

М.А. Скаженник, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией физиологии;

В.А. Дзюба, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник

В.С. Ковалев, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заместитель директора;

Е.В. Дубина, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;

Чухирь И.Н., кандидат сельскохозяйственных наук, руководитель группы исходного материала;

Е.Г. Савенко, старший научный сотрудник;

Т.С. Пшеницына, старший научный сотрудник,
*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»,
(350921 г. Краснодар, пос. Белозерный, 3; arrri_kub@mail.ru)*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК – ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ И УЛУЧШЕНИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ СЕЛЕКЦИИ ХОЛОДОУСТОЙЧИВЫХ СОРТОВ РИСА

Для России, страны с умеренным климатом, с прямым посевом риса имеет значение повышение холодостойкости сортов в период прорастания семян и образования всходов. Это свойство позволяет начинать посев риса в более ранние сроки, используя для вегетации растений благоприятный по температуре период, получать дружные и оптимальные по густоте всходы, что дает возможность в большей мере реализовать потенциальную продуктивность сортов. Целью исследования является создать и оценить исходный материал, устойчивый к пониженным положительным температурам для использования его при селекции новых холодоустойчивых сортов риса. Проявление молекулярных маркеров – нейтрально по отношению к фенотипу и их можно обнаружить на любой стадии развития растений в онтогенезе. Методы ДНК-генотипирования и ПЦР-анализов при помощи молекулярных маркеров позволяют ускорить перенос нужных генов в процессе селекции и обеспечить создание новых сортов с комплексом заданных свойств. Поэтому важна роль биотехнологических методов при создании нового холодоустойчивого исходного материала риса. По результатам ПЦР-анализа с использованием SSR-маркеров выделены линии риса с доминантными аллелями генов холодоустойчивости. Получены дигаплоиды методом культуры пыльников *in vitro* и выделены устойчивые формы. Отобраны растения с хозяйственно-ценными признаками. Всесторонняя оценка полученного материала позволила подобрать исходный материал для вовлечения в дальнейший селекционный процесс для создания новых холодоустойчивых сортов риса.

Ключевые слова: рис, сорт, гибрид, холодостойкость, интенсивность роста, морфологические признаки, дигиплоид, микросателлитные маркеры

M. A. Skazhennik, Doctor of Biology, senior researcher;
head of the laboratory of physiology;

V.A. Dzuba, Doctor of Biology, professor,
principal researcher;

V.C. Kovalyov, Doctor of Agricultural Sciences, professor,
ARRRI, deputy director;

E.V. Dubina, Candidat of Biology,
leading researcher;

I.N. Chukhir, Candidat of Agricultural Sciences,
The head of initial stock group;

E.G. Savenko, senior researcher;

T.S. Pshenitsyna, senior researcher;

FSBRI "All-Russian Rice Research Institute"
(350921, Krasnodar, v. Belozerny, 3; arrri_kub@mail.ru)

THE USE OF DNA – TECHNOLOGIES FOR CREATION AND IMPROVEMENT OF INITIAL STOCK FOR BREEDING OF COLD TOLERANT RICE VARIETIES

For Russia countries with a temperate climate, with direct sowing of rice increase of cold tolerant varieties in seed germination and shoot formation are important. This trait allows to begin rice sowing earlier using for plant growing the favorable period by temperature to obtain optimum shoots by density that gives the chance to realize potential efficiency of varieties. A research objective is to create and estimate the initial stock resistant to low positive temperatures for use it for breeding of new cold tolerant rice varieties. Display of molecular markers – is neutral in relation to a phenotype and they can be found out at any stage of development of plants in ontogenesis. Methods of DNA-genotipirovanija and PCR analysis by means of molecular markers allow accelerating carrying over of the necessary genes in the course of breeding and to provide creation of new varieties with a complex of the set properties Therefore the role of biotechnological methods is important at creation new cold tolerant varieties. According to results of PCR analysis by use of SSR – marker lines of rice with dominant alleles of cold resistance genes were screened. Double haploids were obtained by anther culture method in vitro and resistant forms were found. Plants with economically valuable traits were screened. All-round evaluation of obtained material gave the possibility to find initial stock for use breeding process in future for release of new cold resistant rice varieties.

***Keywords:** rice, variety, hybrid, cold tolerance, temperature, germination power, morphobiological traits, double haploid, microsatellite markers.*

Введение. В Краснодарском крае посев риса осуществляется в основном в течение

мая при средней месячной температуре (многолетней) 16,8 °С. Следовательно прорастание семян и образование всходов риса в нашей зоне рисосеяния чаще всего происходит при пониженных температурах. Это ведет к задержке появления всходов, снижению полевой всхожести семян, изреживанию посевов и, как следствие, к уменьшению урожайности [1, 2]. Создание сортов риса с высокой силой роста проростков, способных в условиях пониженных температур образовывать ранние и оптимальные по густоте всходы, приведет к повышению его урожайности. Поэтому исследования проводились с привлечением холодостойкого материала, полученного от Международного Консорциума по исследованиям риса в странах с умеренным климатом [3].

Анализ ДНК, который напрямую характеризует геном сорта, а не его фенотипическое проявление, может дать объективную характеристику растений, регистрации сортов и маркирования хозяйственно-ценных признаков. Применение ДНК технологий и ПЦР-анализов позволит существенно расширить возможности традиционной селекции растений [4, 5, 6, 7].

Цель работы – создать и оценить исходный материал, устойчивый к пониженным положительным температурам для использования его при селекции новых холодоустойчивых сортов риса.

Материалы и методы. Исследования выполнены в 2011-2014 гг. с привлечением холодостойкого материала. Объектом исследований являлись сорта риса Кубань 3, Северный (российские доноры холодостойкости), Odaebyeo, Jinbubyeo (доноры холодостойкости из Южной Кореи), сортообразец IR 83222 – F-11-156 (ИРПИ), 7 гибридов F₁ и 18 BC₁F₁ гетерогенных популяций. Гибридизацию проводили на вегетационной площадке с выращиванием родительских форм в сосудах и в камерах искусственного климата [8]. В лабораторном опыте были определены морфологические признаки проростков дигаметоидов (ДГ), образованных при температуре +14 °С [3]. Получение ДГ линий риса проводилось по методике, разработанной во ВНИИ риса [5]. Анализ гибридных растений проводится с помощью методов молекулярного маркирования на основе ПЦР.

Перенос доминантных аллелей холодостойкости каждого гена в потомстве контролировался SSR-маркерами: RM24545, RM569, местоположение которых определено на коротком плече 9 и 3 хромосом, соответственно.

Образцы ДНК выделяли из свежесрезанной части листовой пластинки гибридных растений в возрасте 4-5 листьев. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5M NaCl, 0.5M EDTA (pH 8.0), 10% SDS [9].

Аmplификацию с целью выявления полиморфизма локусов генов устойчивости

риса проводили в реакционном объеме на 25 мкл следующего состава: 10 нг ДНК, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM дезокситуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 1X ПЦР буфер (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1% Тритон X-100, 2,5 mM MgCl₂), 0,25 единицы 5u Taq-полимеразы, а также 0,23μM каждого праймера.

Параметры ПЦР: 1. Начальная денатурации - 5 минут при 94° С -1 цикл. 2. 35 циклов: денатурация – 35 сек при 94° С; отжиг праймеров 45 сек при 57° С; синтез 30 сек при 72°С. 3. Синтез 5 мин при 72° С -1 цикл.

Продукты амплификации при работе с маркерами на гены холодоустойчивости разделяли в 8% полиакриламидном геле, на основе на основе 1×Трис-боратного буфера (0,09 M Трис, 0,09 M Борной кислоты, 2mM ЭДТА, pH=8,2) при напряжении 220 V в течение 2 часов, в камерах для вертикального электрофореза Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100 фирмы Pharmacia. Визуализация результата реакции амплификации проводилась с использованием бромистого этидия (BrEt, 2,7-диамино-10-этил-9-фенилфенатридинийбромид, хомидий бромид). BrEt способен интеркалировать в двойную спираль ДНК и при таком связывании усиливается флюоресценция в проходящем УФ свете. Гелевые пластины помещали на 20-40 минут в раствор бромистого этидия 5мкг/мл, и фотографируют в УФ свете.

Методы выращивания, фенологические наблюдения, биометрический анализ растений проводили согласно методике опытных работ по селекции и семеноводству [10]. Полученные данные были обработаны методами биометрической статистики [11].

Результаты. Анализ гибридных растений с помощью методов молекулярного маркирования на основе ПЦР.

Как отмечалось ранее [12] в 2012 году размножены BC₁F₁ гибридные зерновки риса, полученные от насыщающих скрещиваний в 2011 году между ранее созданными гибридами (2009-2010 гг.) и стандартами на холодостойкость Jinbubyeo и Odaebueo по 18 комбинациям. В лабораторном опыте проведена их оценка на холодостойкость в фазу прорастания семян при использовании двух признаков: скорости прорастания семян и интенсивности роста проростков при температуре 14°С. По этим фоновым признакам наиболее близким к контролю был гибрид Кубань 3 / Северный.

Контроль за наличием донорных аллелей генов холодостойкости в гибридном потомстве проводили с помощью ДНК-анализа.

По результатам ПЦР-анализа с использованием SSR – маркеров, тесно сцепленных с признаком холодостойкости, удалось выделить образцы риса, которые в своём генотипе несли донорные аллели целевых генов (рис.1 - 3).

На рисунке 1 представлены результаты ПЦР-анализа BC₁F₁ гибридов риса, полученные

нами в рамках программы Консорциума стран с умеренным климатом.

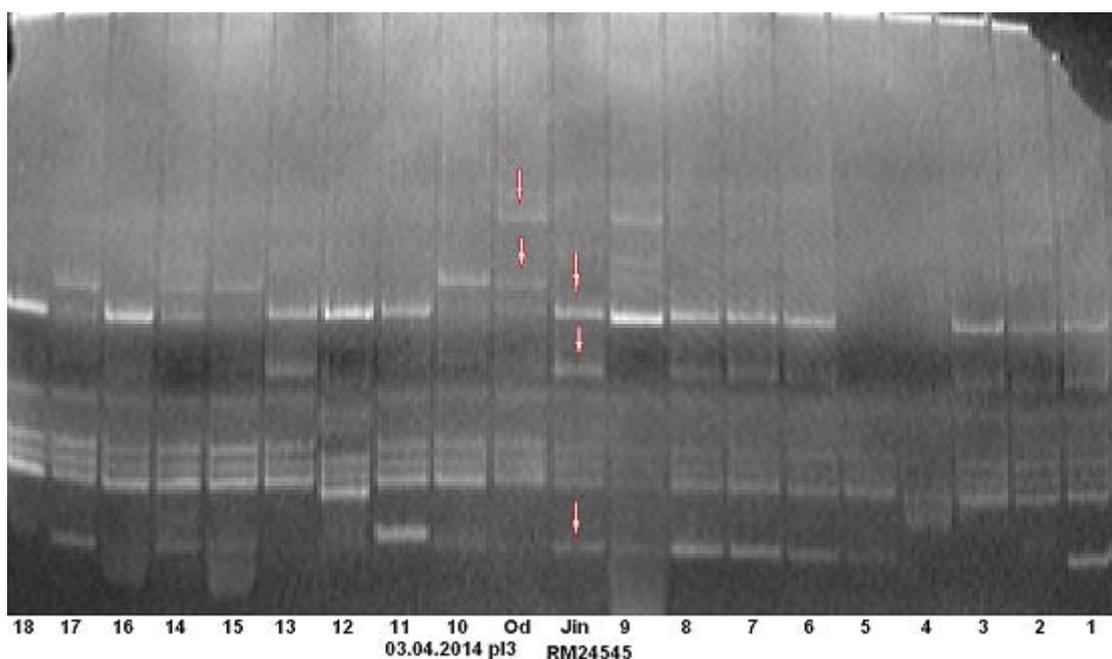


Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа по локусу RM24545

Примечание: 1-18 гибридные растения риса BC₁F₁ популяции;

Od – Odaebuео сорт - донор, Jin- Jinbubyео сорт-донор

Из рисунка 1 видно, что гибридное растение под номером 2 BC₁F₁ популяции (Odaebuео / Jinbubyео // Jinbubyео) имеет доминантную аллель Cг целевого гена аналогично сорту-стандарту Odaebuео. Гибридные растения 6 (Новатор/ Jinbubyео // Новатор), 7 (Новатор / Jinbubyео // Jinbubyео), 8 (Jinbubyео / Новатор // Новатор) и 11 (Серпантин / Jinbubyео // Jinbubyео) проявляют фенотип аналогично стандарту Jinbubyео.

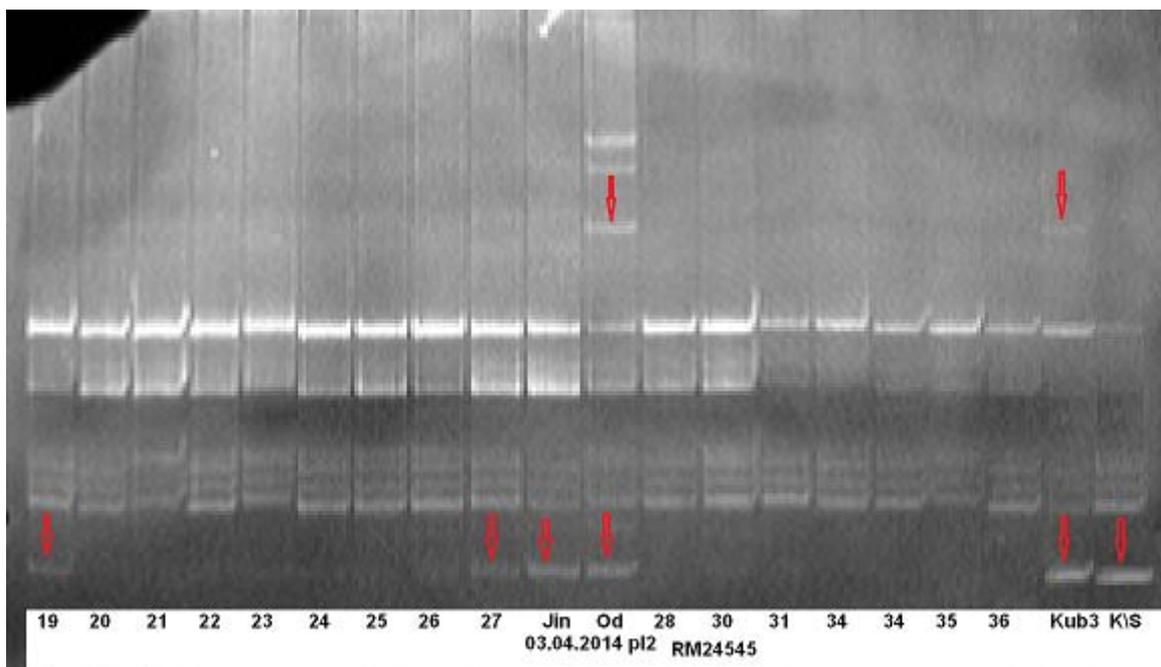


Рис.2. Результаты ПЦР-анализа по локусу RM24545

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

Из рисунка 2 видно, что образцы 19, 27 и K/S имеют в своем генотипе специфичный ПЦР – продукт по аналогии донора Jimbueo. Российский сорт Кубань 3 в генотипе имеет аналогичные аллели устойчивости к холоду Cr – Cold resistance, как у сорта-стандарта Odaebueo.

На рисунке3 представлены результаты апробации SSR-маркера RM 569.

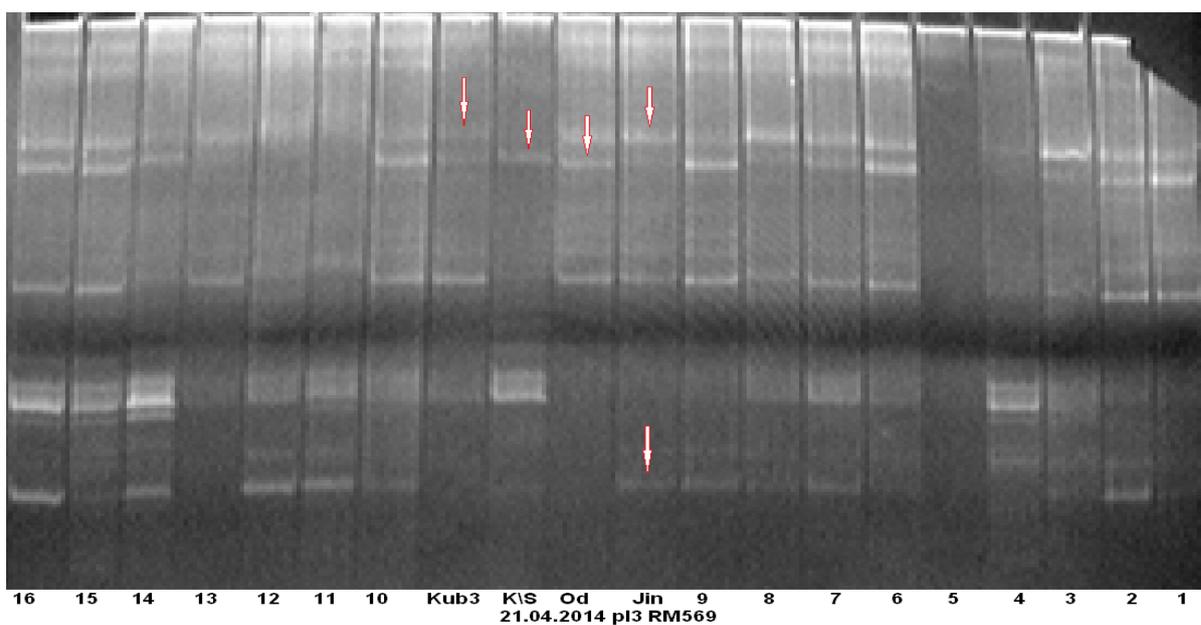


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа по локусу RM 569

Note: 1- 16 – гибридные растения риса BC₁F₁ популяции; Od - Odaebueo (st), Jin- Jinbubueo (st), Kub3 – сорт риса Кубань 3, K/S- гибридная комбинация Кубань 3/Северный

Из электрофореграммы видно, что гибридные растения под номерами 1,13 (Jinbubueo / Серпантин // Серпантин; Кубань 3/Северный) и сорт Кубань 3 имеют генотип CrCr как у холодостойкого сорта – донора Odaebueo. Гибридные растения № 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 18 – проявляют доминантный эффект CrCr аналогично сорту-донора Jinbubueo. Остальные гибридные растения (6,15,16) имеют смешанный спектр гетерозиготности Crcr, который получился в результате серий скрещиваний отечественных сортов с образцами-донорами Odaebueo, Jinbubueo, а также с российскими генотипами Кубань 3 и Северный. Не обнаружено донорных аллелей генов холодостойкости в гибридных растениях 4 и 5. Таким образом, по результатам ПЦР-анализа с использованием SSR-маркеров (RM24545, RM569) отобраны линии риса с доминантными аллелями генов холодостойкости (CrCr).

1. Характеристика растений гибридов F₅ и ДГ линий по основным количественным признакам (вегетационный опыт, 2014 г)

Гибрид	Вегетационный период, дни	Высота растений, см	Масса 1000 зерен, г (на с.в.)	Число зерен на метелке, шт.	Пустозёрность, %	Масса зерна, г	
						с гл. метёлки	с растения
гибриды F ₅							
Jinbubueo / Новатор	124	94,0	23,31	76,1	17,33	2,35	4,85
IR 83222 – F-11-156 (I)	132	84,4	23,72	51,0	25,06	1,41	3,58
Серпантин / Jinbubueo	114	95,1	23,38	65,9	11,43	2,31	4,91
Jinbubueo / Серпантин	114	81,5	22,43	60,9	17,69	1,92	4,67
Odaebueo / Новатор	113	85,1	22,98	58,7	42,39	1,65	4,30
IR 83222 – F-11-156(II)	131	80,3	23,77	53,2	23,72	1,65	4,03
Jinbubueo st	125	74,6	24,21	51,1	14,76	1,63	4,62
Odaebueo st	119	77,9	22,71	48,8	9,62	1,58	4,44
дигаплоидные линии из гибридов первого поколения							
Jinbubueo x Новатор Л 126	119	60,6	21,92	51,6	24,50	1,58	5,54
Jinbubueo x Новатор Л 158	111	78,0	21,09	55,0	19,37	1,84	5,02
Jinbubueo x Новатор Л 170	109	107,2	18,65	83,3	16,42	2,25	5,31
Jinbubueo x Новатор Л 176	110	78,3	20,65	58,0	27,30	1,83	4,09
Новатор x Jinbubueo Л 92	118	88,4	23,42	68,0	6,05	2,19	5,26
HCP ₀₅ var.		1,7	1,6	1,8	-	0,17	1,9

Изучение гибридов F₅ и ДГ линий и отбор форм с хозяйственно-ценными признаками.

В 2012 году была проведена оценка растений гибридов третьего поколения на устойчивость к пониженным температурам в период мейоза, путем помещения в

климатическую камеру с температурой воздуха и воды +17 °С в течение 10 дней перед цветением метелок. Контрольные и опытные растения (после обработки) вегетировали на открытой площадке до полного созревания семян.

После уборки растений был проведён их биометрический анализ по полной схеме количественных признаков. Статистическую обработку проводили по двум признакам: числу зёрен с главной метёлки и массе зерна с главного соцветия. Отбор лучших растений по продуктивности проводили с учётом среднего значения числа и массы зерна с метёлки плюс удвоенное значение сигмы (среднее квадратическое отклонение). На основании проведенного отбора и оценки их на холодостойкость, лучшие растения (контрольные и опытные) изучались в вегетационном опыте в 2013 г (F₄) и затем в 2014 г (F₅) с целью повторного отбора (таблица 1).

Также в этом опыте изучались холодостойкие дигаплоидные линии (ДГ), полученные из F₁ гибридов для скрининга растений с хозяйственно-ценными признаками. В большинстве своем – это среднеспелые и среднепозднеспелые особи с периодом вегетации до 125 дней. Соломина прочная, устойчивая к полеганию, кущение проявляет доминантный эффект и не превышает 3,8 продуктивных стеблей на одно растение. Высота растений в большинстве случаев не достигает 100 см.

При анализе структуры урожая гибридов F₅ выделены высокопродуктивные особи комбинации Jimbubueo / Новатор с массой одной метелки в среднем 2,35 г продуктивностью растений до 4,85 г. В гибриде Серпантин / Jimbubueo отобраны биотипы с массой главной метелки 2,31 г и продуктивностью растения 4,91 г.

Из дигаплоидных линий выделяется линия Л 92 Новатор x Jimbubueo, которая имеет массу метелки 2,19 грамма, продуктивность растений до 5,26 г, массу 1000 зерен 23,42 г и стерильных колосков 6,0 %.

Таким образом, для селекционных целей, направленных на создание холодостойких сортов риса можно рекомендовать гибриды и ДГ линии, которые в своем генотипе несут доминантные гены СгСг в гомозиготном состоянии и сочетают устойчивость к стрессовым факторам среды с высокой продуктивностью.

Все растения гибридов F₅ и ДГ линий были проанализированы по полной схеме количественных признаков. Статистическую обработку проводили аналогично, как в опыте 2012 года (таблица 2).

Например, в гибриде F₅ Jimbubueo /Новатор по 20 растениям средняя масса зёрен с главной метёлки была 2,35, сигма 0,19 (таблица 2). Критерий отбора: $2,35 + (0,19 \times 2) = 2,35 + 0,38 = 2,73$. Для каждого растения гибрида F₅ критерий отбора по массе зёрен с метёлки составляет 2,73 г. Все растения, в которых масса зёрен с метёлки будет больше 2,73 г,

подлежат первоначальному отбору. В этом гибриде из 20 растений отобрано только 3 (1,2,16). Эффективность отбора составила 15,0 %.

2. Результаты статистической обработки растений гибридов F₅ и ДГ линий

Гибрид	№ п/п	Масса зерна с главной метелки, г		Количество зерен с главной метелки, шт.	
		$\bar{x} \pm Sx$	δ	$\bar{x} \pm Sx$	δ
гибриды F ₅					
Jinbubyeo / Новатор	1	2,29±0,13	0,17	94,0±5,62	17,4
	2	2,41±1,01	0,21	86,7±11,31	35,2
IR 83222 – F-11-156 (I)	3	1,77±0,25	0,20	86,7±11,31	26,3
	4	1,18±0,08	0,50	61,3±8,52	7,6
	5	1,27±0,18	0,21	45,0±2,31	14,8
Серпантин / Jinbubyeo	6	2,6±0,17	0,21	93,5±5,51	17,4
	7	2,03±0,12	0,30	80,9±10,52	33,4
Jinbubyeo / Серпантин	8	2,28±0,12	0,17	88,4±12,3	34,6
	9	1,82±0,09	0,40	74,3±3,62	12,9
	10	1,65±0,13	0,30	62,0±3,53	9,4
Odaebueo / Новатор	11	1,38±0,27	0,70	50,4±3,14	14,9
	12	1,79±0,27	0,80	66,7±5,19	16,5
	13	1,7±80,26	0,80	62,5±3,62	10,1
IR 83222 – F-11-156 (II)	14	1,53±0,35	0,20	56,2±3,32	15,2
	15	1,75±0,23	0,60	60,5±3,19	9,0
	16	1,67±0,15	0,40	62,7±3,65	9,7
дигиплоидные линии из гибридов первого поколения					
Jinbubyeo x Новатор Л 158	17	1,95±0,09	0,30	77,5±3,95	12,5
	18	1,80±0,08	0,30	76,2±4,16	13,1
	19	1,80±0,11	0,40	66,7±5,18	16,4
Jinbubyeo x Новатор Л 170	20	2,36± 0,05	0,17	105,0 ±3,12	9,8
	21	2,46± 0,10	0,33	104,9± 4,44	14,1
	22	1,94± 0,16	0,48	93,1± 6,12	18,3
Jinbubyeo x Новатор Л 176	23	1,89± 0,27	0,80	80,1± 10,4	33,0
	24	1,44 ±0,21	0,70	64,5± 8,71	27,5
	25	2,18 ±0,09	0,15	90,2± 5,91	16,9
Новатор x Jinbubyeo Л 92	26	2,05± 0,13	0,31	81,1±10,52	34,1
	27	2,33± 0,06	0,18	90,9±5,47	17,2

Из всех изученных популяций, где было 270 растений, отобрали 27 форм, эффективность скрининга составила 10,0 %. Они переданы в селекционный питомник для дальнейшего изучения.

Получение холодостойких дигиплоидных линий из гибридов первого поколения.

В лаборатории физиологии была проведена оценка константных линий риса (108 ДГ линий), созданных из гибридов первого поколения в 2014 году на холодостойкость в фазе прорастания семян при использовании двух показателей: скорости прорастания семян и интенсивности роста проростков при температуре +14°C. В результате выделено 11

линий устойчивых к холоду с количеством семян от 19 до 183 штук, 63 линии среднеустойчивых и 34 - неустойчивых.

Параметры роста проростков холодостойких линий из гибридов первого поколения приведены в таблице 3.

3. Характеристика проростков холодоустойчивых дигамплоидных линий из гибридов первого поколения (2014 г)

№№ пп	№ линии	Длина колеоптиля на 13 сутки, см	Продолжи- тельность прораста- ния в сутках	Оценка на холодостой- кость в баллах	Примечание (кол-во семян, шт.)
1	2	3	4	5	6
F ₁ Jinbubyeo x Серпантин					
1	138	0,81	6,89	4	53
2	139	0,80	5,87	4	104
3	140	0,80	4,67	4	178
4	141	0,87	5,18	4	110
F ₁ Серпантин x Jinbubyeo					
5	71	0,80	5,14	4	85
F ₁ Новатор x Jinbubyeo					
6	104	0,80	5,53	4	183
7	113	0,87	5,36	4	147
8	116	0,83	5,72	4	156
9	118	0,81	5,36	4	150
10	121	0,80	6,00	4	151
F ₁ Odaebueo x Новатор					
11	40	0,80	6,70	4	19
St. Кубань 3		1,00	5,00	4	

Дигамплоидные линии на 13 сутки различались по величине проростка, которая варьировала от 0,80 до 0,87 см, а скорость прорастания изменялась от 4,7 до 7,0 суток. По этим признакам наиболее близкой к контролю были линии Л 141 (F₁ Jinbubyeo x Серпантин) и Л 113 (F₁ Новатор x Jinbubyeo). Поэтому эти линии заслуживают включения их в исходный материал по созданию холодостойких сортов риса. Устойчивые линии с достаточным количеством семян будут высеяны в вегетационном опыте для отбора растений с хозяйственно-ценными признаками.

В 2014 году проведено размножение 81 малозерных ДГ линий, полученных методом культуры пыльников *in vitro* в 2013 году, т.к. в виду незначительного количества зерновок не предоставлялась возможность их анализа. Размноженные линии будут проанализированы в 2015 году в лаборатории физиологии. Это линии, полученные на основе генетической плазмы риса, представленной странами, ведущими исследования на холодостойкость, и из коллекции ВНИИ риса.

В культуре пыльников *in vitro* создана 1 гибридная комбинация, полученная во ВНИИ риса в результате скрещивания между сортами риса российской селекции Северный и Кубань 3. На искусственные питательные среды было инокулировано 4540 пыльников этой комбинации. Каллусообразование индуцировали 5,68 % пыльников (таблица 4).

4. Каллусогенез гибридной комбинации Кубань 3 / Северный, используемой для создания холодостойких сортов риса

Гибридная комбинация	Количество высаженных пыльников, шт.	Каллусогенез, %	Регенерация, %
Кубань 3 / Северный	4540	5,86	0,93

Из морфогенного каллуса удалось получить 25 зеленых растений. Из двух линий уже получены семена, остальные растения находятся на разных стадиях развития. Работа с данной комбинацией продолжается. В термостатах находятся каллусные культуры, которые в необходимые сроки высаживаются на регенерирующие питательные среды для стимуляции процессов органогенеза.

Выводы. По результатам ПЦР-анализа с использованием SSR-маркеров выделены линии риса с доминантными аллелями CrCr генов холодостойкости. Получены дигаплоиды методом культуры пыльников *in vitro* и выделены устойчивые формы. Отобраны растения с хозяйственно-ценными признаками. Всесторонняя оценка полученного материала позволила подобрать исходные линии для вовлечения их в дальнейший селекционный процесс для создания новых холодостойких сортов риса.

Литература

1. Воробьев, Н.В. Физиология прорастания семян риса / Воробьев Николай Васильевич: автореф. дис. ... док. биол. наук. - М., ТСХА, 1986. – 31 с.
2. Воробьев, Н.В. Физиологические основы прорастания семян риса и пути повышения их всхожести / Н.В. Воробьев. – Краснодар, 2003. – 116 с.
3. Скаженник, М.А. Создание холодостойкого исходного материала для селекции риса в рамках Консорциума стран с умеренным климатом / М.А. Скаженник, Н.В. Воробьев, В.А. Дзюба [и др.] // Зерновое хозяйство России. – 2013. - № 3(27). – С. 11-15.
4. Бутенко, Р.Г. Технология *in vitro* в сельском хозяйстве / Р.Г. Бутенко // С.-х. биол. – 1983. - № 5. – С. 3-7.
5. Мылышева, Н.Н. Получение, оценка и отбор дигаплоидных линий риса с хозяйственно ценными признаками / Н.Н. Малышева, Е.Г. Савенко, В.А. Глазырина [и др.] //

Рисоводство. – 2012. - № 2(21). – С. 14-18.

6. Глазко, В.И. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, ДНК-экология, протеомика, метаболика / В.И. Глазко, Т.В. Глазко. – Краснодар, 2003. – 640 с.

7. Дзюба, В.А. Использование инновационных подходов в селекции риса / В.А. Дзюба, Л.В. Есаулова, И.Н. Чухирь // Научно-инновационные основы развития рисоводства в Казахстане и странах зарубежья: материалы Международной научно-практической конференции. – Кызылорда. – 2012. – С. 75-78.

8. Лось, Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса. //Лось Г.Д.// Сельскохозяйственная биология. – 1987, № 12. – С.107 -109.

9. Murray, M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // Nucleic Acids Research. – 1980. – № 10. – P. 4321-4325.

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

11. Дзюба, В.А. Многофакторные опыты и методы биометрического анализа экспериментальных данных / В.А. Дзюба. – Краснодар, 2007. – 76 с.

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

Literature

1. Vorobyov, N.V. Physiology of rice seed germination of of / Vorobyov Nikolai Vasilyevich: abstract of thesis ...D.Sc. - M, T.A.A., 1986. – 31 p.

2. Vorobyov, N.V. Physiological bases of rice seed germination and methods of germination power increase // N.V. Vorobyov. – Krasnodar, 2003. – 116 p.

3. Skazhennik, M.A. Creation of cold tolerant initial stock for rice breeding in the frame work of Consortium of temperate climate countries / M.A Skazhennik, N.V. Vorobyov, V.A. Dzuba [et al.] // Grain crop farms of Russia. – 2013. – № 3(27). – P. 11-15.

4. Butenko, R.G. Technology in vitro in agriculture / R.G. Butenko // Agriculture biology. – 1983. – № 5. – P. 3-7.

5. Malysheva, N.N. Obtaining, evaluation and screening of rice double haploid lines with good economical traits / N.N. Malysheva, E.G, Savenko, V.A. Glazyrina, [et al.] // Rice growing. – 2012. – № 2(21). – P. 14-18.

6. Glazko, V.I. Vvedenie in genetics, biocomputer science, DNA-technology, DNA-ecology, proteomika, metabolica / V.I. Glazko, T.V. Glazko. – Krasnodar, 2003. – 640 p.

7. Dzuba, V.A. The use of innovative approaches in rice breeding / V.A. Dzuba, L.V. Yesaulova,

- I.N. Chukhir // Scientifically-innovative bases of development рисоводства in Kazakhstan and the abroad countries: materials of the International scientifically-practical conference. – Kyzylorda. – 2012. – С. 75-78.
8. Los, G.D. Perspective method of rice hybridization /G.D. Los:// Agriculture biology. – 1987. – № 12. – P.107 -109.
9. Murray, M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // Nucleic Acids Research. – 1980. – № 10. – P. 4321-4325.
10. Smetanin, A.P. Methods of experiments on breeding, seed-production and rice seed quality control / A.P. Smetanin, V.A. Dzuba, A.I. Aprod // Krasnodar, 1972. – 156 p.
11. Dzuba, V.A. Multifactor experiments and methods of biometric analysis and experimental data / V.A. Dzuba. – Krasnodar, 2007. – 76 p.
12. Skazhennik, M.A. Creating of tolerant initial material of rice for selection of the cultivars in consortium of countries with moderate climate / M.A Skazhennik, N.V. Vorobyov, V.A. Dzuba [et al.] // Grain crop farms of Russia. – 2014. – № 5(35). – P. 11-17