

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ (MAS) СЕЛЕКЦИИ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.)

Т. П. Федулова¹, А. А. Налбандян¹, Д. Н. Федорин^{1,2}

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 06.06.2018 г.

Аннотация. Представлены результаты молекулярно-генетического изучения исходных и селекционных материалов сахарной свёклы по RAPD и SSR-маркерам. Выявлены наиболее полиморфные ДНК-маркеры, пригодные для идентификации сортов свёклы. Составлены генетические формулы и паспорта изученных селекционных материалов и установлена взаимосвязь генетической структуры гибридов с их продуктивностью. Гибриды, имеющие урожайность выше, чем у родительских форм, характеризуются увеличением количества ампликонов, выявляемых праймерами RawS 5, и появлением новых компонентов ДНК-спектров, отсутствующих у родительских форм. Их родительские компоненты имеют генетические различия, выявляемые на электрофореграмме продуктов амплификации. Низкопродуктивные гибриды характеризуются уменьшением числа ампликонов и отсутствием фрагментов ДНК, характерных для родительских исходных форм. Осуществлена детекция интрогрессивных форм, полученных в результате скрещивания с диким видом *Beta corolliflora* Zoss., с использованием праймеров к сателлиту *Hae III*. Длина полученного ампликона (161 п.н.) в каждом из гибридов и дикой свекле совпадает с размером исследуемой нуклеотидной последовательности. Один ПЦР-продукт является результатом специфического связывания праймера с матрицей и подтверждает наличие сателлитной ДНК *Hae III* (видоспецифической для *B. corolliflora*, многократно-повторяющейся во многих ее хромосомах) в геноме интрогрессивных растений. Анализ материалов сахарной свёклы, использовавшихся в качестве материнских форм в гибридизации, не выявил присутствия искомой сателлитной последовательности в их геноме. Проведена идентификация и составлены штрих-коды трансгенных линий сахарной свёклы с генами *mf2* и *mf3*, связанными с генами устойчивости к фитопатогенам. В результате проведенных исследований выявлены микросателлитные локусы *Bvv 17, 30, 32, 43*, обладающие полиморфизмом в исследованных родительских формах сахарной и кормовой свёклы, и характеризующие генетическую изменчивость гибридного потомства; установлена передача генетического материала от родительских пар в гибриды. Обсуждается вопрос применения маркер-ассоциированной (или маркер-вспомогательной) селекции для сахарной свёклы, которая основана на использовании современных молекулярно-генетических методов, позволяющих изучать и идентифицировать гены или локусы, отвечающие за тот или иной фенотипический признак. Маркер-вспомогательная селекция всё чаще используется в современных селекционных программах.

Ключевые слова: сахарная свёкла, ПЦР-анализ, RAPD-и SSR-маркеры, полиморфизм, праймеры, интрогрессивные формы, трансгенные линии, кластерный анализ

Среди приоритетных направлений развития науки в XXI веке молекулярная генетика признана одной из основных. В последние годы, наряду с традиционными приёмами селекции, всё активнее развиваются молекулярно-генетические методы исследований. Всё больше молекулярных маркеров внедряется в селекционный процесс, а маркер-ассоциированная селекция (MAS) стано-

вится дополнительным инструментом в селекционных программах [1, 2]. Маркер-ассоциированная (или маркер-вспомогательная) селекция основана на использовании современных молекулярно-генетических методов, позволяющих изучать и идентифицировать гены или локусы, отвечающие за тот или иной фенотипический признак, и, на основании этого, разрабатывать молекулярные маркеры, применение которых является максимально эффективным, если речь идёт

о моногенном признаке. Маркер-вспомогательная селекция всё чаще используется в современных селекционных программах. Косвенный отбор на основе методов молекулярного генотипирования делает возможным детектирование желаемых аллелей и гаплотипов уже на ранних стадиях развития растения, что существенно сокращает и упрощает селекционный процесс. Главным методом молекулярной селекции стал маркер-опосредованный отбор (Marker assisted selection – MAS) по молекулярным маркерам. Отбор исходных форм с использованием молекулярных маркеров: биохимических, таких как изоферменты и запасные белки, а также молекулярных маркеров ДНК, в настоящее время широко используется в селекции многих сельскохозяйственных культур [3, 4]. В селекцию сахарной свеклы MAS впервые ввел Cai [5], показав, что отбор по генам, контролирующим желаемые признаки, может быть более эффективным, чем по морфологическим, физиологическим или анатомическим признакам, которые также можно рассматривать как маркерные. Получение молекулярных маркеров особенно важно для поиска генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки, хотя для оценки генетического разнообразия могут быть использованы и нейтральные анонимные маркеры. Маркер-ассоциированная селекция приобретает особое значение, когда речь идёт о рецессивно-наследуемых, полигенных или слабонаследуемых признаках. Использование кодоминантной маркерной системы позволяет MAS-селекции исключать из селекционного процесса этап тестирования гибридного потомства для отбора генотипов, несущих искомые рецессивные аллели. Методы молекулярного маркирования открывают широкие возможности для идентификации селекционных материалов сахарной свеклы, что позволяет решать проблему недостатка морфологических маркеров [6, 7]. Методами ДНК-генотипирования (RELP, SSR, RAPD) проведены работы по созданию генетической карты генома сахарной свеклы [8, 9], исследованию полиморфизма видов рода *Beta* [10,11, 12], идентификации гиногенетических линий, изучению генетического разнообразия [13, 14, 15]. Однако до настоящего времени остаются неясными основные механизмы становления такого полигенного количественного признака, как продуктивность [16]. Одним из возможных путей в решении этой проблемы является анализ связей между молекулярно-генетическими особенностями и хозяйственно-полезными свой-

ствами, основанными на применении молекулярных и биохимических маркерных признаков. На современном этапе исследований актуальным является изучение возможности применения совокупности молекулярно-генетических маркеров на основе RAPD-, ISSR- анализов, которые позволяют группировать изучаемый материал по степени генетического родства, выявлять генетические различия между контрастными по качественным и количественным признакам растениями [17, 18, 19]. Представляется перспективным применение ДНК-технологий и других методов молекулярного маркирования, с помощью которых станет возможным решение таких задач современной селекции, как контроль за переносом генетического материала дикорастущих сородичей при отдаленных скрещиваниях. В связи с этим, исследование возможности применения методов молекулярно-генетического маркирования (RAPD, ISSR) для идентификации селекционных материалов, при разработке современных программ скрещивания, отборе интрогрессивных и трансгенных форм сахарной свеклы является актуальным направлением исследований.

Цель исследований заключалась в выявлении генетической структуры селекционных материалов, интрогрессивных и генетически модифицированных форм сахарной свёклы на основе молекулярно-генетического анализа для повышения эффективности селекционного процесса.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве материалов для молекулярно-генетических исследований были использованы растения сахарной свеклы: исходные родительские формы (мужскостерильные линии (МС); много-семянные опылители (ОП) и гибридные комбинации, любезно предоставленные докторами с.-х. наук М.А. Богомоловым и В.П. Ошевневым, а также полученные к.б.н. Н.Н. Богачевой межвидовые гибриды *Beta vulgaris L.* x *B. corolliflora Zoss.* и трансгенные растения с генами *mf 2* и *mf 3*, полученные с.н.с. Е.Н. Васильченко. Геномную ДНК выделяли из 0.2 г зеленых листьев с применением 7.5 М ацетата аммония, протеиназы К и 20% SDS [20]. Качество выделенной ДНК определяли электрофорезом в 1 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученную ДНК растворяли в 10мМ трис- HCl-буфера, pH 8.0, содержащем 0.1мМ ЭДТА. ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Параметры амплификации были следу-

ющие: предварительная денатурация при 95°C в течение 10 минут, затем 30 циклов: 95°C - 40с, t отжига – 40с, 72°C – 40с и элонгация цепи 72°C – 5 мин. Для анализа полиморфизма рассеянных повторяющихся последовательностей генома материалов сахарной свеклы в работе использованы следующие произвольные праймеры: PAWS 5 (5'- AAC-GAG-GGG-TTC-GAG-GCC-3'), PAWS 6 (5'- GAGTGTCAAACCCAACGA-3'), PAWS 16 (5'- ACC-TCT-GCG-CTT-GGA-GGC-3'), PAWS 17 (5'- СТА-САС-GGA-СТG-GGT-CCG-3') [21]. В работе использовали также праймеры к микросателлитным локусам: Bvv15, Bvv17, Bvv 23, Bvv 32, Bvv 43, Bvv 21, Bvv 23, Bvv 30, Bvv 32, Bvv 43, Bvv 51, Bvv 53, Bvv 60, Bvv 61, Bvv 63, выделенные иностранными авторами, как наиболее полиморфные для сахарной свёклы [22]. Олигонуклеотиды синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Для выявления интрогрессивных форм использовали праймеры, подобранные на основе нуклеотидной последовательности сателлитной ДНК HaeIII, многократно повторяющейся во многих хромосомах *B. corolliflora* Zoss. Специфичность сателлитной ДНК HaeIII была показана в работе [23]. В качестве праймеров использовали следующие нуклеотидные последовательности: F-5'-ССААТТТТGCСТТТТTCG-3'; R-5'-ААААТGАССТТТTCGТТСС-3'. Для создания специфических праймеров применяли программу Primer 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для интенсификации селекционного процесса, решения проблем семеноводства сахарной свеклы и защиты авторских прав необходима дифференциация селекционных материалов. Принципиально новые возможности для идентификации селекционных материалов открылись с появлением методов, основанных на применении ДНК-маркеров, которые используют для точной и быстрой паспортизации различных видов и сортов растений, изучения филогенетического родства и т.д. Одним из методов исследования ДНК - гетерогенности селекционного материала является RAPD – метод (random amplified polymorphic DNA) полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием короткого случайного праймера. Данный метод позволяет выявлять высокополиморфные «анонимные» последовательности ДНК, фланкированные инвертированными повторами декануклеотидов, в частности терминальными участками ретротранспозонов. Одно

из достоинств этого метода – возможность генотипирования одновременно по многим локусам, локализованным в разных участках генома, что особенно важно.

Молекулярный анализ исходных родительских компонентов и некоторых гибридов сахарной свеклы с использованием праймеров к умеренно повторяющимся последовательностям ДНК семейства R 173: PAWS 5, PAWS 6, PAWS 16, PAWS 17 позволил нам выявить для каждого исследованного генотипа определенный набор ДНК-фрагментов, отличающий его от других селекционных материалов. Анализ экспериментальных данных, полученных при использовании праймера PAWS 5, позволил амплифицировать наибольшее число фрагментов ДНК на генотип – до восьми, PAWS 17 – до четырех, PAWS 6 - до трех, праймер PAWS 16 - до двух ПЦР-продуктов различной длины на индивидуальный генотип, т.е. оказался наименее информативным. Для исследуемых материалов с использованием праймера PAWS 5 получено 9 полиморфных фрагментов ДНК (100%), общее количество ампликонов, полученных с этим праймером – 80 (рис. 1). Диапазон длин полученных фрагментов ДНК при использовании четырех праймеров – от 250 до 2000 п.н.

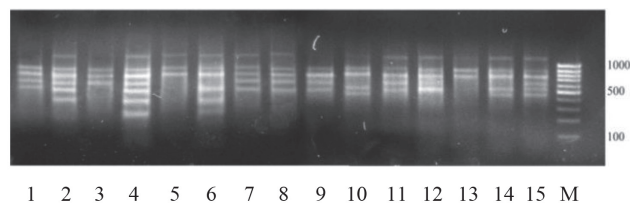


Рис. 1. Амплификация геномной ДНК свеклы с праймером Paws 5. 1 - 08011, 2 - 08010, 3 - 08013, 4 - 08003, 5 – ОП 08008, 6 - ОП 08016, 7 - 08005, 8 - ОП 08197, 9 - 08180, 10 – МС 08077, 11 - 08183, 12 - МС 08012, 13 – МС 08131, 14 - 08002, 15- 08077, М – маркер молекулярных масс

Для праймера PAWS 6 полиморфными оказались 7 фрагментов ДНК (100%), общее количество ампликонов, полученных с данным праймером для всех генотипов составило 34, длина ДНК-фрагментов составила от 200 до 800 п.н. Для праймера PAWS 16 выявлено 3 (100%) полиморфных RAPD - фрагмента длиной 400, 500 и 800 п. н. Для всех генотипов в сумме получено 22 ПЦР-продукта. Для селекционных материалов №№: 08011, 08010, 08003, 08008, 08016, 08005, 08197, 08180, 08077, 08183, 08012, 08131, 08002, 08180 при амплификации праймером PAWS 16 обнаружены общие RAPD - фрагменты длиной 500 п.н.

Это может свидетельствовать об относительной генетической близости данных селекционных материалов. С использованием короткого одиночного праймера PAWS 17 выявлено 7 полиморфных фрагментов ДНК, длиной от 700 до 2000 п. н. Общее количество ампликонов, полученных с данным праймером – 36 (рис. 2).

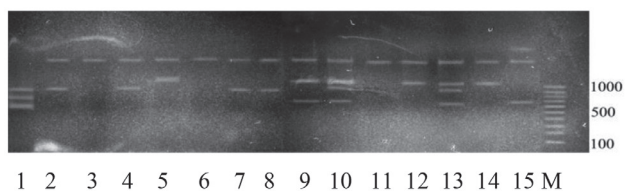


Рис. 2. Амплификация геномной ДНК свеклы праймером PAWS 17. 1 - 08181, 2 - 08002, 3 - 08003, 4 - 08005, 5 – ОП 08008, 6 - ОП 08197, 7 - 08183, 8 – MC 08077, 9 – MC 08131, 10 - MC 08012, 11 - 08180, 12 - 08011, 13 - ОП 08016, 14 -08002, 15- 08077, М – маркер молекулярных масс

По результатам ДНК-амплификации с указанными произвольными праймерами выявлены специфические RAPD-спектры, характеризующие исходные родительские формы и некоторые гибриды. На основе полученных данных составлены молекулярно-генетические формулы, которые отражают генетическую структуру индивидуальных материалов сахарной свеклы (табл. 1).

Таким образом, использование в полимеразной цепной реакции праймеров к умеренно повторяющимся последовательностям ДНК семейства R 173: PAWS 5, PAWS 6, PAWS 16, PAWS 17 позволяет выявлять фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными повторами терминальных участков ретротранспозонов и устанавливать ин-

дивидуальные особенности селекционных материалов сахарной свеклы (исходных родительских компонентов и некоторых гибридов). Количество выявляемых ДНК-фрагментов в зависимости от генотипа и локуса варьировало от 1 до 8. Диапазон длин получаемых фрагментов составил от 250 до 2000 п.н. Для 21 генотипа сахарной свеклы (11 исходных линий и 10 гибридов) с использованием RAPD-метода получены генетические профили, позволяющие их идентифицировать и различать, составлены генетические формулы. Отобраны праймеры PAWS 5 и PAWS 17, как наиболее полиморфные для исследованных селекционных материалов и перспективные для генотипирования.

Изучение взаимосвязи генетической структуры пробных гибридов по RAPD-маркерам с продуктивностью. Анализ генетической структуры гибридных комбинаций с различной продуктивностью и родительских форм сахарной свеклы на основе составленной матрицы присутствия/отсутствия RAPD-фрагментов позволил выявить новые молекулярно-генетические особенности гетерозисных гибридов. С использованием праймера PAWS 5 для гибрида № 08003, превышающего по урожайности (29.11 т/га) стандарт на 8% и наиболее продуктивного по сбору сахара – 112.2 % от стандарта обнаружено 8 ампликонов длиной от 250 п.н. до 1500 п.н. У каждого из родительских компонентов (ОП 08197 и MC 08112) этого гибрида выявлено значительно меньшее количество ПЦР-продуктов - по три фрагмента ДНК. Гибрид № 08011, превышающий стандарт по урожайности на 10.7 %, имеет спектр продуктов ампликации праймером PAWS 5, включающий 2 фрагмента ДНК, идентичных по длине своим родителям (900-

Таблица 1

Генетические формулы селекционных материалов

Селекционный материал	Общая формула полиморфных фрагментов
MC 08012	${}^0A_{250} {}^0A_{300} {}^0A_{400} {}^1A_{500} {}^1A_{700} {}^1A_{800} {}^1A_{900} {}^1A_{1000} {}^1A_{1500} {}^1B_{200} {}^0B_{400} {}^1B_{500} {}^0B_{600} {}^1B_{650} {}^0B_{700} {}^0B_{800} {}^0C_{400} {}^1C_{500} {}^0C_{800} {}^0D_{700} {}^0D_{800} {}^0D_{900} {}^1D_{1000} {}^1D_{1100} {}^1D_{1600} {}^0D_{2000}$
MC 08131	${}^0A_{250} {}^0A_{300} {}^0A_{400} {}^0A_{500} {}^0A_{700} {}^0A_{800} {}^1A_{900} {}^1A_{1000} {}^1A_{1500} {}^0B_{200} {}^1B_{400} {}^0B_{500} {}^1B_{600} {}^0B_{650} {}^0B_{700} {}^0B_{800} {}^0C_{400} {}^1C_{500} {}^0C_{800} {}^0D_{700} {}^0D_{800} {}^0D_{900} {}^0D_{1000} {}^1D_{1100} {}^1D_{1600} {}^0D_{2000}$
MC08077	${}^0A_{250} {}^0A_{300} {}^0A_{400} {}^1A_{500} {}^1A_{700} {}^0A_{800} {}^1A_{900} {}^1A_{1000} {}^1A_{1500} {}^0B_{200} {}^0B_{400} {}^0B_{500} {}^1B_{600} {}^0B_{650} {}^0B_{700} {}^0B_{800} {}^0C_{400} {}^1C_{500} {}^0C_{800} {}^1D_{700} {}^0D_{800} {}^0D_{900} {}^1D_{1000} {}^1D_{1100} {}^1D_{1600} {}^0D_{2000}$
ОП 08008	${}^0A_{250} {}^0A_{300} {}^0A_{400} {}^0A_{500} {}^0A_{700} {}^0A_{800} {}^1A_{900} {}^1A_{1000} {}^1A_{1500} {}^0B_{200} {}^0B_{400} {}^0B_{500} {}^0B_{600} {}^1B_{650} {}^0B_{700} {}^0B_{800} {}^0C_{400} {}^1C_{500} {}^0C_{800} {}^0D_{700} {}^0D_{800} {}^1D_{900} {}^0D_{1000} {}^1D_{1100} {}^1D_{1600} {}^0D_{2000}$
ОП 08016	${}^0A_{250} {}^1A_{300} {}^1A_{400} {}^0A_{500} {}^1A_{700} {}^0A_{800} {}^1A_{900} {}^1A_{1000} {}^1A_{1500} {}^1B_{200} {}^0B_{400} {}^1B_{500} {}^0B_{600} {}^1B_{650} {}^0B_{700} {}^0B_{800} {}^0C_{400} {}^1C_{500} {}^0C_{800} {}^1D_{700} {}^0D_{800} {}^0D_{900} {}^0D_{1000} {}^1D_{1100} {}^1D_{1600} {}^1D_{2000}$

Соответствие праймеров и букв латинского алфавита, используемых для записи полученных полиморфных фрагментов: А - фрагменты ДНК, выявленные с помощью праймера PAWS 5, В – PAWS 6, С – PAWS 16, D – PAWS 17. Молекулярный вес фрагмента, полученного с конкретным праймером обозначен нижним индексом, верхним индексом обозначено наличие (1) или отсутствие (0) фрагмента на электрофореграмме

1000 п.н.), один ампликон, характерный для отцовского родителя ОП № 08016 (500 п. н.) и один специфический фрагмент с длиной 800 п.н. Родительские формы данного гибрида различаются присутствием/отсутствием трех фрагментов ДНК (длиной 300, 400 и 700 п.н.). Низкопродуктивный гибрид № 08180 (урожайность от стандарта 98.8 %) имеет 5 компонентов на фореграмме, полученной с праймером PAWS 5. В ДНК-спектре для данного гибрида отсутствует фрагмент ДНК (1500 п.н.), характерный для обоих его родителей. Спектры его родительских форм МС №08012 и ОП № 08197 различаются присутствием/отсутствием одного компонента (500 п.н.). Увеличение повторов локуса при гибридизации, возможно, объясняется эпистатическим межгеномным взаимодействием и является основой проявления гетерозиса и усиления признака продуктивности.

Таким образом, анализ ДНК-спектров гибридных комбинаций позволил выявить некоторые интересные факты - установлены различия по количественному соотношению повторов умеренно-повторяющихся последовательностей ДНК у родительских форм и некоторых гибридов сахарной свеклы [24]. Гибриды, имеющие урожайность выше, чем у родительских форм, характеризуются увеличением количества ампликонов, выявляемых праймерами RawS 5, появлением новых компонентов ДНК-спектров, отсутствующих у родительских форм. Их родительские компоненты имеют генетические различия, выявляемые на электрофореграмме продуктов амплификации. Низкопродуктивные гибриды характеризуются уменьшением числа ампликонов, отсутствием фрагментов ДНК, характерных для родительских исходных форм. Однако выявленные нами закономерности требуют дальнейшего

исследования с применением большего количества ДНК-маркеров. Исследование генетического полиморфизма селекционных материалов сахарной свеклы с использованием четырех одиночных RAPD-праймеров позволило выявить 172 полосы на электрофореграммах разделения ПЦР-продуктов для исходных селекционных материалов. Результаты экспериментов использованы для определения уровня дивергенции между исследованными линиями методом кластеризации, были рассчитаны генетические расстояния (евклидовы), которые варьировали от 1.0 до 3.87. Все материалы кластеризовались на две группы (рис. 3).

Наименьшие генетические расстояния выявлены для комбинаций скрещиваний ($D= 1.0$) МС И-08015 и ОП 15202. Наибольшие генетические расстояния установлены для родительских пар МС И-08001 ' ОП 08197 ($D=3.87$), МС И-08001 ' ОП 08001 ($D= 3.74$), МС И-08016 ' ОП 08008 ($D=3.46$), МС И-08015 ' ОП 08008 ($D=3.74$), МС 94 Ар ' ОП 08008 ($D= 3.46$), МС И-08016 ' ОП 08016 ($D= 3.74$) и др. Данные пары могут быть рекомендованы для проведения скрещиваний. Взаимные генетические дистанции между мужскостерильными линиями варьировали от 1.41 до 3.87, между опылителями от 1.73 до 3.61. Таким образом, в результате проведенных исследований осуществлена дифференциация исходных линий сахарной свеклы, полученные данные о генетической удаленности селекционных материалов могут быть использованы для более обоснованного подбора пар при гибридизации сахарной свеклы.

*Детекция интрогрессии элементов генома *V. corolliflora* в межвидовых гибридах с использованием видоспецифических маркеров*

Применение в селекции межвидовой гибридизации предполагает включение нового генетиче-

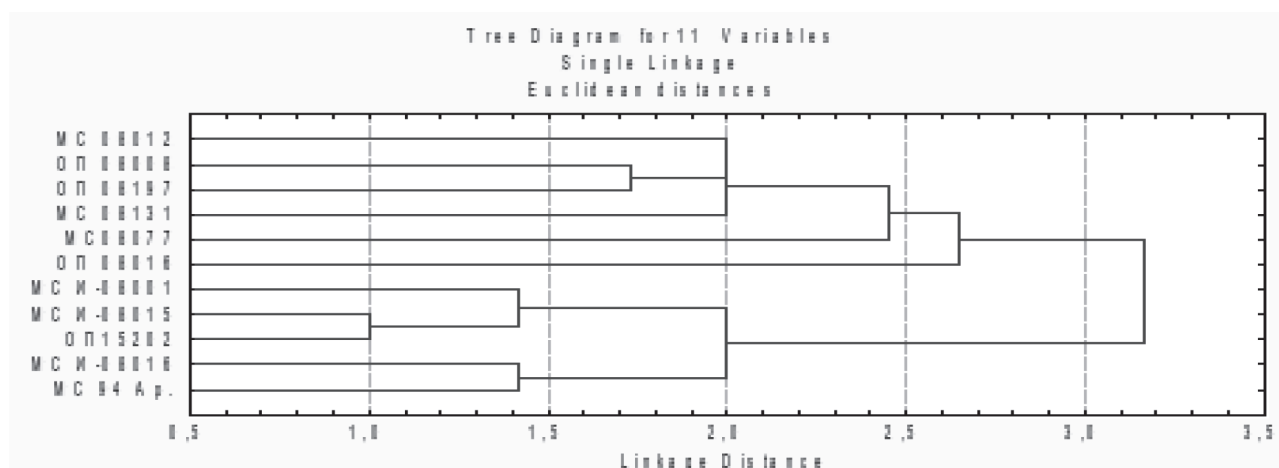


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний между исходными линиями

ского материала в геноме сахарной свеклы. В связи с этим, важнейшим элементом селекционного процесса с использованием межвидовой гибридизации является отбор интрогрессивных форм сахарной свеклы. ДНК-маркеры позволяют исследовать генетическую изменчивость не на уровне продуктов экспрессии гена, а на уровне генома.

Хромосомы *B. corolliflora* Zoss. и *B. vulgaris* L. сходны по размеру и морфологии, поэтому определения их количества путем подсчета под микроскопом не достаточно, чтобы идентифицировать генотипы и контролировать процесс межвидовой гибридизации при анализе большого количества гибридных растений. Высокой эффективностью для идентификации генетического материала *B. corolliflora* обладает сателлитная ДНК *HaeIII*, специфичность последовательности которой для этого вида установлена Gindallis [23] с помощью *in situ* гибридизации. Проведенный ISSR-ПЦР-анализ геномной ДНК дикой свеклы и растений, полученных от межвидовых скрещиваний *B. vulgaris* x *B. corolliflora*, с подобранными нами праймерами к сателлиту *HaeIII*, показал наличие одной полосы на гель-электрофорезе (рис. 4).

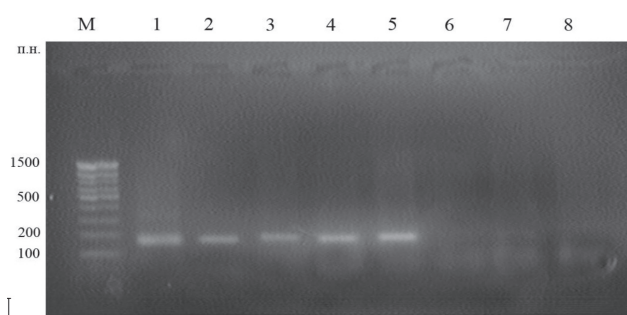


Рис. 4. Амплификация геномной ДНК дикой свеклы и гибридных растений, со специфическими праймерами к сателлитной последовательности *HaeIII*. 1 - *B. corolliflora*; 2-5 - растения, полученные в результате скрещивания *B. vulgaris* x *B. corolliflora* (4 - триплоид, 2, 3, 5 – диплоиды); материнские компоненты: 6 - МС И-08015; 7 - гамма-МС-70; 8 - МС И-08001; М – маркер молекулярной массы ДНК

Длина полученного ампликона (161 п.н.) в каждом из гибридов и дикой свекле совпадает с размером исследуемой нуклеотидной последовательности. Один ПЦР-продукт является результатом специфического связывания праймера с матрицей и подтверждает наличие сателлитной ДНК *HaeIII* (видоспецифической для *B. corolliflora*, многократно-повторяющейся во многих ее хромо-

сомах) в геноме вышеуказанных растений. Анализ материалов сахарной свеклы, использовавшихся в качестве материнских форм в гибридизации, не выявил присутствия искомой сателлитной последовательности в их геноме [25]. Наши исследования показали, что сателлитная ДНК *HaeIII* присутствует в триплоидных и диплоидных растениях, полученных в результате скрещивания *B. vulgaris* x *B. corolliflora*, т. е. выявлено наличие интрогрессии элементов генома дикой свеклы в гибридные формы. Так как триплоидные гибриды обладают рядом отрицательных признаков, наиболее нежелательными из которых является глубокое залегание корня и склонность его к разветвлению, то они, очевидно, малопригодны для использования в селекции. Диплоидные интрогрессивные растения, обладающие фенотипом сахарной свеклы и положительными признаками, могут быть вовлечены в селекционный процесс. Вместе с тем, используемые нами методы не позволяют определить объем и способ передачи генетического материала дикой свеклы в геном сахарной. О передаче генетического материала отцовских форм при межвидовой гибридизации, когда полученные гибриды по фенотипу и хромосомному набору не отличались от материнских форм, свидетельствуют данные авторов, выдвинувших гипотезу о возможной гибридизации фрагментов ДНК отдаленных видов растений [26]. Они предположили, что целые хромосомы вида элиминируются, однако некоторые участки ДНК, имеющие генетическое родство, могут гибридизоваться с материнским геномом. Согласно современным данным хромосомы сахарной свеклы имеют горячие точки транслокаций, например, в девятой хромосоме, как это было установлено с помощью RFLP-метода [27]. Это позволило нам предположить, что наличие у диплоидов последовательности *HaeIII*, по-видимому, является результатом произошедшей транслокации, при которой участок хромосомы материнской формы *B. vulgaris*, был замещен участком *B. corolliflora*. Однако это требует дальнейшего более глубокого исследования. Таким образом, применение полимеразной цепной реакции с использованием видоспецифических праймеров к сателлитной ДНК *HaeIII* *B. corolliflora* позволяет осуществлять быстрый отбор интрогрессивных форм сахарной свеклы благодаря высокой консервативности сайтов праймирования, что значительно упрощает задачи селекционеров.

Кроме того, с использованием произвольных и микросателлитных праймеров исследована ге-

нетическая структура различных сортоотипов корнеплодной свёклы рода (*Beta*) и внутривидовых гибридов для проведения их идентификации. В составе генома разновидностей сахарной, столовой и кормовой свёклы выявлен общий ампликон длиной 700 п.н., что указывает на некоторое сходство их генетического материала. В образцах кормовой свёклы по локусу RawS 6 установлен дополнительный ампликон 400 п.н., свидетельствующий об отличии их от остальных сортоотипов. Установлено, что при амплификации геномной ДНК с праймерами RawS 16 фрагменты 900 п.н. являются специфическими для образцов столовой свёклы. Выявлены отличительные черты организации генома у образцов кормовой свёклы и гибрида сахарной свёклы иностранной селекции «Золеа», у которых микросателлитный локус *Bvv48* имеет двойное проявление в их геноме длиной 250 п.н. В результате ПЦР – амплификации с помощью 6 пар праймеров к микросателлитным локусам *Bvv 15, 17, 23, 30, 32, 43* установлена генетическая неоднородность родительских линий сахарной и кормовой свёклы. Локусы *Bvv15* и *23* оказались мономорфными. Выявленный полиморфизм, определяемый частотой встречаемости аллелей исследованных микросателлитных локусов, варьировал по праймерам: *Bvv17* - 42.85 – 100%; *Bvv 30* - 7.14 ; 14.28; 28.57%; *Bvv 32* от 14.28 до 100%; *Bvv43* – 5, 0; 21.42; 100%. Наибольшим полиморфизмом характеризовались праймеры для микросателлиты *Bvv 30*, которые выявили 5 ПЦР – продуктов с длинами 350, 500, 700, 1000 и более тысячи пар нуклеотидов. Это позволило определить генетические расстояния между МС – формами и опылителем – кормовой красной свёклой, которые составили для №№МС 14044 и кормовой красной р.4 ($D=1.41$); МС-94 и кормовой красной р.1 ($D=2.45$); МС-94 и кормовой красной р.2 ($D=1.73$); МС-94 и кормовой красной р.3 ($D=2.00$). Определено, что с увеличением генетических дистанций повышалась и продуктивность гибридных комбинаций от 112.5 до 145.0 т/га, соответственно. В результате амплификации геномной ДНК растений родительских форм свёклы и гибридов с праймерами к микросателлитным последовательностям установлено, что при скрещивании сахарной и кормовой свёклы аллели обеих родительских форм кодоминантно сочетаются в генотипах гибридных образцов. В гибриде F_1 МС-94 × кормовая красная р.3 выявляются аллели родительских пар, содержащих микросателлитные последовательности *Bvv 17*

(900 п.н.) и *Bvv 30* (350 п.н.). По праймерам для локуса *Bvv 32* обнаружена передача ДНК – ампликонов (250 и более 1000 п.н.) отцовской формы в гибридные растения. По микросателлитному локусу *Bvv 17* выявлен дополнительный ДНК – фрагмент длиной около 900 п.н. у МС – форм, гибридных комбинаций и гибрида иностранной селекции «Золеа». Данные образцы имеют слабо выраженный ПЦР – продукт по праймеру *Bvv 23*, что свидетельствует об отличии структуры их генетического материала от остальных номеров. При амплификации с праймерами *Bvv 32* только один образец F_1 МС-94 × кормовая красная р.3 имел дополнительный ампликон длиной 150 п.н., что связано, по-видимому, с происхождением МС – формы № 94, полученной на основе апомиктической линии. При использовании праймеров к сателлите *Bvv 43* выявлена передача в гибридные формы от отцовского родителя (кормовой свёклы) одного из аллелей данного локуса (более 1000 п.н.). Данные гибриды характеризовались ширококонической формой корнеплода, как у кормовой свёклы, возможно, микросателлитный локус *Bvv 43* находится в одной группе сцепления с генами, определяющими форму корнеплода. Индекс формы корнеплода в гибридных комбинациях наследовался по отцовскому или промежуточному типу.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены микросателлитные локусы *Bvv 17, 30, 32, 43*, обладающие полиморфизмом в исследованных родительских формах сахарной и кормовой свёклы, характеризующие генетическую изменчивость гибридного потомства, и установлена передача генетического материала от родительских пар в гибриды.

Сегодня, наряду с традиционными сортами и гибридами, все больший интерес вызывают генно-модифицированные формы растений сахарной свеклы с заданными свойствами, повышающими устойчивость к различным патогенным факторам. Примером могут служить трансгенные растения сахарной свеклы с геном *mf2*, кодирующим бактериальный белок из *Bacillus thuringiensis*. Это низкомолекулярный, термостабильный белок, обнаруживающий высокую степень гомологии с cold shock-белками *p.Bacillus* и *E.coli*. Данный белок обладает ярко выраженной способностью повышать устойчивость растений к различным фитопатогенам и может являться индуктором неспецифической устойчивости у ряда растений. Для объективной оценки вклада трансгенных растений необходим детальный анализ их генетиче-

ского материала, с использованием методов, детектирующих полиморфизм на уровне ДНК.

При исследовании уровня полиморфизма микросателлитных локусов трансгенных растений сахарной свеклы с геном *mf2*, по принципу мультиплексного анализа для картирования, нами были скомбинированы праймеры по температурному и временному режиму. Созданы следующие дуплексы: Bvv43/Bvv15; Bvv21/Bvv53; Bvv30/Bvv64 и Bvv23/Bvv32. Высокий полиморфизм обнаружили локусы, амплифицированные с дуплексом Bvv21/Bvv53: по четыре ампликона выявлено у образцов под номерами 1, 3 и у контроля, три – у образца №4, парные полосы идентифицированы у линии под номером 2. Амплификация с дуплексом Bvv43/Bvv15 выявила наличие парных, но не идентичных фрагментов у линий 1, 3, 4 и у контрольного образца, линия №2 имела один фрагмент. Микросателлитные локусы, амплифицированные с парами праймеров Bvv23/32 и Bvv30/64, обнаружили менее выраженный полиморфизм. Максимальное число идентифицированных аллелей составило 47, диапазон распределения ампликонов – от 100 до 500 п.н.

Проведенный ПЦР - анализ трансгенных растений сахарной свеклы с геном *mf3* установил, что наибольшим полиморфизмом обладают микросателлитные локусы, амплифицированные со следующими парами праймеров: Bvv30, Bvv43 и Bvv64. Амплификация с праймером Bvv30 выявила потерю ДНК - ампликона у образцов 1 и 3 (при сравнении с контролем). У образцов 1, 2 и 9, при амплификации с праймером Bvv43, отсутствовал характерный для остальных линий фрагмент. Микросателлитный локус, амплифицированный с парой праймеров Bvv60, обнаружил менее выраженный полиморфизм. Так, амплификация ДНК с праймером Bvv60 выявила идентичные парные фрагменты у всех исследуемых трансгенных линий. Исключение составили образец под номером 9 и контрольное растение, у которых обнаружился только один ДНК-фрагмент. По локусам Bvv15, Bvv17, Bvv21 и Bvv61 трансгенные линии и контрольное (нетрансгенное) растение не отличались и при визуализации давали идентичный паттерн ампликонов. Это можно объяснить тем, что аллели, выявленные с данными парами праймеров, не являются геноспецифичными, и поэтому могут обнаруживаться у всех линий. Общее количество выявленных аллелей составило 76 штук, с диапазоном встречаемости от 100 до 500 п.н. На основе полученных данных составлены индивидуальные

генетические паспорта для каждой линии генно-модифицированной сахарной свеклы с геном *mf3*.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что не все микросателлитные локусы одинаково эффективны для исследования генома трансгенных форм сахарной свеклы, так как могут проявлять незначительный полиморфизм или являться мономорфными. Однако следует отметить, что при совокупном анализе нескольких локусов нами получены уникальные микросателлитные профили с набором фрагментов, специфичных для каждой линии. Это стало основой для составления индивидуальных генетических паспортов. Полученная информация о наличии/отсутствии ПЦР-фрагмента была представлена в графическом виде, в качестве набора аллелей, в виде своеобразного штрих-кода [28]. Ниже приведены штрих-коды 9 трансгенных линий сахарной свеклы с геном *mf3* и 4 – с геном *mf2*, созданные на основе результатов SSR-анализа (рис. 5).

	Bvv1	Bvv1	Bvv2	Bvv2	Bvv3	Bvv3	Bvv4	Bvv5	Bvv5	Bvv6	Bvv6	Bvv6
	5	7	1	3	0	2	3	1	3	0	1	4
<i>K</i>	1	1	1		1	1	1	11	1		1	11
<i>1</i>	1	1	1	1				11	1	1	1	1
<i>2</i>	1	1	1	1	1	1		11	1	1	1	1
<i>3</i>	1	1	1	1			1	11		1	1	11
<i>4</i>	1	1	1	1	1		1	11	1	1	1	1
<i>5</i>	1	1	1	1	1	11	1	11		1	1	1
<i>6</i>	1	1	1	1	1		1	11	1	1	1	1
<i>7</i>	1	1	1		1	1	1	11	1	1	1	11
<i>8</i>	1	1	1	1	1	11	1	11	1	1	1	1
<i>9</i>	1	1	1		1	11		1	1		1	1

а)

	Bvv15/43	Bvv21/5	Bvv23/3	Bvv30/6
	3	2	4	
<i>K</i>	II	III	I	II
<i>1</i>	II	III	II	II
<i>2</i>	I	II	II	III
<i>3</i>	II	III III	II	I
<i>4</i>	II		III	III

б)

Рис. 5. Штрих-код трансгенных форм сахарной свеклы и контрольной линии, созданный на основе результатов SSR-ПЦР анализа. а) – растения с геном *mf3* (с 12 парами праймеров); б) – растения с геном *mf2* (с 8 парами праймеров).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить ряд информативных микросателлитных и RAPD-маркеров для надежной детекции генотипов трансгенных растений. Установленные индивидуальные особенности по сочетанию ряда ампликонов открывают широкие возможности для генотипирования трансгенных

форм растений сахарной свеклы. Полученные результаты свидетельствуют о возможности практического использования молекулярных маркеров в селекционном процессе сахарной свёклы. Выявлены наиболее полиморфные RAPD и SSR-праймеры и разработаны методы: идентификации селекционных материалов и подбора родительских пар для скрещиваний, основанные на присутствии / отсутствии фрагментов ДНК, с учётом евклидовых расстояний. Перспективы развития селекции сахарной свеклы в XXI веке мы видим в развитии молекулярной селекции, и ее успехи уже в недалеком будущем будут связаны с успехами геномики. Ожидается, что геномика даст возможность создания сортов и гибридов с комплексом желаемых признаков при знании генов, обеспечивающих контроль за проявлением таких признаков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakiyama N. S., Ramos H. Ch., Caixet E. T., Pereira M. G. Plant breeding with marker-assisted selection in Brazil // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2014. Vol. 14. pp. 54-60.
2. He J., Zhao X., Laroche A., Lu Zh., Liu H., Li Z. Genotyping-by-sequencing (CBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding // *Plant Science*. 2014. Vol. 5. pp. 1-5.
3. Laurent V., Devaux P., Thiel T., Viard F., Mielord S., Touzet P., Quillet M. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome // *Theor Appl Genet*. 2007. Vol. 115. pp. 793-805.
4. Muranty H., Jorje V., Bastien C., Lepoittevin C., Bouffier L., Sanchez L. Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding: lessons from 20 years of MAS in crops // *Tree Genetics and Genomes*. 2014. Springer.
5. Cai D., Klein M., Kifle S., Harloff H.-J., Sandal NN, Marcker K.A, Klein-Lankhorst R.M., Saentijn EMJ, Lange W., Stiekema W.J., Wyss U., Grunder F.M.W., Jung C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet // *Science*. 1997. Vol. 275. pp. 832-834.
6. Broccanello Ch., Chiodi C., Funk A., McGrath M., Panella L., Stevanato P. Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants // *Plant Methods*. 2018. Vol. 14:28. pp. 1-8.
7. Iqbal M.A., Jaiswal S., Angadi U.B., Sablok G., Arora V., Kumar S., Rai A., Kumar D. SBMDb: first whole genome putative microsatellite DNA marker database of sugar beet for bioenergy and industrial applications // *Database*. 2015. Article ID bav111.
8. Holtgrawe D., Sorensen Th., Viehover P., Schneider J., Schulz B. Reliable In Silico Identification of Sequence Polymorphisms and Their Application for Extending the Genetic Map of Sugar beet (*Beta vulgaris*) // *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9. Issue 10.
9. Touzet P., Villain S., Buret L., Martin H., Holl A., Poux C., Cuguen J. Chloroplastic and nuclear diversity of wild beets at a large geographical scale: Insights into the evolutionary history of the Beta section // *Ecology and Evolution*. 2018. Vol. 8. pp. 2890-2900.
10. Свирщевская А.М., Милько Л.В., Кильчевский А.В. Анализ RAPD- спектров сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и оценка возможностей использования метода для идентификации ее форм // Молекулярная и прикладная генетика: сборник научных трудов. Государственное научное учреждение "Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси". Минск, 2011. Т. 12. с. 28-40.
11. Taski-Ajdukovic K., Nagi N., Curcic Z., Zoric M. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 27. pp. 1-7.
12. Srivastava S., Pathak A., Kumar R., Joshi B. Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers // *Journal of Environmental Biology*. 2017. Vol. 38. pp. 777-783.
13. Sandhu S., Sarao N., Goyal M., Uppal S., Singh S., Kaur J. Profiling of sugar beet genotypes for agronomical, sugar quality and forage traits and their genetic diversity analysis using SSR markers // *Electronic Journal of Plant Breeding*. 2015. Vol. 7. №. 2. pp. 253-266.
14. Izzatullayeva V., Akparov Z., Babayeva S., Ojaghi D. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation genetic diversity in sugar beet // *Turkish Journal of Biology*. 2014. Vol. 38. pp. 429-438.
15. Abbasi Z., Arzani A., Majidi M. Evaluation of Genetic Diversity of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Crossing Parents Using Agro-morphological Traits and Molecular Markers // *J. Agr. Sci*. 2014. Vol. 16. pp. 1397-1411.
16. Титок В. В. Биоэнергетическая концепция гетерозиса // Молекулярная и прикладная генетика. 2008. Т. 8. С. 81–93.
17. Simko I., Eujayl I., Hintum T. Empirical evaluation of DArT, SNP and SSR marker-systems

for genotyping, clustering and assigning sugar beet hybrid varieties into populations // *Plant Sci.* 2012. Vol. 184. pp. 54-62.

18. Jacobs A., Koch H., Märlander B. Preceding crops influence agronomic efficiency in sugar beet cultivation // *Agronomy for Sustainable Development.* 2018. Vol. 38. pp. 1-5.

19. Trimpler K., Stockfisch N., Märlander B. Efficiency in sugar beet cultivation related to field history // *European Journal of Agronomy.* 2017. Vol. 91. pp. 1-9.

20. Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Bogacheva N.N. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis // *Russian Agricultural Sciences.* 2014. Vol. 40. Issue 3. pp. 177-178.

21. Rogowsky P. M., Manning S., Liu J.-Y. The R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences: a structural analysis // *Genome.* 1991. № 34. pp. 88-95.

22. Smulders M., Esselink G., Everaert I., Riek J., Vosman B. Characterization of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers // *BMC Genetics.* 2010. Vol. 11. pp. 41-52.

23. Gindalis F., Desel C., Galasso I., Schmidt T. The Large-Scale Organization of the Centromeric

Region in Beta Species // *Genome Research.* 2001. Vol. 11. pp. 253-265.

24. Федулова Т.П., Богомолов М.А., Богачева Н.Н., Жужжалова Т.П., Федорин Д.Н., Ошевнев В.П., Хуссейн А.С. Подбор родительских пар для гибридизации с использованием ДНК-маркеров // *Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы VI Московского Международного конгресса.* М. 2011. ч. 1. С. 234-235.

25. Богачева Н.Н. Изучение генетического разнообразия селекционных материалов сахарной свеклы с использованием молекулярных маркеров: Автореф. дисс. ... к.б.н. Рамонь. 2012. 23 с.

26. Wet J.M.J. De, Newell C., Brink D. Counterfeit Hybrids between *Tripsacum* and *Zea* (Gramineae) // *American Journal of Botany.* 1984. Vol. 71. № 2. pp. 245-251.

27. Schulte D., Cai D., Kleine M., Fan L., Wang Sh., Jung Ch. A complete physical map of a wild beet (*Beta procumbens*) translocation in sugar beet // *Mol Gen Genomics.* 2006. Springer.

28. Хуссейн А.С., Богачева Н.Н., Налбандян А.А., Васильченко Е.Н. ПЦР-анализ трансгенных форм сахарной свеклы с геном Mf2 // *Доклады РАСХН.* 2014. №5. С. 10-13.

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова"

Федулова Т. П., доктор биологических наук, зав. лабораторией биохимии и молекулярной биологии
E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Налбандян А. А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии

Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии клетки
E-mail: rybolov@mail.ru

The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

Fedulova T. P., PhD., DSci., Head of Biochemistry and Molecular Biology laboratory
E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Nalbandyan A. A., PhD., Senior Researcher, dept. of Biochemistry and Molecular Biology laboratory

Voronezh State University
Fedorin D. N., PhD., associate Professor of cell physiology and biochemistry dept.
E-mail: rybolov@mail.ru

PERSPECTIVE TECHNOLOGIES OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) MOLECULAR (MAS) BREEDING

T. P. Fedulova¹, A. A. Nalbandyan¹, D. N. Fedorin^{1,2}

¹ The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

² Voronezh State University

Abstract. Results of molecular-genetic study of sugar beet initial and breeding materials using RAPD and SSR-markers are presented. The most polymorphic DNA-markers applicable to identify varieties beets have been revealed. Genetical formulas and passports of the studied breeding materials have been made,

and correlation between genetical structure of hybrids and their productivity has been determined. The hybrids having yield more than the one of parent forms are characterized by increased number of amplicons revealed by primers PawS 5 and appearance of new components of DNA-spectra which are absent in parent forms. Their parent components have the genetical differences that can be identified in electrophoretograms of amplification products. Low-productive hybrids are characterized by reduced number of amplicons and absence of DNA fragments characteristic for parent initial forms. Introgressive forms resulted from crosses with the wild species *Beta corolliflora* Zoss. have been detected using primers for satellite *Hae III*. In each hybrid and the wild beet, length of the obtained amplicon (161 bp) coincides with size of the studies nucleotide sequence. This PCR-product is the result of specific linkage of the primer with template and confirms presence of the satellite DNA *Hae III* (species-specific for *B. corolliflora*, often repeated in its many chromosomes) in genome of introgressive plants. The analysis of sugar beet materials used as parent forms in hybridization has not revealed presence of the required satellite sequence in their genome. Transgene sugar beet lines with *mf2* and *mf2* genes associated with genes of resistance to phytopathogens have been identified, and barcodes for the lines have been made. As a result of the conducted studies, the microsatellite loci Bv17, 30, 32, and 43 having polymorphism in the investigated parent forms of sugar and fodder beet and characterizing genetical variability of hybrid progeny have been revealed; transfer of genetical material from parent pairs to hybrids has been determined. The question of using marker-associated (or marker-assisted) breeding for the sugar beet based on modern molecular-genetic methods allowing study and identification of genes or loci responsible for a phenotype trait is discussed. The marker-assisted breeding is used in increasing frequency even more often in modern breeding programs.

Keywords: sugar beet, PCR-analysis, RAPD- and SSR-markers, polymorphism, primers, introgressive forms, transgene lines, cluster analysis

REFERENCES

1. Sakiyama N. S., Ramos H. Ch., Caixet E. T., Pereira M. G. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2014, Vol. 14, pp. 54-60.
2. He J., Zhao X., Laroche A., Lu Zh., Liu H., Li Z. *Plant Science*, 2014, Vol. 5, pp. 1-5.
3. Laurent V., Devaux P., Thiel T., Viard F., Mielord S., Touzet P., Quillet M. *Theor Appl Genet.*, 2007, Vol. 115, pp. 793-805.
4. Muranty H., Jorje V., Bastien C., Lepoittevin C., Bouffier L., Sanchez L. *Tree Genetics and Genomes*. 2014. Springer.
5. Cai D., Klein M., Kifle S., Harloff H.-J., Sandal NN, Marcker K.A, Klein-Lankhorst R.M., Saentijn EMJ, Lange W., Stiekema W.J., Wyss U., Grunder F.M.W., Jung C. *Science*, 1997, Vol. 275, pp. 832-834.
6. Broccanello Ch., Chiodi C., Funk A., McGrath M., Panella L., Stevanato P. *Plant Methods*, 2018, Vol. 14:28, pp. 1-8.
7. Iquebal M.A., Jaiswal S., Angadi U.B., Sablok G., Arora V., Kumar S., Rai A., Kumar D. *Database*. 2015. Article ID bav111.
8. Holtgrawe D., Sorensen Th., Viehover P., Schneider J., Schulz B. *PLOS ONE*, 2014, Vol. 9, Issue 10.
9. Touzet P., Villain S., Buret L., Martin H., Holl A., Poux C., Cuguen J. *Ecology and Evolution*, 2018, Vol. 8, pp. 2890-2900.
10. Svirshchevskaya A.M., Milko L.V., Kilchevskiy A.V. *Molecular and Applied Genetics*. Minsk, 2011, Vol. 12, pp. 28-40.
11. Taski-Ajdukovic K., Nagi N., Curcic Z., Zoric M. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, Vol. 27, pp. 1-7.
12. Srivastava S., Pathak A., Kumar R., Joshi B. *Journal of Environmental Biology*, 2017, Vol. 38, pp. 777-783.
13. Sandhu S., Sarao N., Goyal M., Uppal S., Singh S., Kaur J. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 2015, Vol. 7, № 2, pp. 253-266.
14. Izzatullayeva V., Akparov Z., Babayeva S., Ojaghi D. *Turkish Journal of Biology*, 2014, Vol. 38, pp. 429-438.
15. Abbasi Z., Arzani A., Majidi M. *J. Agr. Sci*. 2014. Vol. 16. pp. 1397-1411.
16. Titok V.V. *Molecular and Applied Genetics*, 2008, Vol. 8, pp. 81– 93.
17. Simko I., Eujayl I., Hintum T. *Plant Sci.*, 2012, Vol. 184, pp. 54-62.
18. Jacobs A., Koch H., Märlander B. *Agronomy for Sustainable Development*, 2018, Vol. 38, pp. 1-5.
19. Trimpler K., Stockfisch N., Märlander B. *European Journal of Agronomy*, 2017, Vol. 91, pp. 1-9.
20. Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Bogacheva N.N. *Russian Agricultural Sciences*, 2014, Vol. 40, Issue 3, pp. 177-178.
21. Rogowsky P. M., Manning S., Liu J.-Y. *Genome*. 1991. № 34. pp. 88-95.
22. Smulders M., Esselink G., Everaert I., Riek J., Vosman B. *BMC Genetics*, 2010, Vol. 11, pp. 41-52.

23. Gindalis F., Desel C., Galasso I., Schmidt T. *Genome Research*, 2001, Vol. 11, pp. 253-265.

24. Fedulova T.P., Bogomolov M.A., Bogacheva N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Fedorin D.N., Oshevnev V.P., Hussein A.S. *Biotechnology: State of the art and prospects of development*. M. 2011, pp. 234-235.

25. Bogacheva N.N. *Diss. cand. boil. nauk. Ramon*. 2012, 23 p.

26. Wet J.M.J. De, Newell C., Brink D. *American Journal of Botany*, 1984, Vol. 71, № 2, pp. 245-251.

27. Schulte D., Cai D., Kleine M., Fan L., Wang Sh., Jung Ch. *Mol Gen Genomics*. 2006. Springer.

28. Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Bogacheva N.N., Vasilchenko Y.N. *Russian Agricultural Sciences*, 2014, №5, pp. 10-13.