

**ПЦР ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ  
РАЗНООБРАЗИЕ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*  
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АГРОЦЕНОЗА САХАРНОЙ СВЁКЛЫ  
(*BETA VULGARIS* L.)****Н. В. Безлер<sup>1</sup>, А. С. Хуссейн<sup>2</sup>, М. Ю. Петюренко<sup>2</sup>**<sup>1</sup>*Воронежский государственный университет*<sup>2</sup>*Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара им. А.Л. Мазлумова*

Поступила в редакцию 16.02.2016 г.

**Аннотация.** Проведена молекулярно-генетическая идентификация аборигенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* выделенных из почвы, ризосферы и поверхности корней сахарной свёклы. ПЦР анализ с использованием родоспецифического праймера PA-GS-F/PA-GS-R показал, что все исследованные образцы чистой культуры бактерий характеризовались наличием одного ампликона, характерного для бактерий *Pseudomonas species*. ПЦР анализ с видоспецифичным праймером 16SPSEfluF/16SPSER для идентификации *P. fluorescens* дал положительный результат только с ДНК четырёх штаммов. Проведен молекулярно-генетический анализ с использованием четырёх комбинаций RAPD-праймеров для выявления генетического разнообразия штаммов бактерий *P. fluorescens*. Для четырёх изученных штаммов был выявлен специфический набор ДНК-фрагментов, отличающих их друг от друга.

**Ключевые слова:** *P. fluorescens*, сахарная свёкла, полимеразная цепная реакция (ПЦР), RAPD-праймеры.

**Abstract.** Indigenous strains of *Pseudomonas* isolates from soil, rhizosphere and root surfaces of sugar beets were identified by molecular genetic methods. PCR analysis using a specific primer PA-GS-F/PA-GS-R showed that all investigated samples of pure cultures have one amplicon in agarose gel as a typical *Pseudomonas species*. Another analysis with a specific primer 16SPSEfluF/16SPSER for identification of *Pseudomonas fluorescens* gave positive results with only four of them. A combinations of RAPD-primers to detect the genetic diversity of these strains were used and analyzed. A specific set of DNA fragments that distinguish them from each other were showed.

**Keywords:** *P. fluorescens*, sugar beet, polymerase chain reaction (PCR), RAPD-primers.

К настоящему времени, в литературе накоплен большой материал о бактериях, обладающих совокупностью полезных для растений свойств. Их относят к группе PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – ризобактерии, способствующие росту растений) [1]. Среди этой группы широко представлены бактерии рода *Pseudomonas*. Ризосферные псевдомонады активно колонизируют корни растений, могут синтезировать разнообразные антибиотики и сидерофоры, продуциро-

вать фитогормоны, а некоторые могут обладать фитопатогенной активностью [2]. Большинство исследований посвящено изучению антагонистического воздействия псевдомонад выделенных из ризосферы сахарной свёклы на фитопатогенные грибы за счет синтеза вторичных метаболитов, сидерофоров, цианида и др. Ранее было показано, что штамм ML5 *P. fluorescens*, выделенный из околоплодника сахарной свёклы и штамм *P. putida* R20 предотвращают заселение перикарпа семян сахарной свёклы грибом *Pythium ultimum* [3]. В другой работе показано, что штамм *P. flu-*

---

© Безлер Н. В., Хуссейн А. С., Петюренко М. Ю., 2016

*orescens* F113, выделенный из ризосферы сахарной свёклы, способен подавлять рост некоторых микроскопических грибов, в том числе и таких фитопатогенов как *Phoma betae*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum* [4].

У ризосферных псевдомонад выявлена и хорошо изучена способность к синтезу индолил-3-уксусной кислоты, которая в свою очередь стимулирует развитие корневой системы растений [5]. Представители рода *Pseudomonas* принимают активное участие в разложении труднодоступных фосфатов, осуществляя их перевод в растворимые соединения, тем самым оказывая положительное действие на фосфорное питание растений [6].

В течение нескольких лет полемик о том, способны ли бактерии рода *Pseudomonas* принимать участие в азотфиксации было показано, что некоторые штаммы рода *Pseudomonas* могут быть добавлены в список азотфиксаторов на основании выявления у них нитрогеназной активности, а также присутствия *nifH* гена, ответственного за азотфиксирующую способность [7].

Таким образом, установлено, что бактерии рода *Pseudomonas* могут быть использованы как агенты биологической защиты, продуценты различных фитогормонов и витаминов. В то же время выявлена и их способность улучшать фосфорное и азотное питание растений. На данный момент, в литературе относительно мало данных, посвященных распространению и видовому разнообразию бактерий рода *Pseudomonas* в посевах сахарной свёклы.

В связи с тем, что штаммы бактерий могут обладать разной способностью к колонизации корней растений, для характеристики сред обитания, из которых нами были выделены штаммы, мы придерживались терминов "ризосфера" и "ризоплана". Под первым мы характеризовали слой почвы (2-3 мм) плотно прилегающий к корням растений, а под вторым – непосредственно поверхность корней [8].

Цель работы – поиск и выделение бактерий рода *Pseudomonas* из агроценоза сахарной свёклы и выявление среди них вида *P. fluorescens*, как одного из наиболее перспективных для практического использования в сельском хозяйстве из группы PGPR и изучение их генетического разнообразия.

## МЕТОДИКА ЭКСПИРЕМЕНТА

*Отбор проб для выделения бактерий рода Pseudomonas в полевых условиях.* Исследования были проведены в весенне-осенний период в по-

севах сахарной свёклы на базе Всероссийского научно-исследовательского института сахарной свёклы и сахара имени А. Л. Мазлумова. Почва – чернозем выщелоченный среднесуглинистый среднегумусный на лёссовидных карбонатных суглинках. Отбор проб осуществляли в фазе смыкания междурядий, начале периода интенсивного роста культуры и перед уборкой корнеплодов.

Для выделения бактерий рода *Pseudomonas* пробы почвы отбирали буром в междурядьях на глубину 0-20 см. Для выделения новых штаммов из зоны ризосферы и ризопланы растения выкапывали целиком. Отобранные образцы помещали в стерильный пластиковый пакет, который в тот же день доставляли в лабораторию для дальнейших исследований.

*Выделение бактерий рода Pseudomonas в лабораторных условиях.* Для выделения бактерий из почвы навеску массой 10 г соблюдая условия асептики переносили в колбу с 90 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, встряхивали на ротаторе 20 минут и готовили ряд разведений. Из соответствующих разведений делали посев на чашки Петри с селективной средой King В методом поверхностного посева с целью получения изолированных колоний [8,9]. Выделение бактерий из ризосферы осуществляли по методу Красильникова, а культивирование микроорганизмов ризопланы методом Березовой [10].

Спустя 24 часа после начала роста изолятов чашки просматривали в УФ-лучах и в случае выявления колоний с флюоресцирующим пигментом их переносили бактериологической петлей на чистую агаризированную среду для дальнейшего изучения. По способности бактерий к образованию флюоресцирующего пигмента мы отобрали 13 штаммов. Им присвоены в коллекции номера 36, 67, 75, 77, 91, 91/2, 97, 103, 110, 113, 115, 116, 117. Так же нами был выделен штамм под номером 2 с поверхности корней озимой пшеницы, как предшественника сахарной свёклы в севообороте, так же обладавший способностью к образованию флюоресцирующего пигмента.

Распределение выделенных штаммов по средам обитания было следующим: штаммы под номерами 67, 103 были выделены из почвы, штаммы 36, 77, 110, 113 – выделены из ризосферы, а штаммы 75, 91, 91/2, 97, 115, 116, 117 – из ризопланы (рис.1).

*Выделение бактериальной ДНК.* 2 мл суточной культуры (18 ч) центрифугировали при 8000 г в течение 15 минут и удаляли надосадочную

жидкость. Ресуспендировали бактериальный осадок в растворе ЭДТА с сахарозой и добавляли 100 мкл 10 %-ного SDS. Время инкубации составляло 30 минут при 65°C. Добавляли 600 мкл смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1). Перемешивали и центрифугировали пробу при 8000 g 10 минут и затем переносили супернатант в новую пробирку. Осаждали ДНК с использованием 2 объемов 96 %-ого этанола и после инкубировали при -20°C, удаляли супернатант и сушили осадок ДНК в течение 30 минут. После растворения ДНК в 50 мкл раствора ТЕ добавляли 20 мкл раствора РНК-азы до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали пробу в течение 1 часа при 37°C. Промывали пробу смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и переносили верхнюю часть (содержащую ДНК) в новую пробирку. ДНК осаждали с использованием 2 объемов 96 %-ого этанола и инкубировали при -20°C 1 час. Полученный осадок ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Концентрацию ДНК оценивали по результатам электрофоретического разделения (1 мкл аликвоты) в 1 %-ном агарозном геле [11, 12].

**Полимеразная цепная реакция.** Для проведения ПЦР использовали сухую смесь реагентов для амплификации («БИОКОМ»). ПЦР смесь (20 мкл) содержала бактериальную ДНК (5 мкл), 10 мкл Diluent буфера, 5 мкл праймера. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе "Genius". Для идентификации бактерий *Pseudomonas* использовали родоспецифический праймер PA GS-F/PA GS-R. Ожидаемый продукт амплификации с данным праймером – 618 п.н. [13]. Условия реакции были следующие: предварительная денатурация – 2 мин при 95°C; затем 25

циклов: 20 с при 94°C, температура отжига (по табл. 1) – 20 с, удлинение цепи – 40 с при 72°C; элонгация – 1 мин при 72°C. Охлаждение пробы при 4°C.

Для идентификации штаммов *P. fluorescens* использовали видоспецифический праймер 16SPSEfluF/16SPSER. Ожидаемый продукт амплификации с данным праймером – 850 п.н. [14]. Условия реакции были следующие: предварительная денатурация – 5 мин при 94°C; затем 30 циклов: 1 мин при 94°C, температура отжига (по табл. 1) – 1 мин, удлинение цепи – 2 мин при 72°C; элонгация – 2 мин при 72°C. Охлаждение пробы при 4°C.

Для изучения генетического разнообразия выделенных штаммов *P. fluorescens* нами были использованы следующие одноцепочечные RAPD- праймеры: OP-AN9, AB1-4, OP-09, UBC 278 (табл. 2).

Условия реакции были следующие: предварительная денатурация – 5 мин при 94°C; затем 40 циклов: 45 сек при 94°C, 34.5°C – 45 сек, удлинение цепи – 80 сек при 72°C; элонгация – 10 мин



Рис. 1. Распределение бактерий рода *Pseudomonas* в системе почва – ризосфера – ризоплана сахарной свёклы

Таблица 1

Последовательность праймеров

Праймер	Последовательность (5'–3')	Штамм	Температура отжига, (°C)	Размер продукта (п.н.)
PA GS-F PA GS-R	GACGGGTGAGTAATGCCTA CACTGGTGTTCCTTCCTATA	<i>Pseudomonas</i> species	54	618
16SPSEfluF 16SPSER	TGCATTCAA AACTGACTG AATCACACCGTGGTAACCG	<i>P. fluorescens</i>	55	850

Таблица 2

Последовательность RAPD-праймеров

RAPD-праймер	Последовательность (5'–3')	Температура отжига, (°C)
OP-AN9	5'-GGGGGAGATG-3'	34.5
AB1-4	5'-GGACTGGAGT-3'	34.5
OP-AN9	5'-TCGGTCATAG-3'	34.5
UBC 278	5'-GACAACAGGA-3'	34.5

при 72°C. Охлаждение пробы при 4°C [15].

Электрофорез был осуществлен в 1.5 %-ном агарозном геле, в ТВЕ-буфере и бромистого этидия. Визуализация результатов проводили под УФ-лучами.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный нами ПЦР анализ с родоспецифическим праймером для определения *Pseudomonas species* показал для всех изученных штаммов наличие ампликона размером 618 п.н. Для всех образцов это был единственный ПЦР-продукт, что свидетельствует о сходстве их генетического материала. Таким образом, по результатам ПЦР-амплификации геномной ДНК штаммов под номерами 2, 36, 67, 75, 77, 91, 91/2, 97, 103, 110, 113, 115, 116, 117 с праймером PA-GS-F/PA-GS-R был получен единственный ампликон размером 618 п.н., что позволило отнести эти штаммы к роду *Pseudomonas sp.* (рис. 2, 3, 4).

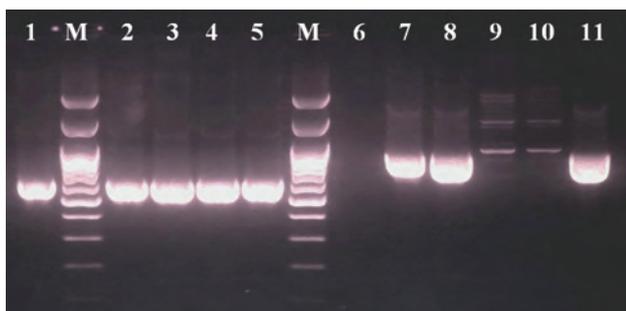


Рис. 2 Электрофореграмма ПЦР-продуктов полученных с праймерами PA-GS-F/PA-GS-R (линия 1 – 5) и 16SPSEfluF/16SPSER (линия 6 – 11). Линия 1 – положительный контроль (*P. fluorescens*); линия 2 – штамм 36; линия 3 – штамм 113; линия 4 – штамм 115; линия – 5 штамм 117; линия 6 – отрицательный контроль (вода); линия 7 – положительный контроль (*P. fluorescens*); линия 8 – штамм 36; линия 9 – штамм 113; линия 10 – штамм 115; линия 11 – штамм 117; М – маркер (100 п.н.-3000 п.н.)

Амплификация ДНК этих же штаммов с видоспецифическим праймером для выявления *P. fluorescens* показала, что только 4 штамма дали ожидаемый продукт амплификации размером 850 п.н. (рис. 2, 3, 5). Сравнительный анализ полученных ампликонов с этим праймером показал, что для остальных штаммов были выявлены дополнительные продукты амплификации, являющиеся неспецифическими для *P. fluorescens*. Таким образом, по результатам ПЦР-амплификации геномной ДНК штаммов с праймером 16SPSEfluF/16SPSER

получен единственный ампликон размером 850 п.н. только для штаммов под номерами 2, 36, 116, 117, что позволило отнести их к виду *P. fluorescens*.



Рис. 3 Электрофореграмма ПЦР-продуктов полученных с праймерами PA-GS-F/PA-GS-R (линия 1 – 6) и 16SPSEflu F/ 16SPSE R (линия 7 – 12). Линия 1 – штамм 75; линия 2 – штамм 77; линия 3 – штамм 91/2; линия 4 – штамм 110; линия 5 – штамм 116; линия 6 – отрицательный контроль (вода); линия 7 – отрицательный контроль (вода); линия 8 – штамм 75; линия 9 – штамм 77; линия 10 – штамм 91/2; линия 11 – штамм 110; линия 12 – штамм 116; М – маркер (100 п.н.-3000 п.н.)

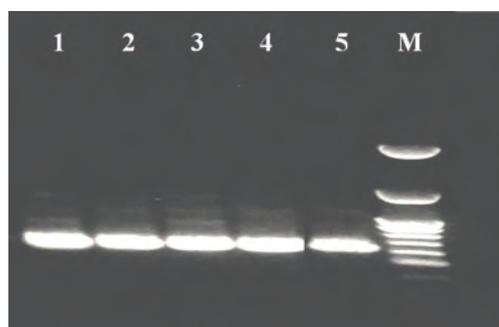


Рис. 4 Электрофореграмма ПЦР-продуктов полученных с праймером PA-GS-F/PA-GS-R. Линия 1 – штамм 67; линия 2 – штамм 91; линия 3 – штамм 97; линия 4 – штамм 103; линия 5 – положительный контроль (*P. fluorescens*); М – маркер (100 п.н.-3000 п.н.)

Таким образом, штаммы под номерами 2, 36, 67, 75, 77, 91, 91/2, 97, 103, 110, 113, 115, 116, 117 были идентифицированы как *Pseudomonas sp.*, а к виду *P. fluorescens* были отнесены штаммы под номерами 2, 36, 116, 117.

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении бактерий рода *Pseudomonas* в посевах сахарной свёклы. Причем большая их часть концентрируется у корней и на их поверхности.

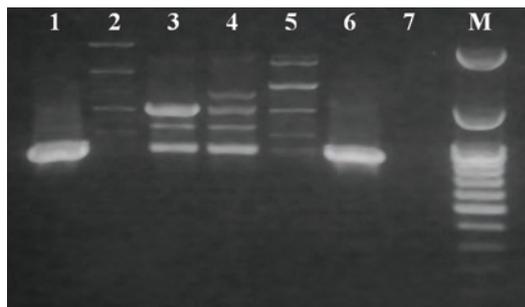


Рис. 5 Электрофореграмма ПЦР-продуктов полученных с праймером 16SPSEfluF/16SPSER. Линия 1 – штамм 2; линия 2 – штамм 67; линия 3 – штамм 91; линия 4 – штамм 97; линия 5 – штамм 103; линия 6 – положительный контроль (*P. fluorescens*); линия 7 – отрицательный контроль (вода); М – маркер (100 п.н.-3000 п.н.).

Для выявления генетического разнообразия штаммов *P. fluorescens* мы провели молекулярно-генетический анализ с использованием четырех комбинаций RAPD-праймеров (рис. 6).



Рис. 6 Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов штаммов *P. fluorescens*, полученных с помощью RAPD-праймеров OP-AN9, AB1-4, OP-09, UBC 278. Линия 1 – 4: штамм *P. fluorescens* 2 с RAPD-праймерами OP-AN9, AB1-4, OP-09, UBC 278; Линия 5 – 8: штамм *P. fluorescens* 36 с RAPD-праймерами OP-AN9, AB1-4, OP-09, UBC 278; Линия 9 – 12: штамм *P. fluorescens* 116 с RAPD-праймерами OP-AN9, AB1-4, OP-09, UBC 278; Линия 13 – 16: штамм *P. fluorescens* 117 с RAPD-праймерами OP-AN9, AB1-4, OP-09, UBC 278; М – маркер молекулярных масс (3000-100 п.н.).

Проведенный ПЦР-анализ геномной ДНК бактерий *P. fluorescens* с RAPD-праймерами показал высокий генетический полиморфизм исследованных образцов. Всего был выявлен 61 ДНК-фрагмент. Наибольшим полиморфизмом

характеризовались штаммы с RAPD-праймером OP-AN9. Амплификация геномной ДНК бактерий с этим праймером показала, что он обнаруживает максимальное число мест отжига на ДНК-матрице.

Так, для штамма под номером 2 было получено 7 ампликонов, под номером 36 их было выявлено 6, для штамма 116 – 6, а для штамма 117 – 5. Суммарно по данному праймеру обнаружено 24 ампликона. В результате амплификации геномной ДНК штаммов под номерами 2, 36, 116, 117 с данным RAPD-праймером был получен специфический набор ДНК-фрагментов отличающих их друг от друга. Показано, что для штаммов под номерами 116 и 117 было выявлено 5 одинаковых ампликонов из 6, длиной приблизительно 200, 700, 1500, 1900, 2200 п.н., что говорит об их близком генетическом родстве.

Результаты амплификации ДНК штаммов *P. fluorescens* с RAPD-праймером AB1-4 показали, что в составе генома штаммов 116 и 117 было обнаружено по 4 ампликона одинакового размера длиной приблизительно 400, 550, 2200, 2500 п.н. Тем временем, штаммы под номерами 2 и 36 резко отличались по количеству обнаруженных ампликонов. Так, для штамма 2 их количество равнялось пяти, а для штамма 36 – 2. Всего с RAPD-праймером AB1-4 было получено 15 ампликонов.

Результат амплификации с RAPD-праймером OP-09 свидетельствовал о близком генетическом сходстве между собой штаммов 116 и 117, у которых был обнаружен один общий ампликон размером примерно 1600 п.н. Для штамма 117 выявлен дополнительный ампликон размером около 550 п.н. Для двух остальных бактерий был получен специфический набор ДНК-фрагментов, что указывает на различие их генетического материала. По результатам амплификации с данным RAPD-праймером было выявлено 9 ампликонов, что свидетельствует о том, что он обнаруживает минимальное число мест отжига на ДНК-матрице.

Амплификация геномной ДНК с RAPD-праймером UBC 278 показала различие в геноме между собой всех четырёх изученных штаммов *P. fluorescens*. Количество полученных ампликонов для штамма под номером 2 составило 3, под номером 36 – 4, под номером 116 – 2, а под номером 117 – 4. Суммарное количество ампликонов с данным праймером составило 13.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ штаммов *P. fluorescens* выделенных из почвы, ризосферы, ризопланы сахарной свёклы, а

так же с поверхности корней озимой пшеницы с использованием четырех комбинаций RAPD-праймеров при амплификации показал для всех изученных штаммов специфический набор ДНК-фрагментов, отличающих их друг от друга. Несмотря на то, что для штаммов *P. fluorescens* 116 и *P. fluorescens* 117 выделенных с поверхности корней сахарной свёклы показано сходство ампликонов по одному из RAPD-праймеров (AB1-4), остальные 3 праймера не дали одинаковый набор ампликонов, что свидетельствует о разнообразии штаммов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что все изученные аборигенные штаммы *P. fluorescens*, выделенные в агроценозе сахарной свёклы генетически неоднородны между собой.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о широком распространении бактерий рода *Pseudomonas* в посевах сахарной свёклы. По нашим данным, 54 % бактерий рода *Pseudomonas* были изолированы именно из ризопланы. Это свидетельствует что псевдомонады активно колонизируют корни сахарной свёклы, и, по видимому, используют корневые экссудаты культуры в качестве источника питания. Применение современных молекулярно-генетических методов идентификации позволило выявить среди них вид *P. fluorescens*. Это подтверждает, что изученные бактерии широко представлены в посевах сахарной свёклы и являются аборигенными для этого подтипа почвы. Они способны с успехом развиваться на корнях культурных растений. Анализ полученных электрофореграмм подтверждает генетическое разнообразие штаммов *P. fluorescens* в агроценозе сахарной свёклы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kloepper J. W. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria / J. W. Kloepper, J. Leong, M. Teintz, M. N. Schroth // *Nature*. — 1980. — Vol. 286. — P. 885–886.
2. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А.М. Боронин // *Соросовский образовательный журнал*. — 1998. — № 10 — С. 25–31.
3. Osburn R.M. Dynamics of sugar beet colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomonas* species: Effects on seed rot and damping-off / R.M Osburn, M.N. Schroth, J.G. Hancock, M. Hendson // *Phytopathology*. — 1989. — Vol. 79, № 6. — P. 709 – 716.
4. *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens / E. Barahona [et al.] // *Appl and Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77, № 15 — P. 5412 – 5419.
5. Олюнина Л.Н. Продукция индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* в процессе роста / Л.Н. Олюнина, В.П. Шабаев // *Микробиология*. — 1996. — Т.6, №6. — С. 813 – 817.
6. Naik P. R. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil / P R. Naik, G. Raman, K.B. Narayanan, N. Sakthivel // *BMC Microbiol.* — 2008. — № 8 — P. 230 –243.
7. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice / N. Desnoues [et al.] // *Microbiology*. — 2003. — Vol. 149. — P. 2251–2262
8. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. — М.: Дрофа, 2004. — 255 с.
9. Логинова О. О. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области / О. О. Логинова, Т. Т. Данг, Е. В. Белоусова, М. Ю. Грабович // *Вестник ВГУ*. — 2011. — № 2. — С. 127 – 133.
10. Сеги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сеги. — М.: Колос, 1983. — 230 с.
11. Брюханов А.Л. Молекулярная микробиология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов — М.: Изд-во Московского ун-та, 2012. — 480 с.
12. Оценка интенсивности биосинтетических процессов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на средах с добавлением порошкообразного гречишного солодового экстракта / И. В. Новикова [и др.] // *Вестник ВГУ*. — 2015. — № 2. — С. 73 – 79.
13. Spilker, T. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42, № 5. — P. 2074 – 2079.
14. Scarpellini, M. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype / M. Scarpellini, L. Franzetti, A. Galli // *FEMS Microbiology Letter*. — 2004. — № 236 — P. 257 – 260.
15. Amiri R. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris* / R. Amiri, M. Mesbah, M. Moghaddam // *Biologia Plantarum*. — 2009. — Vol. 53, № 1. — P. 112 – 119.

*Воронежский государственный университет  
Безлер Н. В., доктор сельскохозяйственных  
наук, профессор кафедры почвоведения и управле-  
ния земельными ресурсами  
Тел. (473) 220-85-77  
E-mail: bezler@list.ru*

*Voronezh state university  
Bezler N. V, Doctor of Agricultural Sciences, Full  
Professor, Dept. of soil science and management of  
ground resources  
Ph.: (473) 220-85-77  
E-mail: bezler@list.ru*

*Всероссийский научно-исследовательский ин-  
ститут сахарной свёклы и сахара им. А.Л. Маз-  
лумова  
Хуссейн А. С., стар. науч. сотр., канд. биол.  
наук  
Тел. (47340) 5-33-26  
E-mail: ahmad\_saadoon@yahoo.com*

*Federal State Budgetary Scientific Institution  
“The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute  
of Sugar Beet and Sugar”  
Hussein A.S., PhD (Biology), Senior researcher  
Ph.: (47340) 5-33-26  
E-mail: ahmad\_saadoon@yahoo.com*

*Петюренко М. Ю., младш. науч. сотр.  
Тел. (47340) 5-33-26  
E-mail: marta.peturenko@gmail.com*

*Peturenko M.Y., Junior researcher  
Ph. (47340) 5-33-26  
E-mail: marta.peturenko@gmail.com*