9	24,3±3,2	1,1±0,1	118,1±10,2	8,6±7,02	3,4±0,3	6,4±1,2	30,3±2,8
F_2 Айсауле/04470 (*var. italica Alef.*)	2,5±0,6	99,0±4,6	16,8±0,3	22,9±0,2	1,05±0,06	117,0±4,6	7,0±1,2	3,4±0,3	6,9±0,1	29,5±0,2
F_2 Айсауле/Дон 7712 (*var. sundensis Koern.*)	2,4±0,9	86,4±2,7	14,04±0,9	19,9±2,4	0,9±0,1	91,3±11,8	8,1±3,5	2,1±0,2	4,2±1,4	27,4±1,8
F_2 Айсауле/Дон 7712 (*var. italica Alef.*)	2,1±0,4	78,9±7,004	12,9±1,4	18,8±2,4	1,1±0,1	86,1±26,6	16,6±9,7	1,6±0,4	3,3±0,9	28,1±1,5
F_2 Баканасский/7683 (var. subjanthoseros Brsch.)	2,8±0,6	85,3±6,3	15,6±0,6	20,9±2,5	0,99±0,1	94,4±13,6	12,6±7,8	2,6±0,4	5,8±1,8	31,2±1,4
F_2 Баканасский/Дон 7712	2,4±0,5	93,8±7,8	15,8±0,9	20,1±2,7	1,0±0,1	107,8±3,1	26,0±36,9	2,8±0,2	5,3±1,1	29,2±0,8
F_2 Ару/04636 (*var. vulgaris Koern.*)	2,6±0,5	91,6±3,9	16,9±0,9	24,1±3,1	1,1±0,1	110,7±11,4	15,1±5,4	2,6±0,4	5,5±0,8	30,2±1,3
F_2 Ару/7666 (*var. suberythroseros Kan.*)	2,2±0,4	93,3±6,2	15,3±1,01	21,5±2,6	0,9±0,2	134,7±30,7	19,5±9,8	2,9±0,9	5,1±1,6	28,2±1,4

Продолжение Таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_2 Ару/Дон 7712 (*var. Desvauxii Koern.*)	2,6±0,7	98,2±7,7	17,02±0,9	23,1±2,1	1,01±0,1	126,5±19,7	25,7±13,0	2,8±0,6	6,1±1,9	28,1±1,7
F_2 Айсауле/7663 (*var. italica Alef.*)	1,8±0,4	83,1±5,5	14,2±0,6	18,9±2,8	1,1±0,1	138,3±24,7	32,0±15,3	2,9±0,4	4,2±0,8	28,1±1,4
F_2 Ару/Дон 7712 (*var. erythroceros Koern.*)	1,7±0,5	87,5±5,4	14,9±0,6	18,1±5,8	0,9±0,2	117,0±27,1	18,0±7,3	2,8±0,6	4,4±1,1	29,9±0,9
F_2 Баканасский/7667 (*var. subjanthoseros Brsch.*)	2,6±0,8	83,0±3,2	14,6±0,6	22,5±2,6	0,9±0,1	96,0±3,4	24,2±5,1	2,3±0,2	4,6±1,8	27,9±0,5

Приложение И

Таблица И – Анализ структуры урожая гибридов F_3

Генотип	Кустистость, шт	Высота растений, см	Длина гл. метелки, см	Длина флаг. листа, см	Ширина флаг. листа, см	Кол-во зерновок с гл. метелки, шт	Пустозерность	Масса зерна с гл. метелки, г	Масса зерна с 1 растения, г	Масса 1000 зерен, г
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_3 Баканасский/7668 (*var. italica Alef.*)	4,3±1,4	71,0±1,5	13,7±1,4	19,3±0,1	0,9±0,1	59,3±5,5	5,3±3,6	1,5±0,3	4,6±0,5	30,3±1,3
F_3 Баканасский/7668 (*var. uzbekistanica Ukl.*)	3,0±0,9	65,7±4,6	14,2±1,1	16,6±1,1	0,7±0,1	54,7±7,6	6,7±1,9	1,5±0,3	3,6±1,4	29,2±1,1
F_3 Баканасский /7668 (*var. erythroceros Koern.*)	3,3±0,5	81,7±4,2	14,9±1,4	20,3±1,9	0,9±0,2	63,0±7,1	12,3±2,7	3,3±1,6	4,4±1,3	32,2±1,4
F_3 Баканасский/Дон 7712 (*var. vulgaris Koern.*)	3,8±1,2	84,8±3,7	13,6±0,9	17,3±2,4	1,03±0,1	86,5±21,3	18,0±7,4	1,8±0,3	4,8±1,8	28,9±2,7

Продолжение Таблицы И

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_3 Баканасский/7667 (*var. italica Alef.*)	6,0±0,9	68,0±10,1	16,4±2,2	18,3±2,3	0,7±0,1	38,3±13,0	5,0±3,2	1,8±0,9	5,6±1,3	27,7±2,9
F_3 Баканасский/7667 (*var. subvulgaris Brsch.*)	5,7±1,9	78,2±14,1	16,7±4,4	18,3±5,5	0,7±0,2	27,7±6,0	5,7±4,0	1,2±0,5	3,2±0,5	29,7±1,4
F_3 Баканасский/7667 (*var. vulgaris Koern.*)	6,5±0,6	59,0 ±4,6	14,0±1,2	15,0±1,2	0,8±0,2	22,0±0,0	2,0±1,2	0,6±0,0	3,6±0,4	29,3±0,9
F_3 Баканасский/7667 (*var. uzbekistanica Ukl.*)	5,0±1,8	69,0±13,9	14,0±3,9	19,5±6,0	0,7±0,2	46,0±18,9	4,3±3,7	2,1±1,2	5,5±0,4	29,3±3,4
F_3 Баканасский/7667 (*var. janthoceros Koern.*)	2,3±0,5	65,3±11,04	14,9±3,4	19,0±1,6	3,1±3,8	47,7±20,7	6,3±3,7	1,2±0,6	1,9±0,9	27,5±0,4
F_3 Баканасский/7684 (*var. italica Alef.)*	4,0±0,9	61,3±8,9	14,7±4,6	19,3±5,2	0,7±0,2	39,0±13,2	9,0±4,7	1,2±0,3	4,04±1,6	32,2±0,7
F_3 Ару/7666 (*var. italica Alef.*)	4,0±0,0	95,0±3,5	16,0±1,2	26,0±1,2	0,9±0,0	59,0±1,2	2,5±1,7	1,8±0,04	5,9±0,5	31,0±1,7
F_3 Ару/7666 (*var. vulgaris Koern.*)	3,0±0,9	82,7±5,1	17,2±1,3	21,7±1,1	0,9±0,1	105,0±10,5	33,0±0,9	2,4±0,3	4,6±0,9	31,8±2,0
F_3 Ару/7666 (*var. erythroceros Koern.*)	2,3±0,5	89,3±10,8	16,3±1,6	20,8±0,9	0,9±0,1	72,7±11,1	8,0±1,5	1,9±0,2	2,9±0,8	30,2±1,1

Продолжение Таблицы И

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_3 Ару/0327 (*var. italica Alef.*)	4,0±1,2	72,5±0,6	12,4±1,8	20,4±0,5	0,5±0,2	43,0±2,3	4,5±4,0	1,1±0,1	3,3±1,4	30,3±2,6
F_3 Ару/0327 (*var. vulgaris Koern.*)	5,5±0,6	77,5±2,9	15,0±0,0	21,3±2,0	0,7±0,1	37,0±1,2	4,5±1,7	0,9±0,1	4,7±0,5	24,5±0,6
F_3 Ару/0327 (*var. sundensis Koern.*)	5,5±0,6	69,8±2,6	14,4±1,0	19,2±2,1	0,5±0,0	32,0±2,3	4,5±5,2	0,9±0,1	4,0±0,0	32,8±2,6
F_3 Айсауле/7689 (*var. zeravschanica Brsch.*)	4,3±0,5	69,2±0,9	15,4±1,1	22,8±4,7	1,1±0,2	144,7±51,5	36,7±15,3	2,3±0,6	6,4±0,7	29,7±1,4
F_3 Айсауле/Дон 7712 (*var. italica Alef.*)	5,5±0,6	69,0±1,2	10,5±0,6	14,5±0,6	0,9±0,2	77,0±24,2	12,0±2,3	1,5±0,3	6,3±1,1	27,8±0,9
F_3 Айсауле/7663 (*var. italica Alef.*)	3,0±0,0	85,2±6,6	15,8±1,4	24,0±11,5	1,2±0,2	125,0±2,3	16,5±13,3	3,1±0,4	5,2±0,3	28,5±0,6
F_3 Ару/04636 (*var. italica Alef.*)	3,0±1,5	69,7±1,9	12,4±0,5	15,7±2,2	0,8±0,1	61,0±4,5	16,0±6,3	1,4±0,2	3,1±1,5	31,5±0,9
F_3 Ару/04636 (*var. vulgaris Koern.*)	4,3±0,5	67,0±2,4	15,4±5,1	19,2±4,4	0,7±0,1	47,7±6,5	13,7±10,4	1,2±0,4	4,8±1,3	34,7±3,8
F_3 Айсауле/04470 (*var. italica Alef.*)	3,4±0,8	83,3±4,8	17,9±6,8	14,7±1,3	0,8±0,2	10,2±8,1	2,3±0,3	6,1±2,3	6,1±2,3	32,4±0,8

Продолжение Таблицы И

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F_3 Айсауле/04470 (*var. subvulgaris Brsch.*)	3,7±0,5	80,3±1,4	13,4±1,3	18,2±2,9	0,8±0,1	54,0±10,9	3,7±1,9	1,8±0,4	4,6±0,5	31,3±0,9
F_3 Баканасский/7667 (*var. vulgaris Koern.*)	4,7±1,3	56,6±3,6	12,6±1,6	18,7±2,7	0,5±0,0	25,6±3,9	2,4±1,6	0,8±0,2	2,5±0,7	33,5±1,6
F_3 Баканасский/7689 (*var. erythroceros Koern.*)	2,7±1,0	78,7±5,9	15,3±1,0	23,2±1,6	1,0±0,1	131,7±13,4	22,3±13,4	2,7±0,4	4,97±1,0	33,2±0,7
F_3 Фатима/7689 (*var. mutica Vav.*)	3,5±0,5	70,0±13,4	15,2±2,8	19,2±5,2	0,9±0,1	81,8±26,3	20,3±12,4	1,6±0,4	4,8±1,4	27,5±2,8

Приложение К

Стадия метафазы и анафазы митоза в клетках кончика *корешка* дигаплоида Айсауле/7668 *(var. italica Alef.)*

