

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ (МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ) В СЕЛЕКЦИИ РИСА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К *PYRICULARIA ORYZAE* CAV.

Дубина Е.В., канд. биол. наук, Рубан М.Г.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»,
Российская Федерация, Краснодар

Аннотация. Болезни сельскохозяйственных культур являются основной причиной снижения урожайности и качества продукции. Пирикулярриоз (возбудитель - *Pyricularia oryzae* Cav.) является самым опасным заболеванием на рисовых полях. Наиболее эффективной, экономически оправданной и экологически щадящей стратегией борьбы с ним является создание устойчивых сортов. Актуально в данном направлении применение современных пост-геномных технологий (молекулярное маркирование) с использованием ДНК-маркеров, сцепленных с локусами устойчивости к пирикулярриозу. Это существенно сокращает селекционный процесс и позволяет в короткие сроки создавать устойчивые к заболеванию формы риса. В связи с этим цель работы заключалась в интрогрессии эффективного для юга России гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* в генотип высокопродуктивного сорта риса отечественной селекции Флагман для повышения его устойчивости к заболеванию, а также получения на его основе новых резистентных форм к *Pyricularia oryzae* Cav. Для достижения поставленной цели нами в 2007 году проведена гибридизация отечественного сорта Флагман с сортом-донором IR-36, который имеет период вегетации более 150 дней. Однако для местной зоны рекомендуется возделывать сорта с периодом вегетации не более 125 дней. В связи с этим было проведено три беккрасса и получен селекционный материал, который изучался по хозяйственно-ценным признакам в селекционных питомниках. По результатам оценки и жёсткой браковки, а также по данным фитопатологического теста на устойчивость к пирикулярриозу выделилось несколько образцов с высокими показателями по качеству крупы, устойчивости к пирикулярриозу, урожайности и хозяйственно-ценным признакам. В 2017 году высокоурожайный сортообразец риса КП-171-14 с геном *Pi-ta*, адаптированный к условиям выращивания на юге России [1, р. 752-756], устойчивый к краснодарской популяции патогена *Pyricularia oryzae* Cav., а также имеющий высокое качество крупы передан в Государственное сортоиспытание (ГСИ) под названием Альянс. Сортообразцы КП-30 (Ленарис) и КП-23 (Капитан) переданы на ГСИ в 2018 году. Возделывание таких сортов в производстве позволит сократить применение химических средств защиты и избежать загрязнения зерновых экосистем.

Ключевые слова. Рис, ПЦР, селекция, гены устойчивости, молекулярные маркеры.

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES (MOLECULAR MARKING) IN THE BREEDING OF RICE FOR RESISTANCE TO *PYRICULARIA ORYZAE* CAV.

Dubina E.V., Cand. Sc. (Biol), Ruban M.G.

FSBSI «All-Russian Rice Research Institute», Russian Federation, Krasnodar

Abstract. Diseases of agricultural crops are the main reason for lowering yield and quality of product. Blast (causative agent *Pyricularia oryzae* Cav.) – is the most harmful disease on rice

fields. The most effective, economically justified and environmentally friendly strategy for combating it is development of resistant varieties. The application of modern post-genomic technologies (molecular marking) using DNA markers linked to loci of resistance to blast is relevant in this area. This allows significantly reducing the breeding process and in a short time to develop disease-resistant rice forms. In this regard, the aim of the work was to develop a breeding material, as well as highly productive rice varieties and lines with genes of resistance to blast based on the use of molecular marking method. To achieve this goal, we have since 2007 launched a program for the introduction of an effective for the south of Russia, blast resistance gene *Pi-ta* into domestic rice variety Flagman. As a result of a number of recurrent crosses, breeding material was obtained, which was studied on economic-valuable traits in breeding nurseries. As a result of evaluation and rigorous rejection, as well as the results of the phytopathological test for resistance to blast, several lines were identified that have high indicators of milled rice quality, resistance to blast, yield and economic-valuable traits. Rice accession KP-171-14 with *Pi-ta* gene, adapted to growing conditions of the South of Russia, resistant to Krasnodar population of *Pyricularia oryzae* Cav., and having high yield and grain quality in 2017 was passed to State Varietal Testing (SVT) under the name Aliance. Accessions KP-30 and KP-23 are tested for economically valuable traits and resistance to disease in competitive variety testing. The best sample will be submitted to SVT. The introduction and cultivation of such varieties in production will reduce the use of chemical protection products, obtain environmentally friendly agricultural products and avoid contamination of grain ecosystems.

Keywords. Rice, PCR, breeding, resistance genes, molecular markers.

В селекции растений, основанной на классических методах – гибридизации и отборе, в настоящее время широко используются методы молекулярного маркирования, которые позволяют идентифицировать целевые гены и отбирать желаемые генотипы, основываясь на ДНК-анализе [2, с. 54-59; 3, с. 133-140]. В связи с этим, в мировой практике возникло такое направление, как маркер-опосредованная селекция (marker assisted selection – MAS). С её помощью осуществляется молекулярно-генетическое сопровождение селекционного процесса, начиная с подбора исходного материала, наличия желательных генов, и, заканчивая паспортизацией нового сорта [4, р. 3-21].

Для успеха MAS при идентификации целевых генов в гибридном материале важно свести к минимуму расстояние между маркером и геном, поэтому лучше использовать маркеры, расположенные в непосредственной близости к гену, в пределах 5сМ [5, р. 1345-1355]. Кроме того, надёжность маркерного отбора возрастает при использовании фланкирующих, окружающих ген с двух сторон, или внутригенных маркеров, напрямую идентифицирующих нужный аллель.

Маркеры, тесно сцепленные с целевым геном или локусом хромосомы, в котором такой ген находится, значительно облегчают селекционную работу и позволяют ускоренными темпами создавать генотипы, имеющие необходимые гены, в том числе гены резистентности к биотическим стрессовым факторам среды [3, р. 133-140].

Пирикулярриоз считается одним из наиболее вредоносных заболеваний риса на всей территории возделывания данной культуры. В связи с этим создание устойчивых к пирикулярриозу сортов – важное направление селекции, наряду с повышением урожайности риса и качества зерна.

Гены устойчивости к заболеваниям защищают растения риса от грибной, бактериальной, вирусной и других инфекций, являясь первым уровнем сложной генетической защитной системы. Растения, несущие доминантный (или кодоминантный) ген устойчивости (R), реагируют на патогены, содержащие соответствующий ген авирулентности (AVR), запуская сигнальный трансдукционный путь, который активирует защитную систему [6, p. 967-975; 7, p. 425-434; 8, p. 859-863].

Идентификация основных генов устойчивости была начата еще в начале двадцатого века, когда Sasaki открыл физиологические расы *P. oryzae*, отличающиеся способностью заражать различные сорта риса [2, p. 54-59].

Первым изученным геном, придающим устойчивость к пирикулярриозу, был *Pi-a*, определенный Н. Shinoda. В дальнейшем широкое генетическое изучение привело к открытию 25 основных генов устойчивости к пирикулярриозу и подбору стандартных сортов риса для дифференциации этих генов. К настоящему времени известно более 50 генов, контролирующих устойчивость. Среди них есть гены, имеющие более чем одну аллель устойчивости. Например, пять аллелей известно в локусе *Pi-k* на 11 хромосоме, две – у *Pi-ta* локуса на хромосоме 12 и две в локусе *Pi-z* на хромосоме 6. В центромерном регионе шестой хромосоме также картированы такие гены устойчивости как *Pi-9*, *Pi-40*, *Pi-13*, *Pi-z*, *Pi-z^t* и др.; в одиннадцатой – *Pi-a*, *Pi-1*, *Pi-18*, *Pi-k*, *Pi-kh* и др.; в двенадцатой хромосоме идентифицированы гены *Pi-4a (t)*, *Pi-4b (t)*, *Pi-6 (t)* и *Pi-12 (t)* [9, p. 507-528].

Для успешной селекции на устойчивость к данному заболеванию, у селекционера в первую очередь должна быть четкая информация об эффективных генах резистентности для местной зоны возделывания культуры риса, а также необходимая информация о биоразнообразии самого патогена *P. oryzae* Cav. [1, p. 752-756].

Согласно нашим исследованиям ген расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* является эффективным для юга России [10, с. 29-35; 11, с. 20-27.]. Он хорошо изучен и секвенирован [2, p.54 – 59]. Ген локализован в центромерном регионе двенадцатой хромосомы и кодирует 928-аминокислотный полипептид с молекулярной массой 105 kD [2, p.133 – 140]. Сотрудниками нашей лаборатории была разработана маркерная система, позволяющая напрямую идентифицировать ген *Pi-ta* в гибридных растениях [12]. В 2016 году сотрудниками института сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) система была усовершенствована и разработан внутригенный молекулярный маркер, напрямую идентифицирующий целевой ген, а также его аллельное состояние [13, с. 45-48].

Целью работы послужило введение эффективного для юга России гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* в генотип высокопродуктивного сорта риса отечественной селекции Флагман для повышения его устойчивости к заболеванию, а также получение на его основе новых резистентных форм к *P.oryzae*.

Материалы и методы. Донором для введения гена устойчивости к пирикулярриозу в отечественный сорт риса Флагман (материнская форма) стал сорт

зарубежной селекции IR- 36. В условиях выращивания Краснодарского края он показал себя как позднеспелый (с периодом вегетации 155 дней). В местной зоне рисосеяния предпочтительно возделывание сортов, созревающих не более, чем за 125 дней, поэтому материнская форма для гибридизации была высажена в три срока, с разницей в 10 дней, тем самым увеличивая вероятность совпадения периодов цветения родительских форм. При гибридизации растений использовали пневмокастрацию материнских форм и опыление «ТВЕЛЛ»-методом [14, с. 15-17]. Растения выращивали в камерах искусственного климата.

Для контролирования наличия, а также аллельного состояния гена *Pi-ta* в гибридных растениях использовали кодоминантный внутригенный молекулярный маркер, позволяющий идентифицировать сразу доминантную и рецессивную аллели, размер ПЦР-продукта которых отличается почти на 300 пар олигонуклеотидов, что позволяет выполнять визуализацию продукта ПЦР-реакции, как в полиакриламидном, так и в агарозном геле, что немаловажно с точки зрения методического удобства при проведении массовых анализов. Размер ПЦР-продукта у сортов с устойчивым аллелем гена составляет 270 п.о.; у сортов с восприимчивым аллелем – 563 п.о. [12; 13, с. 45-48] (таблица 1).

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность праймеров для идентификации гена *Pi-ta*

Название гена	Нуклеотидная последовательность	
<i>Pi-ta</i>	F1-N	GCC GTG GCT TCT ATC TTTA CAT G
	R1	ATC CAA GTG TTA GGG CCA ACA TTC
	F2	TTG ACA CTC TCA AAG GAC TGG GAT
	R2-N	TCA AGT CAG GTT GAA GAT GCA TCG A

Экстракцию (выделение ДНК) осуществляли методом СТАВ [15, р. 4321-4325]. ПЦР проводили с 40-50 нг ДНК, 0,1 μ M dNTPs, 25mM KCL, 60 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,1 % Тритон X-100б 10 mM 2-меркаптоэтанол, 1,5 mM MgCl₂, 1 единица Taq-полимеразы и 0,3 μ M прямого и обратного праймеров в конечном объёме 25 мкл. Состав праймеров приведен в таблице 1

Для проведения амплификации нами были оптимизированы условия и составлен протокол условий ПЦР: начальная денатурация – 5 минут при 94°C – 1 цикл. Следующие 35 циклов: денатурация – 35 сек при 94°C; отжиг праймеров 45 сек при 60° C; синтез 30 сек при 72°C. Синтез 5 мин при 72°C – 1 цикл.

При электрофорезе использовали 8 %-ный полиакриламидный гель. Полиморфизм контрастных аллелей визуализировался после трёх часов электрофореза при напряжении 250V. После электрофореза гелевые пластины помещали на 20-30 минут в раствор бромистого этидия и затем фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Оценка донорной линии риса IR-36 и отечественного сорта Флагман на устойчивость к местной популяции *Pyricularia oryzae* проводилась в полевых условиях инфекционного питомника рисовой оросительной системы ФГБНУ «ВНИИ риса» в соответствии с методическими указаниями [16, 12с.; 17, 14 с.].

В качестве восприимчивого контроля использовали сорта риса Победа 65, а устойчивого контроля – сорт риса Авангард.

Инокуляцию растений проводили культурой гриба, выделенной из гербарного материала, собранного на полях Краснодарского края. Суспензию конидий для заражения приготавливали путем смыва с поверхности колоний спорово-мицелиальной массы. Инокуляцию осуществляли суспензией в концентрации 10^5 конидий/мл. Растения заражали в полевых условиях инфекционного питомника в фазы кущения, вымётывания – цветения из расчета 0,5 мл на одно растение. При обработке использовали опрыскиватель. В суспензию для лучшей адгезии добавляли «Твин» (Россия) из расчёта 1 капля на литр воды.

Учёт степени поражения растений (в процентах) проводили на 14 день после инокуляции, согласно экспресс-методу оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу. Оценку осуществляют, учитывая два показателя: тип реакции (в баллах) и степень поражения (в процентах), используя при этом десятибалльную шкалу Международного института риса [16, 12с.]:

- устойчивые – 0-1 баллов – отсутствие поражения, мелкие коричневые пятна, покрывающие менее 25 % общей поверхности листьев;
- среднеустойчивые – 2-5 баллов – типичные пирикулярриозные пятна эллиптической формы, 1-2 см длиной, покрывающие 26-50 % общей поверхности листьев;
- неустойчивые – 6-10 баллов – типичные пирикулярриозные пятна эллиптической формы, 1-2 см длиной, покрывающие 51 и более % общей поверхности листьев.

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

$$\text{ИРБ} = \sum (a*b) / n*9,$$

где ИРБ – интенсивность развития болезни, %;

$\sum (a*b)$ – сумма произведений количества пораженных растений, умноженных на соответствующий балл поражения,

n – число, учтенных растений, шт.

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

Для оценки по хозяйственно-ценным признакам исследуемые сортообразцы высевались в ФГУЭСП «Красное» ВНИИ риса на рисовой оросительной системе по предшественнику многолетние травы. Все агротехнические работы выполнялись по общепринятой методике ВНИИ риса [18, 416 с.; 19, 156 с.].

В течение вегетации проводили фенологические наблюдения по принятой во ВНИИ риса методике. Учитывались сроки фаз вегетации до цветения и полной спелости. В фазу полной спелости проводили оценку на полегаемость, осыпаемость [20, 38 с.].

Перед уборкой проводилась сортовая прополка с удалением нетипичных растений в делянках.

Статистическую обработку полученных данных проводили по Доспехову Б.А. [18, 416 с.].

Результаты. Для получения новых резистентных форм к *P. oryzae* в 2007 году на основе использования технологии MAS нами проведена гибридизация сорта-донора гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* IR-36 с отечественным сортом риса Флагман, в результате которой получено F1 поколение, растения которого имели высокую степень стерильности (до 95 %). После проведения первой серии беккроссов в 2008 году в камерах искусственного климата получено BC1 и BC2 поколение. В BC1-популяциях фертильность возросла и в среднем составляла около 50 %. Начиная с первого возвратного скрещивания, проводился маркерный контроль на присутствие переносимых донорных аллелей в гибридном потомстве. Отбирали растения, которые по результатам ДНК-анализа несли донорную аллель гена устойчивости к патогену, а также отмечали те растения, которые показали наименьший период вегетации до цветения. Растения, в генотипе которых аллели устойчивости не были обнаружены, выбраковывали.

В BC2-популяции по данным ДНК-анализа отбирали растения, несущие донорные аллели, которые вовлекали в следующий беккросс, предварительно выбраковав формы с нежелательным морфотипом.

Известно, что восстановление генома рекуррентного родителя (RP) при возвратных скрещиваниях в BC3 составляет 93,75 % [21, р.41-43], поэтому было проведено три беккросса.

В 2009 году получено BC₃ поколение. Среди растений BC₃ были отобраны формы с наименьшим вегетационным периодом и наибольшей фертильностью метёлки. Семена этих растений высадили для получения сегрегирующей BC₃F₁ популяции. Самоопыление растений риса, гетерозиготных по селективируемым генам, даёт возможность перевести приоритетную аллель в гомозиготное состояние. Маркерный анализ полученной популяции выявил образцы, несущие вводимые целевые гены в гомозиготном состоянии (рисунок 1).



Рисунок 1. Результаты ПЦР-анализа на ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*

Примечание: дорожка №1 – сорт Флагман (материнская форма) – размер ПЦР-продукта 563 п.о.; дорожка №2 – сорт-донор IR-36 – размер ПЦР-продукта 270 п.о. (отцовская форма); 3-8 – гибридные растения BC₃F₁ – поколения; маркер мол. веса – маркер молекулярного веса pBR322/BsuRI.

В селекции риса желательным является низкорослый тип растений, с высокой интенсивностью первоначального роста, устойчивый к полеганию, с продуктивной метёлкой и неосыпающимися в фазу полной спелости колосками. Среди растений, которые по результатам ДНК-анализа, несли ген *Pi-ta* в гомозиготном состоянии, удалось отобрать несколько форм, совмещающих в себе скороспелость, низкорослость, неосыпаемость и фертильность колосков. Семена этих растений были высеяны и в потомстве отобрали лучшие экземпляры, которые в 2010 году были переданы в селекционный процесс для оценки по хозяйственно-ценным признакам. Растения, не удовлетворяющие таким требованиям, выбраковывали. Далее в 2010-2013 гг., переданные нами в селекционный процесс линии риса с интродуцированным геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* проходили оценку по комплексу хозяйственно-ценных признаков в селекционном питомнике. После оценки и жёсткой браковки для контрольного питомника отобрано 23 линии, из которых в 2014 году выделилось по комплексу признаков три устойчивые к пирикулярриозу, с хорошим качеством крупы и высокой урожайностью линии риса с геном *Pi-ta*: КП-171-14 (Альянс), КП-30 (Ленарис) и КП-23 (Капитан). Результаты их оценки приведены в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика сортов и сортообразцов риса конкурсного
сортоиспытания

Название линии / сорта	Уро- жай- ность, т/га	Вегета- ционный период, дней	Высота расте- ния, см	Масса 1000 зёрен, г	l/b зерна	Выход крупы, %	ИРБ, %
КП-171-14 (Альянс)	9.2	120	85.3	29.1	2.6	73.2	32.3
КП-30 (Ленарис)	10.6	115	77.8	30.4	2.6	72.3	16.7
КП-23	9.9	115	75.6	30.2	2.4	71.2	21.3
Флагман (St)	7.1	116	91.0	26.7	1.9	71.6	59.1
НСР ₀₅	0.5	2.0	6.7	2.3	0.3	1.4	3.5

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

Данные таблицы показывают, что растения этих сортообразцов адаптированы к условиям выращивания на юге России. Они имеют оптимальный вегетационный период (115-120 дней), фертильность колосков метелки, короткостебельны 77-85 см, устойчивы к полеганию, а также к краснодарской популяции патогена *Pyricularia oryzae* Cav. Метёлка у них слегка пониклая, компактная, длиной 16-19 см. Зерно удлинённое (l/b – 2.3 – 2.4 – 2.6), масса 1000 зёрен около 30 и более грамм. Выход крупы – 71-73 %. При пересчете на 1 га формируют урожайность 9.0-12.0 т зерна (рисунок 2). Сорт риса Альянс в 2017 году передан на Государственное сортоиспытание.



Рисунок 2. Сортообразец риса Ленарис с геном устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta*

В настоящее время сортообразцы КП-30 и КП-23 проходят изучение по комплексу хозяйственно-ценных признаков в конкурсном сортоиспытании с дальнейшей передачей лучшей из них в государственное сортоиспытание. Кроме того, на разных этапах селекционного процесса продолжается изучение новых линий риса с геном резистентности к пирикулярриозу *Pi-ta*.

Таким образом, на основе использования методов молекулярного маркирования проведена интрогрессия эффективного для юга России гена расоспецифической устойчивости к пирикулярриозу *Pi-ta* в генотип отечественного сорта риса Флагман. Среди гибридных растений отобраны формы с оптимальным вегетационным периодом и наибольшей фертильностью колосков метелки. Маркерный анализ, а также фитопатологический тест полученных популяций выявил устойчивые к пирикулярриозу образцы риса, несущие целевые гены в гомозиготном состоянии. Сортообразец риса КП-171-14 (Альянс) в 2017 году передан на государственное сортоиспытание. Сортообразцы КП-30 и КП-23 в 2018 году изучались в КСИ (конкурсное сортоиспытание) третьего года. Они переданы на государственное сортоиспытание. Все три сорта устойчивы к краснодарской популяции патогена *Pyricularia oryzae* Cav., адаптированы к условиям выращивания на юге России, имеет высокую урожайность и качество крупы.

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

Литература

1. Dubina E.V., Mukhina Z.M., Kharitonov E.M., Shilovskiy V.N., Kharchenko E.S., Esaulova L.V., Korkina N.N., Maximenko E.P., Nikitina I.B. Creation of blast disease-resistant rice varieties with modern DNA-markers // Russian Journal of Genetics. 2015. Vol. 51 (8). P. 752-756.

2. Cho Y.G., Eun M.Y., McCouch, Chae Y.A. The semidwarf gene, sd-1, of rice (*Oryza sativa* L.) // II. Molecular mapping and marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet. 1994. Vol 89. P. 54-59.
3. Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection – a new paradigm in plant breeding // Korean, J. Breed. 2003. Vol. 35. P. 133-140.
4. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве// Сельскохозяйственная биология. 1997. №5. С. 3-21.
5. Ashkani S., Rafii M., Sariah M., Siti N.A.A., Rusli I., Harun A., Latif M. Analysis of simple sequence linked with blast disease resistance genes in a segregating repeat markers population of rice (*Oryza sativa*) // Genet Mol Biol. 2011.Vol. 10. P. 1345-1355.
6. Frisch M., Bohn M., Melchinger A.E. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene // Crop science. 1999. Vol. 39. P. 967-975.
7. Matsumura H., Nirasawa S., Kiba A., Urasaki N., Saitoh H., M. Ito, Kawai-Yamada M., Uchimiya H. and Terauchi R. Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells // The Plant Journal. 2003. Vol. 33. P. 425-434.
8. Yu Z.H., Mackill D.J., Bonman J.M., McCouch S.R., Guiderdoni E. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast // Theor. Appl. Genet. 1996. Vol. 93. P. 859-863.
9. Bonman J., Khush G., Nelson R. Breeding rice for resistance to pest // Annu. Rev. Phytopatol.1992. Vol.30, P. 507-528.
10. Дубина Е.В., Костылев П.И., Рубан М.Г., Анискина Ю.В., Шилов И.А., Велишаева Н.С., Есаулова Л.В. Изучение биоразнообразия *Pyricularia oryzae* Cav. в рисосеющих зонах юга России на основе метода ПЦР // Зерновое хозяйство России. 2017. Т. 6 (54). С. 29-35.
11. Харченко Е.С., Дубина Е.В., Гаркуша С.В., Рубан М.Г., Есаулова Л.В., Авакян Э.Р., Балясный И.В. Изучение биоразнообразия популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. на юге России. Научный журнал «Наука Кубани». 2017. № 1. С. 20-27.
12. Мягких Ю.А. Применение молекулярного маркирования для повышения эффективности селекции риса. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Краснодар, 2009.
13. Шилов И.А., Колобова О.С., Анискина Ю.В., Шалаева Т.В., Велишаева Н.С., Костылев П.Н., Дубина Е.В. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикулярриозу риса Pi-ta, Pi-b // Достижения науки и техники АПК. 2016.Т. 30 (8). С. 45-48.
14. Лось Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса // Сельскохозяйственная биология. 1987. Т. 12. С. 15-17.
15. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Research. 1980. Vol. 10. P. 4321-4325.
16. Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Петелина Г.Г. Лабораторный экспресс-метод оценки сортовой устойчивости риса к пирикулярриозу // Большие Вяземы: ВНИИФ. 1990. 12 с.

17. Фролова В.С., Коваленко Е.Д., Наскидашвили Ж.Г., Силичева Т.М. и др. Методические указания по оценке устойчивости сортообразцов риса к пирикулярриозу в инфекционном питомнике. М.: ВАСХНИЛ, 1983. 14 с.
18. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) // Изд. 4-е, перераб. и доп. М.: Колос, 1979. 416 с.
19. Сметании А.П., Дзюба В.А., Апрод А.И. Методики опытных работ по селекции, генетике, семеноводству, семеноведению и контролю за качеством семян риса. Краснодар, 1972. 156с.
20. Практическое руководство по интенсивной технологии возделывания риса в Краснодарском крае. Краснодар, 1986. 38с.
21. Openshaw S.J., Jarboe S.J., Bears W.D. Marker assisted selection in backcross breeding. In: Analysis of molecular marker data. Joint plant Breed // Symp. Ser., Corvallis, Oregon, USA. 1994. P. 41-43.