



ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СОРТОВ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

А.С. Сухарева¹, Б.Р. Кулуев²

¹Башкирский государственный педагогический университет,
450000, Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а, annst@protonmail.com

²Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054, Уфа, Проспект Октября, 71, kuluev@bk.ru

Резюме

Ввиду высокой информативности молекул ДНК в мировой научной практике наблюдается стремительный рост числа методов молекулярно-генетического анализа культурных растений с использованием молекулярных маркеров, которые известны также под названием ДНК-маркеров. Эти же методы анализа молекул ДНК могут быть использованы для генетической паспортизации сортов сельскохозяйственных культур вместо малоинформативных методов анализа белковых маркеров. В данном обзоре обсуждается использование различных ДНК-маркеров для идентификации и оценки генетических ресурсов видов, подвидов, сортов и линий культурных растений. Представлены некоторые сведения по классификации маркеров и примеры их успешного использования в паспортизации, селекции и филогенетических исследованиях. Кратко описаны этапы их использования, а также преимущества и недостатки отдельных методов. Наиболее эффективными и недорогими методами выявления внутривидового полиморфизма могут считаться ISSR, SSR и SNP-анализы. Из них наибольшей информативностью обладает метод SNP-анализа, который вероятнее всего и будет находить все более широкое применение в генетическом анализе и селекции культурных растений. Отмечено, что разные виды маркеров подходят для изучения полиморфизма как внутри одного вида, так и в более высоких таксономических группах (род, семейство и т. д.). Для популяционных и эволюционных исследований также отмечена необходимость использования нескольких эволюционирующих независимо маркеров, например, ядерных, хлоропластных и митохондриальных.

Ключевые слова: генетический анализ, молекулярные маркеры, ДНК-маркеры, генетическая паспортизация, фингерпринтинг, SSR, RAPD, RFLP, CAPS, ISSR, SNP

Цитирование - Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*. 2018. 10(1). С. 69-84. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15

DNA MARKERS FOR GENETIC ANALYSIS OF CROPS

A.S. Sukhareva¹, B.R. Kuluev²

¹Bashkir State Pedagogical University, 450000, Ufa, October Revolution st., 3a annst@protonmail.com

²Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054, Prospect Oktyabrya 71, kuluev@bk.ru

Resume

Due to the high information content of DNA molecules, a rapid growth in the number of methods of crop molecular genetic analysis using molecular or DNA markers is observed in world scientific practice. The same methods of DNA analysis can be used for genetic certification of crop varieties instead of low-information methods for the protein markers analysis. This review discusses the use of various DNA markers for the identification and evaluation of genetic resources of species, subspecies, varieties and lines of cultivated plants. Some information on the classification of markers and examples of their successful use in certification, selection and phylogenetic studies are presented. Briefly describes the stages of their use, as

well as the advantages and disadvantages of different methods. The most effective and inexpensive methods for detecting intraspecies polymorphism can be considered ISSR, SSR and SNP-analyses. The SNP-analysis method is the most informative, which is most likely to find increasing application in the genetic analysis and selection of cultivated plants. It is noted that different types of markers are suitable for studying polymorphism both within a single species and in higher taxonomic groups (genus, family, etc.). Population and evolutionary studies also noted the need to use several evolving independently markers, for example, nuclear, chloroplast and mitochondrial markers.

Keywords: genetic analysis, molecular markers, DNA markers, genetic certification, fingerprinting, SSR, RAPD, RFLP, CAPS, ISSR, SNP

Citation - Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomics*. 2018. 10(1). P. 69-84. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15 [In Russian]

Введение

На сегодняшний день технологии выявления молекулярных или ДНК-маркеров становятся важным стандартом селекции растений и получают все более широкое применение по всему миру. Их использование позволяет точно и быстро выявлять генетическое разнообразие популяций, подвидов, видов, и даже дифференцировать более высокие таксономические ранги - рода и семейства, а также делает возможным создание генетических фингерпринтов ("отпечатков пальцев") сортов, и эффективно, с точки зрения затрат, определять хозяйственно-ценные признаки еще на начальном этапе селекции на уровне ДНК. Эти же методы могут стать основой для генетической паспортизации сортов, линий и гибридов различных культурных растений.

Выведение новых сортов растений занимает в среднем от 7 до 12 лет. А это означает, что селекционер должен предвидеть потребности сельского хозяйства как минимум на десять лет вперед, и если он ошибется в прогнозах, то его многолетний труд может быть потрачен напрасно, и на исправление ошибки уйдут долгие годы. Поэтому, сейчас для ускорения селекционного процесса у растений, одними из важных направлений рассматриваются так называемые маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS) [Азарин и др., 2012] и геномная селекция GS (Genomic Selection) [Хлесткина, 2013], в основе которых также лежит исследование ДНК-маркеров.

Изучение и сохранение генетических ресурсов культурных растений – ключевой момент устойчивого развития сельского хозяйства любой страны. Потеря таких ресурсов, а как следствие, и генетического разнообразия, является суровой реальностью современности [Кармен де Висенте и др., 2003]. Все экономически развитые страны выделяют большие финансовые средства для сохранения генетических ресурсов как дикорастущей флоры, так и культурных растений. Однако этого пока нельзя сказать про современную Россию, где после распада СССР данному вопросу уделяется недостаточное внимание.

В настоящее время важной составляющей при создании новых сортов культурных растений является их генетическая паспортизация, в основе которой лежит ДНК-фингерпринтирование (DNA fingerprinting) – совокупность методов создания генетических "отпечатков пальцев", основанных на анализе полиморфизма ДНК. В России, как и во всем мире, современные стандарты селекции и семеноводства также предполагают генетическую паспортизацию новых сортов культурных растений. Паспортизация сортов нужна, к примеру, при сертификации и коммерческом распространении семян. Однако методы, лежащие в основе генетической паспортизации, могут быть успешно применены селекционерами и при селекционной работе, например, для раннего выявления генетических маркеров ценных фенотипических признаков, а также для закрепления и сохранения селекционных достижений. Методы генетической паспортизации также применяются по всему миру в семеноводстве и при проверке закупаемых партий семян на соответствие заявленному сорту, так как случаи мошенничества в этой области встречаются нередко. В России, да и в мире, для паспортизации сортов культурных растений продолжают применять методы электрофоретического определения полиморфизма белков [Смирнова, 2000; Давидчук и др., 2009]. Однако белковые маркеры на сегодняшний день считаются устаревшими из-за большого числа недостатков и их все реже используют при генетическом анализе культурных растений [Хлесткина, 2013]. Более перспективными представляются методы генетической паспортизации сельскохозяйственных растений, основанные на ДНК-маркерах. В течение последних нескольких лет в России также наблюдается переход паспортизации сортов от анализа белкового полиморфизма на систему выявления полиморфных локусов ДНК [Азарин и др., 2012]. К сожалению, в России селекция культурных растений до сих пор чаще всего идет исключительно по фенотипическим признакам, из-за чего тратится много времени для создания новых сортов. Для повышения эффективности селекционной работы и уменьшения необходимого для создания сорта времени представляется актуальным использование современных методов генетического анализа. При умелом сочетании

фенотипических и генотипических методов время необходимое для получения новых сортов культурных растений может быть уменьшено в разы.

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры для изучения генома растений представлены в таблице. Там же приведена классификация молекулярных маркеров по базовому методу, используемому для выявления полиморфизма ДНК (блот-гибридизация, ПЦР –

полимеразная цепная реакция и ДНК-чипирование) и по количеству выявляемых при анализе аллелей маркерного локуса. Если метод анализа маркера позволяет выявить оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования маркера (моноклусные), если выявляется только одна аллель – о доминантном типе (мультилокусные) [Кондратенко и др., 2015]. При этом точность оценок при помощи кодоминантных маркеров выше, т.к. их гетерозиготное состояние отличается от гомозиготного, в отличие от доминантных маркеров (рис.).

Таблица 1.

Классификация и сравнительная характеристика основных ДНК-маркеров
[по Хлесткиной, 2013; Кондратенко и др., 2015; Калько, 2015].

Классификация	Моноклусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Методы, основанные на блот-гибридизации	RFLP – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	Минисателлиты
Методы, основанные на ПЦР	SSR – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) STS – нуклеотидные последовательности, характеризующие локус SCAR – нуклеотидная последовательность, характеризующая амплифицированную область SSCP – конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК CAPS – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности	RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК ISSR – межмикросателлитный полиморфизм IRAP – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами AFLP – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов SSAP – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	SNP – однонуклеотидный полиморфизм	DarT – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия
Тип наследования	Кодоминантный тип	Доминантный тип
Область применения у растений	- картирование генов, QTL (локусов количественных признаков), хромосом и геномов - маркирование генов, хромосом и геномов - сравнительная генетика и геномика - отбор с помощью ДНК-маркеров в селекции - геномная селекция (только SNP-маркеры) - молекулярная паспортизация сортов/пород - диагностика заболеваний - экологический мониторинг - исследование генетического разнообразия - филогенетические исследования - популяционная генетика	- составление молекулярных карт хромосом и геномов (только AFLP-и DArT-маркеры) - картирование генов и QTL (только AFLP-и DArT-маркеры) - геномная селекция (DArT-маркеры) - молекулярная паспортизация сортов/пород - экологический мониторинг - исследование генетического разнообразия - филогенетические исследования - популяционная генетика

Основными инструментами для выявления ДНК-полиморфизма на уровне нуклеотидных последовательностей можно считать три базовых метода: рестрикционный анализ (с 1974 г.), полимеразная цепная реакция (ПЦР) (с 1988 г.) и секвенирование (с 1977 г.) [Калько, 2015]. Если в 90-е годы прошлого века и в начале XXI века в основном использовались методы, основанные на ПЦР, то на сегодняшний день наблюдается рост популярности методов изучения SNP (ДНК-чипы), а также применяют методы прямого секвенирования отдельных участков ДНК. Можно предполагать, что при существенном снижении стоимости полногеномного секвенирования, именно эта методика может стать основой генетического анализа и паспортизации в обозримом будущем. Однако на сегодняшний день до сих пор более частое применение находят методы основанные на ПЦР, ввиду их дешевизны и простоты (рис. 1).

ДНК-маркеры для генетического анализа культурных растений ранее уже рассматривались в обзорных статьях как в русскоязычной [Хлесткина, 2013], так и зарубежной литературе [Idrees, Irshad, 2014]. Однако после опубликования этих и других обзорных статей прошло около 5 лет, поэтому мы решили снова обратить внимание интересующихся специалистов и в особенности отечественных селекционеров к этому вопросу. Целью данного обзора является рассмотрение некоторых методов выявления полиморфизма ДНК (молекулярных маркеров), которые могут быть использованы для идентификации, генетического анализа и паспортизации сортов культурных растений, с учетом данных последних лет.

RFLP-маркеры (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Для обнаружения изменчивости на уровне ДНК одним из первых (с 1980 г.) стали использовать анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) или англ. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Анализ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикция специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификация фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, путем блот-гибридизации по Саузерну. Если анализируемый участок имеет измененный состав нуклеотидных последовательностей, то рестриктаза не может его разрезать и на электрофореграмме наблюдается разделение фрагментов по длине. ПДРФ-анализ был значительно упрощен и стал более информативным после совмещения его с ПЦР. Поэтому многие

исследователи ПДРФ-маркеры начали переводить в ПЦР-ПДРФ-маркеры.

Преимущества метода ПДРФ

[по Кармен де Висенте и др., 2003]:

- Надежная методология, которую можно повторить в разных лабораториях;
- Наследуется кодоминантно, следовательно, может быть использован для оценки гетерозиготности;
- Не требует информации о нуклеотидной последовательности;
- Пригоден для филогенетического анализа родственных видов и родов, в пределах одного семейства [Хлесткина, 2013];
- Подходит для построения карт генетического сцепления [Календарь и др., 2002];
- При наличии подходящих зондов можно исследовать любые растения.

Недостатки метода ПДРФ:

- Требуется большое количество ДНК;
- Невозможность автоматизации;
- Низкий уровень полиморфизма у некоторых видов;
- Обнаруживается небольшое число локусов во время анализа;
- Требуется больших временных затрат (при использовании гибридизации по Саузерну), в особенности с однокопийными пробами;
- Дороговизна, связанная с использованием радиоактивных и нерадиоактивных меток и рестриктаз [Календарь, 1996];
- Необходимо распространение зондов между сотрудничающими лабораториями.

При помощи технологии ПДРФ-анализа удалось установить гомологию между хромосомами пшеницы (*Triticum tauschii*) и ячменя (*Hordeum vulgare*). Оказалось, что в геномах этих растений, принадлежащим к разным родам, более 95% малокопийных последовательностей сходны, но различие в умеренных повторах составляет 42% [Devos et al., 1993]. Также, при помощи этого метода возможна идентификация генов устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Так, например, на основе 10 групп сцепления сконструированных на 88 линиях овса идентифицированы гены устойчивости к стеблевой ржавчине [Rayapati et al., 1994], а у *Triticum spelta* в длинном плече 5А хромосомы идентифицировали три ПДРФ-маркера, сцепленных с генами *Vrn1* и *Frl1*, ассоциированных с яровизацией и морозостойкостью, соответственно [Galiba et al., 1995]. На основе ПДРФ-анализа была сконструирована подробная карта сцепления 220-ти ПДРФ-локусов с 28-ю количественными признаками

(QTLs) у *Brassica rapa* [Song et al., 1995]. Song с соавт. [1995] также сравнили физическую карту, полученную с помощью гибридизации *in situ*, и генетическую карту риса (*Oryza sativa* L.), основанную на 44-х ПДРФ-маркерах. В среднем расхождение в данных составило 5,91%, а расстояние между двумя маркерами на генетической карте было большим, чем на физической. Авторы связывают свои результаты с различной частотой кроссинговера вдоль хромосомы и с центромерным и теломерным эффектами положения [Song et al., 1995]. Для установления генов-восстановителей фертильности ржи (*Secale cereale* L.) для сравнения митохондриальных геномов использовался ПДРФ-анализ и был обнаружен один зонд, коррелирующий с фенотипом мужской цитоплазматической стерильности [Dohmen et al., 1994].

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) - полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК

Развитием RFLP-анализа является метод CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). По сути, он является объединением классического ПДРФ-анализа с методом ПЦР, что позволяет работать с определенным фрагментом ДНК, вместо использования всей геномной ДНК [Neubl, 2013].

CAPS-анализ состоит из следующих этапов:

1. Выделение ДНК;
2. Проведение ПЦР со специфическими праймерами;
3. Гидролиз амплифицированных фрагментов с помощью рестриктаз;
4. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза в геле.

Различия проявляются в легко отличимых по длине продуктах - фрагментах ДНК при электрофорезе. CAPS-маркеры разрабатываются на основе известной нуклеотидной последовательности, являются кодоминантными и позволяют выявлять полиморфизм в большом количестве индивидуумов [Омашева, 2013]. CAPS-метод используют для изучения строения, функции, экспрессии и регуляции генов, а также этот метод является удобным инструментом для маркер-опосредованной селекции (MAS). Методику широко используют в отборе на устойчивость к фитопатогенам у таких культурных растений как соя, ячмень, картофель, пшеница, томат и др., в случае если CAPS-маркеры основаны на фрагментах ДНК, тесно сцепленных с генами устойчивости [Шавруков, 2015]. Таким образом, CAPS-маркеры являются эффективным инструментом как в молекулярно-генетических исследованиях, так и в селекции растений.

CAPS-маркер, разработанный для идентификации гена *Vp-1* (*Viviparous-1*) пырейного происхождения в геноме пшенично-пырейных гибридов, является примером возможного успешного применения молекулярных маркеров данного типа в MAS [Дивашук, 2011]. Было установлено, что гибрид пшеницы и пырея содержащий ген *Vp-1* пырея, обладает большей устойчивостью к прорастанию на корню, и может послужить донором данного гена для его интрогрессии в геном мягкой пшеницы (*T. aestivum*). Гены *Vp-1* пшеницы кодируют полноразмерный белок, но в результате некорректного сплайсинга первичного транскрипта образуются aberrантные продукты трансляции. Авторы считают, что внедрение пырейного ортолога, будет способствовать большей устойчивости пшеницы к прорастанию на корню, что поможет исключить потерю части урожая [Дивашук, 2011]. Ряд исследователей занимались разработкой методов ДНК-типирования генов *nor*, *rin* и *alc* контролирующих задержку созревания плодов томата, что способствует лучшей лёжкости плодов, и предложили CAPS-маркер для идентификации гена *alc* [Малышев и др., 2008]. Авторы приняли гипотезу о том, что мутант *alcobaca* является аллельной формой гена *nor* [Lobo et al., 1984; Mustchler, 1984] и разработали аллелеспецифические маркеры к гену *nor*, используя последовательность AY573803 из GenBank, содержащую ген *LeNAC-NOR*. Затем они секвенировали ген *LeNAC-NOR* у селекционной линии Мо-950, несущей ген *alc*. Далее была идентифицирована точечная мутация, приводящая к аминокислотной замене валин - аспарагин. Данная одиночная трансверсия тимин - аденин, приводит к тому, что мутантная аллель не расщепляется рестриктазой *Cfr10I*. На основании этого и был предложен данный CAPS-маркер [Малышев и др., 2008].

AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов ДНК

Метод AFLP состоит из нескольких этапов: геномная ДНК разрезается двумя рестриктазами (обычно, *EcoRI* и *MseI*) с образованием выступающих 3'-концов, затем лигируется с адаптером, содержащим "липкие" концы для данных сайтов рестрикции. Далее проводятся две последовательных ПЦР: в первой, так называемой преамплификации, используют полностью комплементарные адаптерам *EcoRI* и *MseI* праймеры – их невозможно дифференцировать электрофоретически, во второй используют праймеры, содержащие на 3'-конце некомплементарные адаптерам дополнительные

основания (от 1 до 3) - для селективной амплификации [Календарь и др., 2002].

Преимущества AFLP:

- Позволяет визуально оценить сразу сотни обработанных рестриктазой ампликонов ДНК [Глазко и др., 2000];
- Высокополиморфный фингерпринт (выше, чем при RAPD и ISSR) [Баташова и др., 2008];
- Дает хорошо воспроизводимые результаты [Календарь и др., 2002];
- Позволяет определить точковые мутации в сайте рестрикции или в участках отжига затравки [Breune et al., 1997] и небольшими вставками-делециями внутри рестриктов (изменение размера полосы в спектре) [Календарь и др., 2002];
- Дает общую картину изменчивости генома [Mueller et al., 1999; Savelkoul et al., 1999];
- Успешно применяется в генотипировании и таксономическом анализе [Korzun, 2002];
- Подходит для создания карт хромосом и геномов [Хлесткина, 2013];
- Возможно определение генетической дистанции между изогенными линиями одного сорта [Баташова и др., 2008].

Недостатки AFLP:

- Доминантный тип наследования;
- Сравнительно сложный и дорогой (по сравнению с RAPD и ISSR);
- Многие выявленные молекулярно генетические маркеры, локализуются в центромерных и гетерохроматиновых районах хромосом, что может быть связано с неравновероятным распределением сайтов узнавания используемых рестриктаз [Календарь и др., 2002].

При подборе наиболее удачной комбинации праймеров при AFLP-анализе возможно выявление внутривидовой дифференциации сортов, например, сортов озимой пшеницы. Исследователями из Украины проведен анализ 17 линий и сортов Полтавской государственной аграрной академии и одного бельгийского сорта *Kaspart*. Было подобрано 5 комбинаций наиболее информативных праймеров *MseI* и *EcoRI*, из которых комбинация №3 показала наиболее полиморфный результат - 34%. На основе полученных данных была построена дендрограмма и по ней авторы смогли определить генетическое расстояние между двумя изогенными линиями озимой пшеницы [Баташова и др., 2008].

Метод AFLP довольно часто используется для выявления генетического полиморфизма между разными сортами и линиями культурных растений. К примеру, при помощи этого метода был оценен

полиморфизм между прядильными и наркотическими сортами конопли [Datwyler, Weiblen, 2006], между разными сортами черного перца *Piper nigrum* [Joy et al., 2007], репы *Brassica rapa* [Zhao et al., 2005] и других культур.

RAPD-маркеры (Random Amplified Polymorphic DNA) - случайно

амплифицированная полиморфная ДНК

RAPD ПЦР - полимеразная цепная реакция, основанная на использовании одного, обычно декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью [Williams et al., 1990]. Начиная с 1990 г. метод RAPD активно используется, в частности, в генетике растений - для некоторых из видов растений с его помощью построены генетические карты [Календарь и др., 2002]. Как правило, исследования с использованием RAPD выполняются следующим образом: из большого количества декануклеотидов эмпирическим путем подбираются такие, которые дают у данного объекта исследований наиболее легко типизируемые продукты амплификации, воспроизводящиеся при повторных исследованиях ДНК, несколько раз выделенной из одного и того же источника, т.е. подбираются уже из имеющихся наиболее удобные праймеры. Причем для решения некоторых задач, например генетической паспортизации особей или сортов, удобнее подбирать праймеры, дающие большее число ампликонов, для межвидовых сравнений - с меньшим спектром продуктов амплификации.

К основным свойствам RAPD можно отнести следующие [Календарь и др., 2002]:

- Доминантный тип наследования (присутствие / отсутствие);
- Относительно низкая точность (праймер в 10 нуклеотидов может давать такой же спектр ампликонов, как и праймер в 15 или 8 нуклеотидов);
- Зависимость от характеристик амплификатора и ДНК-полимераз (для большинства случаев максимальная длина амплифицируемого фрагмента - 2500-3000 пар нуклеотидов);
- Локализация в геноме неизвестна.

Преимущества RAPD:

- Метод удобен для исследований разных видов при использовании одних и тех же праймеров;
- Не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров;
- Позволяет быстро обнаружить вариабельность большого числа локусов по всему геному;
- Дешевизна и простота.

Недостатки RAPD:

- Чувствительность к изменениям условий реакции (буфер, полимеразы и концентрации компонентов реакции) и характеристик амплификатора (уменьшенная стабильность условий, например при отсутствии термостатированной крышки).

- Температура реакции отжига достаточно низкая (30-37°C), что увеличивает вероятность образования продуктов амплификации (ампликонов) с большим количеством неспаренных оснований (ошибки отжига).

- RAPD-маркеры, как правило, ведут себя как доминантные, и их гетерозиготное состояние не отличается от гомозиготного, при этом точность оценок по сравнению с кодоминантными маркерами снижается.

- Для того чтобы уровень статистической достоверности данных, полученных при RAPD-анализе, соответствовал таковому при использовании кодоминантных маркеров, необходима довольно большая выборка;

- В результате ошибок отжига праймера образуются тусклые полосы. Чем больше таких ошибок, тем хуже амплифицируются RAPD-продукты и тем сложнее воспроизводить их при изменении условий реакции.

RAPD-анализ был применен в качестве инструмента для оптимизации селекционного процесса при проведении отбора дивергентных перспективных пар гибридизации в селекции на гетерозис образцов перца стручкового (*Capsicum annuum* L.) с целью изучения эффективности использования ДНК-скрининга [Шаптуренко и др., 2013]. С помощью RAPD ПЦР был проведен анализ хозяйственно важных признаков диаллельных гибридов F1 для изучения сопряженности уровня дивергенции родительских форм и эффекта гетерозиса в поколении F1. Уровень выявленного полиморфизма составил 44,1%. Результаты ПЦР-анализа позволили исследователям разделить экспериментальные образцы перца на дивергентные классы и идентифицировать полиморфные пары скрещивания, которые характеризовались хорошим сочетанием хозяйственно важных признаков (урожайность, архитектура плода, срок созревания) и обладали достаточным уровнем генетической дивергенции [Шаптуренко и др., 2013].

RAPD-анализ хорошо подходит и для филогенетических исследований. С его помощью удалось выявить и рассчитать уровень внутри- и межвидового полиморфизма у представителей рода *Aegilops* L. - ближайшего сородича пшеницы, произрастающих на территории Таджикистана, и построить дендрограмму для сравнения

генетического расстояния между ними [Кавракова, 2015]. Данный метод также был применен для расчета уровня внутривидового полиморфизма у пяти дикорастущих и одной культурной формы однолетнего подсолнечника [Маркин, 2010]. Однако для более точного генетического анализа подсолнечника еще ранее применяли метод SSR [Solodenko, 2005].

SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты)

SSR-локусы представляют собой простые повторяющиеся фрагменты генома, с единицей повтора 1-5 нуклеотидов. Они присутствуют в геномах всех высших организмов, как в ядерном, так и в геномах органелл, наследуются кодоминантно, достаточно легко детектируются и имеют более высокий уровень полиморфизма по сравнению с другими генетическими маркерами. Для многих видов растений составляются генетические карты сцепления SSR-маркеров с генами, кодирующими хозяйственно ценные признаки [Кильчевский, 2017]. Метод SSR-анализа является наиболее перспективным и пригодным для практического использования, благодаря таким критериям как высокая точность, надежность, а также хорошая воспроизводимость результатов.

С помощью метода SSR-анализа разработана система молекулярных методов для установления родственных связей, выделения уникальных генотипов и идентификации сортов, растений родов *Malus* и *Pyrus* из генофонда плодовых культур Беларуси на основе оценки уровня их генетического разнообразия и степени гомологии [Урбанович, 2015]. В ходе работы были определены гомологичные SSR-локусы видов и межвидовых гибридов, что позволило создать универсальную систему ДНК-идентификации: для рода *Malus* из 6 высокоинформативных полиморфных маркеров, для рода *Pyrus* - из 7 SSR-маркеров. Разработанный метод позволил получить молекулярно-генетические формулы сортов яблони, вишни обыкновенной, сливы домашней, сливы диплоидной и абрикоса, и осуществить ДНК-идентификацию генотипов в соответствии с критериями Отличимости, Однородности и Стабильности (ООС-тест) [Семашко, 2011]. Также были получены дендрограммы генетического сходства сортов этих плодовых культур [Урбанович, 2015]. На основе 8 SSR-маркеров был предложен достаточно информативный метод генетической идентификации сортов земляники садовой (*Fragaria ananassa*), селекции Беларуси, России, Германии, Польши и других стран. Анализ позволил выявить 72

различных генотипа, 86 аллелей, в среднем 11 аллелей на маркер [Межнина и др., 2016]. Исследователи из Украины при помощи SSR-метода проводили сравнительный анализ двух линий кукурузы: ВІР-27 и, полученную из этой линии путем обработки семян стрептомицином (мутаген), линию ЧК-218 [Майданюк и др., 2007]. Степень полиморфизма SSR-локусов оказалась равной 26,9%, тогда как дальнейший RAPD-анализ этих же линий кукурузы позволил выявить степень полиморфизма равную 21,7%, из чего авторы сделали вывод, что стрептомициновый мутагенез затрагивает различные участки генома примерно в равной степени. Также было отмечено, что значительная часть проанализированных SSR-локусов имели более одного аллеля в геноме каждой линии, что может быть обусловлено гетерогенностью используемой для анализа смеси ДНК нескольких растений. Этот же эффект при изучении SSR-полиморфизма исходных линий и линий-мутантов кукурузы наблюдался в работе исследователей из Болгарии, в которой авторы объясняют его загрязнением и дубликацией анализируемых последовательностей [Kostova et al., 2006].

Геном хлоропластов и митохондрий наследуется от одной из родительских форм, поэтому его широко используют для популяционных и эволюционных исследований у растений. Анализ последовательностей пластома 10 видов стручкового перца (род *Capsicum*) SSR-методом позволил сделать предположение о сходстве эволюционных процессов в ядерном и хлоропластном геномах [Рыжова и др., 2004]. Для анализа стручкового перца был применен праймер, подобранный к *Nicotiana tabacum*, что позволило обнаружить незначительную дивергенцию пластоменных последовательностей у разных родов семейства *Solanaceae* и предложить использование того же праймера для изучения картофеля (*Solanum tuberosum*). На основе проведенного микросателлитного сравнения хлоропластной ДНК была построена дендрограмма близкородственных видов перца, которая оказалась аналогичной таковой, построенной в результате RAPD-, AFLP- и изоферментного анализов, причем SSR-метод позволил выявить более высокий уровень внутривидового полиморфизма по сравнению с RAPD- и AFLP-анализом у представителей *Capsicum baccatum* [Рыжова и др., 2004].

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – межмикросателлитные последовательности

Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности при подборе праймеров к этим генам, что и лежит в основе ISSR-анализа. Этот

метод начал развиваться в 1994 г., а к настоящему времени получил широкое распространение, особенно в исследованиях генофондов различных видов растений [Глазка и др., 1999].

Основные свойства ISSR:

1. В этом методе используется один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида [Сулимова, 1991];
2. Праймеры состоят из tandemных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера (например 5'-CA CA CA CA CA CA CA CA G) [Календарь и др., 2002];
3. Продукты ISSR-амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера;
4. Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость результатов по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига;
5. Локализация в геноме неизвестна;
6. Маркеры данного типа используются для выявления генетической идентичности, родословной, дифференциации клонов, микроклонов и линий, таксономии близкородственных видов [Омашева и др., 2013].

Преимущества ISSR-анализа:

- Для создания маркеров не требуется знание нуклеотидной последовательности [Вдовиченко и др., 2007; Бобошина и др., 2012];
- Не требует предварительного клонирования фрагментов для подбора праймеров;
- Полилокусность – наличие большого количества продуктов амплификации [Вдовиченко и др., 2007];
- Выявляемый полиморфизм с помощью ISSR, как правило, выше и более четко воспроизводим, чем в RAPD;
- Метод удобен для генетического анализа т.к. в геномах растений количество микросателлитных повторов очень велико;
- Предполагается их относительно равномерное распределение по длине генома;
- Дает четко воспроизводимые и стабильные результаты [Zhuet al., 2011];
- Дешевизна и простота.

Недостатки ISSR-анализа:

- Необходимо подбирать последовательность ISSR-праймеров более строго и использовать в анализе только "яркие" продукты ISSR-амплификации [Календарь и др., 2002];
- Доминантный тип наследования, что не позволяет различать гомо- и гетерозиготы [Вдовиченко и др., 2007];

- Эффект реамплификации – повторная амплификация, ведущая к увеличению количества ампликонов, вследствие изменения условий реакции, например, температуры отжига [Wiesner et al., 2003].

Возможность использования ISSR-метода для оценки разнообразия сортов пшеницы мягкой (*T. aestivum*) была подтверждена в работе Бобошиной и др. [2012]. Своей целью исследователи ставили молекулярно-генетический анализ четырех сортов *T. aestivum* на основании ISSR-полиморфизма. Результаты проведенной работы позволили сделать вывод о том, что данный метод удобен и оптимален для выявления межсортовых различий мягкой пшеницы [Бобошина и др., 2012]. Метод ISSR-анализа наряду с RAPD применялся также при филогенетическом анализе десяти сортов ржи Португалии и Бразилии [Matos et al., 2001], при котором было изучено 342 ISSR-маркера.

У различных таксонов обнаружены принципиальные отличия спектров продуктов амплификации относительно их полиморфизма при использовании одних и тех же фрагментов микросателлитных локусов в качестве праймеров в ISSR. Для диких и культурных видов сои наибольшее количество продуктов амплификации и наиболее полиморфные спектры наблюдали при использовании динуклеотидных микросателлитных повторов по сравнению с тринуклеотидными повторами в качестве праймеров [Глазка, 2000]. И это свидетельствует об отличиях в распределении микросателлитных повторов по геномам видов, принадлежащих разным таксономическим группам [Календарь и др., 2002].

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

Известно, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) лежит в основе возникновения новых аллелей. Высокая плотность и эволюционная стабильность ОНП делают их одним из наиболее удобных генетических маркеров [Азарин, 2012]. SNP-анализ считается одним из наиболее эффективных ДНК-маркеров для выявления внутривидового полиморфизма (рис. 1), что имеет важное значение для генетической паспортизации сортов культурных растений [Калько, 2015]. SNPs почти равномерно распределены по геному и, на основе этого, Мовиссеном с соавт. был предложен упомянутый выше тип селекции – **GS** (Genomic Selection - геномная селекция) [Meuwissen et al.,

2001]. SNP можно обнаружить с помощью оборудования для DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography - денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография) или посредством использования микрочипов (SNP-arrays) [Кармен де Висенте и др., 2003].

Микрочип или ДНК-чип (DNA microarray) - миниатюрная пластина с нанесенными на нее в определенном порядке фрагментами одноцепочечной ДНК — ДНК-зондами с известной последовательностью, которые ковалентно пришиты к твёрдому основанию – кремниевой, стеклянной, силиконовой или пластиковой пластине [Калужный, 2010].

Использование микрочипов предполагает три этапа [Sassanfar et al., 2003]:

1. Подготовка ДНК-чипа (или покупка);
2. Проведение реакции (выделение ДНК, подготовка ДНК и гибридизация с ДНК-чипом);
3. Сбор и анализ результатов.

Преимущества SNP-array:

- Технология позволяет использовать сравнительно малое количество исходного материала [Баранов, 2009];
- Высокая плотность и эволюционная стабильность [Азарин, 2012];
- ОНП наблюдаются чаще любых других типов полиморфизмов [Кармен де Висенте и др., 2003];
- Высокий уровень информативности [Haseneyer et al., 2011];
- Возможность полной автоматизации анализа [Хлесткина, 2013];
- Возможен одновременный многопараметрический анализ нескольких генов одного объекта исследований [Баранов, 2009];
- Подходят для геномной селекции [Meuwissen et al., 2001];
- SNP располагаются внутри или очень близко к генам интереса [Кармен де Висенте и др., 2003];
- Кодоминантный тип наследования [Хлесткина, 2013; Кондратенко и др., 2015; Калько, 2015].

Недостатки SNP-array [Sassanfar et al., 2003]:

- Слишком большой массив получаемых данных, требуется довольно много времени и трудозатрат для обработки результатов;
 - Результаты могут быть не всегда воспроизводимыми или слишком сложными для интерпретации;
 - Технология SNP-array остается дорогостоящей.
- Методы, основанные на SNP-анализе, характеризуются самым высоким уровнем

информативности, так как позволяют одновременно выявлять сотни и даже тысячи ДНК-маркеров. К примеру, технологии ДНК-микрочипов стали основой для определения генотипа ржи с использованием 5234 SNP-маркеров [Haseneyer et al., 2011]. Однако имеются данные, что SNP-маркеры, разработанные и апробированные на основе одних сортов мягкой пшеницы (*T. aestivum*), не подходят для оценки сходства с сортами, имеющими другое географическое происхождение, а также с другими видами злаков (*Secale cereale*) [Козлова и др., 2009].

Анализ однонуклеотидного полиморфизма 270-ти линий кукурузы украинской селекции позволил сформировать электронную базу данных их генетических паспортов [Сатарова и др., 2013]. Эта база также содержит общедоступную информацию о SNP-паспортах 491 линий кукурузы, и может быть использована для оценки степени новизны созданных линий при селекции, защиты авторских прав на сорта растений, а также для разработки методологических принципов регистрации линий и гибридов кукурузы по аллельному состоянию маркеров однонуклеотидного полиморфизма [Сатарова и др., 2014].

Для генотипирования хлопчатника был создан чип (SNP-array) CottonSNP80K, позволяющий проводить анализ по 82259 SNP-маркерам [Cai et al., 2017]. При помощи 5K SNP-чипа, содержащего 5000 снипов, были идентифицированы два QTL, обуславливающие устойчивость риса к теплу [Ps et al., 2017]. Уже из этого небольшого числа литературных сведений можно сделать вывод, что SNP-анализ является очень перспективным методом генетического анализа, однако его широкому распространению в России мешает относительная дороговизна самих ДНК-чипов и необходимость специализированного оборудования.

DArT (Diversity Array Technology) – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия

Технология разнородных массивов (DArT) представляет собой маркерную систему на основе микрочипов [Lu et al., 2013a]. DArT-технология отличается от SNP тем, что не требует данных о последовательности генома для разработки чипов [Хлесткина, 2013]. Также как и при SNP-методе, при помощи DArT-array

можно одновременно выявлять полиморфизм сразу в нескольких сотнях [Wenzl et al., 2004] и тысячах [Jing et al., 2009] локусах не только у диплоидных растений, но и, например, у гексаплоидной пшеницы (*T. aestivum*) [Akbari et al., 2006].

Исследователями из Китая был разработан DArT-чип для табака (*N. tabacum*), который был успешно применен ими для филогенетического анализа 267 культивируемых сортов курительного табака из Китая, Северной и Южной Америки и других стран [Lu et al., 2013a], а также для составления генетической карты табака [Lu et al., 2013b]. DArT-маркеры могут быть использованы в геномной селекции, что продемонстрировано на примере пшеницы [Charmet, 2012]. Потенциал высокопроизводительного генотипирования методом DArT был рассмотрен на геноме риса, использованного в качестве модели [Jaccoud et al., 2001]. Данный метод также применяется при составлении генетических карт и изучении разнообразия, что показано в работе по картированию генома ячменя [Wenzl et al., 2004]. DArT-маркеры также оказались полезными при мечении гена устойчивости к листовой ржавчине (*LrAeSh1644*) у *Aegilops sharonensis*. Выбранный ген был фланкирован двумя DArT-маркерами, что дает информацию о его хромосомном положении и, таким образом, облегчает передачу этого гена в геном пшеницы для ее улучшения [Olivera et al., 2013].

Проводилось сравнение эффективности DArT-маркеров с AFLP- и SSR-маркерами в генетических картах 93 диплоидных линий гибридов *T. aestivum* 'Arina' и норвежской линии яровой пшеницы *NK93604*, в результате которого оказалось, что DArT-маркеры дают меньший процент (13,8%) сегрегационного искажения, чем AFLP (24,2%) и SSR (22,6%); DArT показывают самую высокую частоту кластеризации (27%), тогда как у AFLP и SSR эти показатели равны 8,9% и 1,8% соответственно [Semagn et al., 2006]. По результатам этой работы авторы делают вывод о том, что технология DArT является более точной и эффективной по сравнению с AFLP и SSR (рис. 1).

Таким образом, на основе проведенного нами обзора литературы, можно составить примерный алгоритм выбора молекулярно-генетических маркеров (МГМ) под различные задачи, представленный на рис.

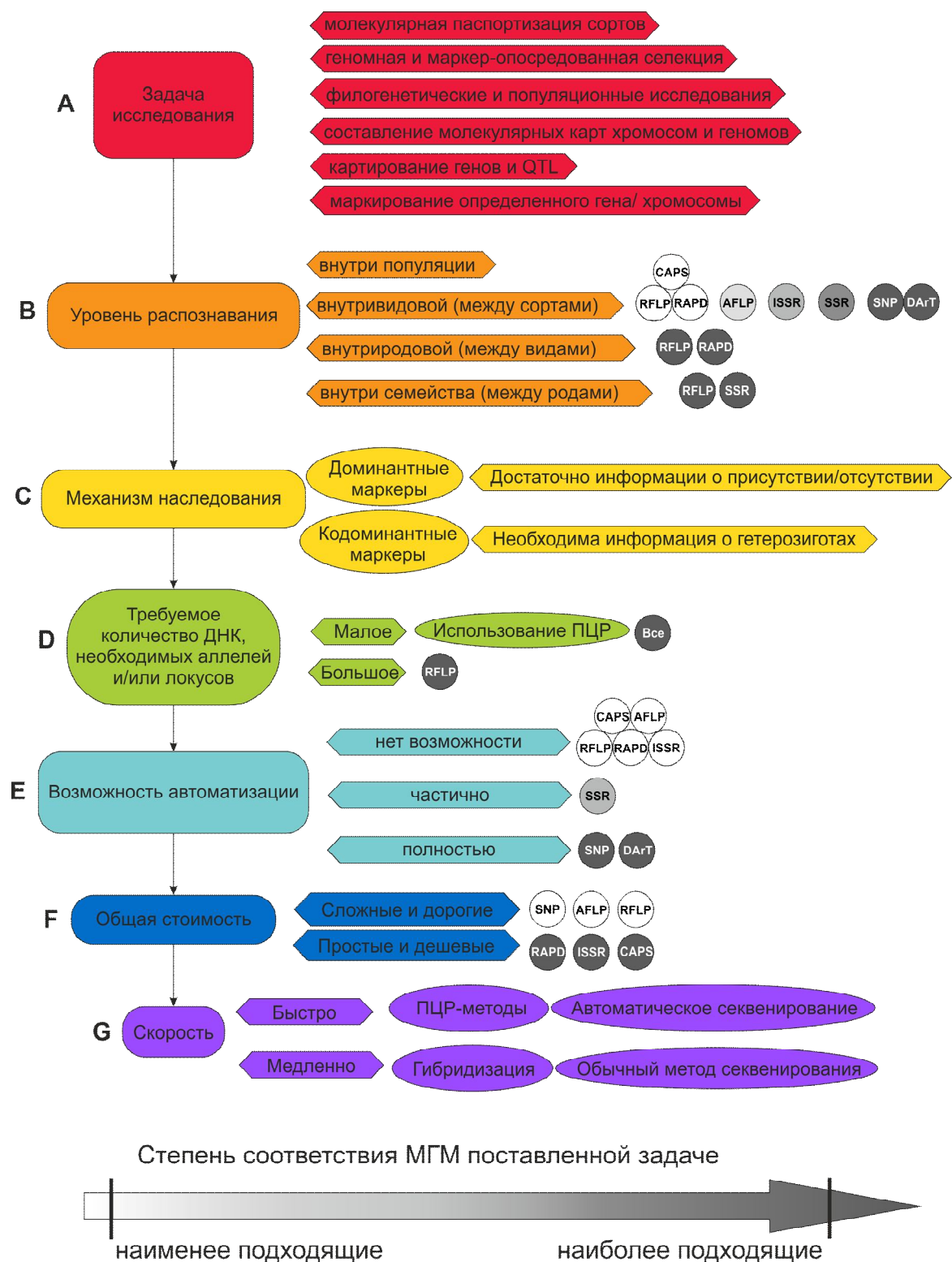


Рис. Алгоритм выбора молекулярно-генетических маркеров (МГМ) для анализа культурных растений.
Fig. Algorithm for the selection of molecular-genetic markers (MGM) for the analysis of cultivated plants.

Заключение

На сегодняшний день на смену маркерам, основанным на изучении полиморфизма белков пришли ДНК-маркеры, которые обладают рядом преимуществ при генетическом анализе сортов культурных растений. Ожидается, что в скором времени все основные стандарты генетической паспортизации сортов в нашей стране также будут переходить на ДНК-маркеры. Для выявления генетического полиморфизма между разными сортами и линиями культурных растений применяют большое количество методов. Наиболее эффективными из рассмотренных нами методов для этих целей могут считаться ISSR, SSR, SNP-анализы (рис. 1). Методы полногеномного секвенирования, которые не рассматривались в данном обзоре, для оценки генетических различий между разными сортами и линиями культурных растений не применяются ввиду дороговизны, сложности эксперимента и интерпретации полученных данных. Можно предполагать, что методы полногеномного секвенирования будут дешеветь и в будущем вполне могут заменить многочисленные технологии выявления ДНК-маркеров. Самыми дешевыми и легковоспроизводимыми методами из перечисленных выше являются ISSR и SSR-анализы, возможно именно поэтому эти методы наиболее часто применяются в России для выявления генетического полиморфизма сортов и линий культурных растений. Однако в ближайшие 10 лет вероятнее всего наибольшее распространение в нашей стране, как и во всем мире, получат методы выявления SNP, которые на сегодняшний день базируются на ДНК-чиповых технологиях, что позволяет проводить автоматизацию анализа.

Интерес к данной тематике вызван проводимыми исследованиями по гранту РФФИ-Поволжье № 17-44-020120 p_a.

Литература / References

1. Азарин К.В., Маркин Н.В., Лотник В.С., Усатов А.В. ДНК маркеры в селекции растений: учеб. пособие. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. 2012. С. 16. [Azarin K.V., Markin N.V., Lotnik B.C., Usatov A.V. DNK markery v selekcii rastenij: ucheb. posobie. Rostov-na-Donu: Publishing house of the Southern Federal University. 2012. P. 16. In Russian].
2. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с. [Baranov V.S. Geneticheskij passport – osnova individual'noj i prediktivnoj mediciny. SPb.: Publishing house N-L, 2009. – 528 p. In Russian].
3. Баташова М.Е., Онищенко М.М., Чекалин Н.М. Идентификация линий озимой пшеницы методом молекулярных маркеров AFLP // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы междунар. науч. конф., 3-6 дек. 2008 г., Минск. Изд. Центр БГУ, 2008. С. 40-43. [Batashova M.E., Onishhenko M.M., Chekalin N.M. Identifikacija linij ozimoy pshenicy metodom molekulyarnyh markerov AFLP // Genetics and biotechnology of the XXI century. Fundamental and applied aspects: materials of the international. sci. conf., 3-6 dek. 2008 g., Minsk. Publishing Center of the BSU, 2008. P. 40-43. In Russian].
4. Вдовиченко Л.Д., Глазко В.И. Генетическая паспортизация сортов пшеницы с использованием ISSR-PCR маркеров // Сельскохозяйственная биология. 2007. №3. С. 33–37. [Vdovichenko L.D., Glazko V.I. Geneticheskaja pasportizacija sortov pshenicy s ispol'zovaniem ISSR-PCR markerov // Agricultural Biology. 2007. №3. P. 33–37. In Russian].
5. Глазко В.И. Генетически детерминированный полиморфизм ферментов у некоторых сортов сои (*Glicine max*) и дикой сои (*Glicine soja*) // Цитология и генетика. 2000. Т. 34. № 2. С. 77–84. [Glazko V.I. Geneticheski determinirovannyj polimorfizm fermentov u nekotoryh sortov soi (*Glicine max*) i dikoj soi (*Glicine soja*) // Cytology and Genetics. 2000. V. 34. No. 2. P. 77–84. In Russian].
6. Глазко В.И., Дубинин А.В., Календарь Р.Н. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров // Цитология и генетика. 1999. Т. 33. № 5. С. 47–52. [Glazko V.I., Dubinin A.V., Kalendar' R.N. Geneticheskie vzaimootnoshenija mezhdu sortami soi, ocenennye s ispol'zovaniem ISSR markerov // Cytology and Genetics. 1999. V. 33. No. 5. P. 47–52. In Russian].
7. Глазко В.И., Глазко Г.В. Толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. 2000. С. 35-36. [Glazko V.I., Glazko G.V. Tolkovyj slovar' po prikladnoj genetike, DNK-tehnologii i bioinformatike. 2000. P.35-36. In Russian].
8. Давидчук Н.Д., Корабельская Е.М., Еремеева Н.В., Кобыльский Г.И. Полиморфизм запасных белков и использование его в семеноводстве пшеницы и ячменя // Вестник Тамбовского Государственного Университета. 2009. Т. 14. С. 116–121. [Davidchuk N.D., Korabel'skaya Ye.M., Yeremeyeva N.V., Kobyl'skiy G.I. Polimorfizm zapasnyh belkov i ispol'zovanie ego v semenovodstve pshenicy i jachmenja // Bulletin of Tambov State University. 2009. V. 14. P. 116–121. In Russian].
9. Дивашук М. П., Крупин П.Ю., Фесенко И.А., Белов В.И., Разумова О.В., Коротаева А.А., Карлов

- Г.И. О возможном применении генов-гомологов *Vp-1* (*Viviparous-1*) пирея в улучшении мягкой пшеницы // Сельскохозяйственная биология. 2011. №5. С. 40-44. Divashuk M. P., Krupin P.YU., Fesenko I.A., Belov V.I., Razumova O.V., Korotayeva A.A., Karlov G.I. O vozmozhnom primeneniі genov-gomologov *Vp-1* (*Viviparous-1*) pyreja v uluchshenii mjagkoj pshenicy // Agricultural Biology. 2011. №5. P. 40–44. In Russian].
10. Кавракова З.Б., Мамадьюсупова М., Косумбекова Ф.А., Насырова Ф.Ю. RAPD- и SSR-анализ внутри- и межвидового полиморфизма видов рода *Aegilops* L., произрастающих в различных природно-климатических зонах Таджикистана // Кишоварз. №3. 2015. С. 16–19. [Kavrakova Z.B., Mamadjusupova M., Kosumbekova F.A., Nasyrova F.Ju. RARD- i SSR analiz vnutri- i mezhvidovogo polimorfizma vidov roda *AEGILOPS* L., proizrastajushhih v razlichnyh prirodno-klimaticheskikh zonah Tadjhikistana // Kishovarz. 2015. No. 3. P. 16 – 19. In Russian].
11. Календарь Р.Н. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма генома ячменя (*Hordeum vulgare*L.) методом полимеразной цепной реакции: дис. канд. биол. наук: 03.00.26. Сиволоп – Одесса, 1996. 105 с. [Kalendar' R.N. Issledovanie molekulyarno-geneticheskogo polimorfizma genoma jachmenja (*Hordeum vulgare* L.) metodom polimeraznoj cepnoj reakcii: Author's abstract. dis. cand. biol. science: 03.00.26. Odessa. 1996. 105 p. In Russian].
12. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений, 2002. Т. 34. №4. 19 с. [Kalendar' R. N., Glazko V. I. Tipy molekulyarno-geneticheskikh markerov i ih primenenie // Physiology and Biochemistry Plants, 2002. V. 34. No. 4. 19 p. In Russian].
13. Калько Г. В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2015. №4. С. 19-34. [Kal'ko G. V. DNK-markery dlja ocenki geneticheskikh resursov eli i sosny // Proceedings of the St. Petersburg Scientific Research Institute of Forestry. 2015. No. 4. P. 19–34. In Russian].
14. Кармен де Висенте М., Фултон Т. Использование технологии молекулярных маркеров в изучении генетического разнообразия растений: учебный модуль / Международный институт генетических ресурсов растений (IPGRI) и Институт разнообразия геномов (IGD) Корнельского Университета. 2003. 372 с. [Karmen de Visente M., Fulton T. Ispol'zovanie tehnologii molekulyarnyh markerov v izuchenii geneticheskogo raznoobrazija rastenij: training module / International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and Institute for Diversity of Genomes (IGD) Cornell University. 2003. 372 p. In Russian].
15. Калюжный С.В. Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов / М.: Физматлит, 2010. – 528 с. [Kaljuzhnyj S.V. Slovar' nanotehnologicheskikh i svjazannyh s nanotehnologijami terminov / M.: Fizmatlit. 2010. 528 p. In Russian]
16. Козлова С.А., Хлесткина Е.К., Салина Е.А. Особенности применения SNP-маркеров, разработанных для аллополиплоидной пшеницы // Генетика. 2009. V. 45. №1. С. 92–96. [Kozlova S.A., Khlestkina E.K., Salina E.A. Specific features in using SNP markers developed for allopolyploid wheat // Russian Journal of Genetics. 2009. T. 45. № 1. С. 81–84.].
17. Кондратенко Е.И. Цитогенетические и молекулярно-биологические методы анализа растений: учебно-методическое пособие – Астрахань: Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет». 2015. С. 51–54. [Kondratenko E.I. Citogeneticheskie i molekulyarno-biologicheskie metody analiza rastenij: educational and methodological manual - Astrakhan: Astrakhan State University, "Astrakhan University" Publishing House. 2015. P. 51–54. In Russian].
18. Малышев С.В., Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Кильчевский А.В. Разработка методов ДНК-типирования генов *rin*, *nor*, и *alc*, используемых для повышения лежкости плодов томата // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы междунар. науч. конф., 3-6 дек. 2008 г., Минск. Изд. Центр БГУ. 2008. С. 126-128. [Malyshev S.V. Razrabotka metodov DNK-tipirovaniya genov *rin*, *nor*, i *alc*, ispol'zuemyh dlja povyshenija lezhkosti plodov tomata / S. V. Malyshev, O. G. Babak, N.A. Nekrashevich, A. V. Kil'chevskij // Genetics and biotechnology of the XXI century. Fundamental and applied aspects: materials of the international. sci. conf., 3-6 dek. 2008. Minsk Publishing Center of the BSU. 2008. P. 126-128. In Russian].
19. Маркин Н.В., Тихобаева В.Е., Тихонова М.А., Гаврилова В.А., Трифонова Т.Т., Усатов А.В. Полиморфизм геномной ДНК однолетних видов подсолнечника // Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2010. Вып. 2. С. 144–145. [Markin N.V., Tihobaeva V.E., Tihonova M.A., Gavrilova V.A., Trifonova T.T., Usatov A.V. Polimorfizm genomnoj DNK odnoletnih vidov podsolnechnika // Scientific and technical bulletin of the All-Russian Research Institute of Oilseeds. 2010. No. 2. P. 144–145. In Russian].
20. Межнина О.А., Урбанович О.Ю. Идентификация сортов земляники садовой (*Fragaria ananassa*) с использованием SSR-маркеров // Молекулярная и прикладная генетика. 2016. Т. 20. С. 37–45. [Mezhnina O.A., Urbanovich O.Ju. Identifikacija sortov zemljaniki

- sadovoj (*Fragaria ananassa*) s ispol'zovaniem SSR-markerov // Molecular and Applied Genetics. 2016. V. 20. P. 37–45. In Russian].
21. Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок // Биотехнология. Теория и практика. 2013. №4. С. 20–28. [Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Rjabushkina N.A. Molekuljarnye markery. Prichiny i posledstviya oshibok // Biotechnology. Theory and practice. 2013. No. 4. P. 20–28. In Russian].
 22. Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З. Анализ микросателлитных локусов хлоропластного генома перца (*Capsicum*) // Генетика. 2004. Т. 40. №8. С. 1093–1098. [Ryzhova N.N., Kochieva E.Z. Analysis of microsatellite loci of the chloroplast genome in the genus *Capsicum* (pepper) // Russian Journal of Genetics. 2004. V. 40. No. 8. P. 892–896].
 23. Сатарова Т.М., Борисова В.В. Паспорти ліній кукурудзи за молекулярно-біологічними показниками (SNP-паспорти) // Електронна база даних. Дніпропетровськ. 2013. [Satarova T.M., Borisova V.V. Pasporti linij kukurudzi za molekularno-biologichnimi pokaznikami (SNP-pasporti) // Electronic database. Dnipropetrovsk. 2013. In Ukrainian].
 24. Сатарова Т.Н., Дзюбецкий Б.В., Черчель В.Ю., Борисова В.В., Таганцова М.Н. SNP-анализ в паспортизации и идентификации линий кукурузы // Сортовивчення та охорона правна сорти рослин : наук.-практ. журн. 2014. № 3 (24). С. 4–9. [Satarova T. M., Dziubetskyi B. V., Charchel V. Yu., Borysova V. V., Tagantsova M. M.. SNP-analiz v pasportizacii i identifikacii linij kukuruzy // Plant Varieties Studying and Protection : journal of applied research. 2014. No. 3 (24). P. 4–9. In Ukrainian].
 25. Семашко Т.В. Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений / под общ. ред. Т. В. Семашко. Минск, 2011. 36 с. [Semashko T.V. Gosudarstvennaja inspekcija po ispytaniyu i ohrane sortov rastenij / under the general. ed. T. V. Semashko. Minsk, 2011. 36 p. In Russian].
 26. Смирнова Е.В. Белковые маркеры сортов и гибридов огурца и перспективы их использования в селекции и семеноводстве: дис. канд. с.-х. наук: 06.01.05. Санкт-Петербург, 2000. 84 с. [Smirnova E. V. Belkovye markery sortov i gibridov ogurca i perspektivy ih ispol'zovaniya v selekcii i semenovodstve: dis.....cand. agricultural-economic science: 06.01.05. St. Petersburg. 2000. 84 p. In Russian].
 27. Сулимова Г.Е. Генотипирование локуса каппа-казеина у крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции // Генетика. 1991. Т. 27. № 12. С. 2053–2062. [Sulimova G.E. Genotipirovanie lokusa kappa-kazeina u krupnogo rogatogo skota s pomoshh'ju polimeraznoj cepnoj reakcii // Genetics. 1991. V. 27. No. 12. P. 2053–2062. In Russian].
 28. Урбанович О.Ю. Оценка генетического разнообразия генофонда плодовых культур и разработка методов ДНК-идентификации и генотипирования сортов и видов: Автореф. дис.....канд. биол. наук: 03.01.07. Минск. 2015. 47 с. [Urbanovich O.Ju. Ocenka geneticheskogo raznoobrazija genofonda plodovyh kul'tur i razrabotka metodov DNK-identifikacii i genotipirovanija sortov i vidov: Author's abstract. dis. cand. biol. science: 03.01.07. Minsk. 2015. 47 p. In Russian].
 29. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. №4/2. С. 1044–1054. [Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2014. T. 4. No. 3. P. 236–244. doi: 10.1134/S2079059714030022].
 30. Шавруков Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. №2. С. 205–213. [Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2016. V. 6. No. 3. P. 279–287. doi: 10.1134/S2079059716030114].
 31. Шаптуренко М.Н., Тарутина, Л.А., Печковская, Т.В., Мишин Л.А., Хотылева, Л.В. Использование RAPD-маркеров для оптимизации отбора исходного материала перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) в селекции на гетерозис // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. №1. С. 63–71. [Shapturenko M.N., Tarutina, L.A., Pechkovskaja, T.V., Mishin L.A., Hotyleva, L.V. Ispol'zovanie RAPD-markerov dlja optimizacii otbora ishodnogo materiala perca sladkogo (*Capsicum annuum* L.) v selekcii na geterozis // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013. V. 17. №1. P. 63–71. In Russian].
 32. Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmensiek A., Kuchel H., Hayden MJ., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Kilian A. Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome // Theoretical and Applied Genetics, 2006. V. 113. № 8. P. 1409–1420. doi: 10.1007/s00122-006-0365-4
 33. Breyne P., Boerjan W., Gerats T., Van Montagu M., Van Gysel A. Applications of AFLP in plant breeding, molecular biology and genetics // Belg. Journ. Bot. 1997. V. 129. No. 2. P. 107–117.
 34. Cai C., Zhu G., Zhang T., Guo W. High-density 80K SNP array is a powerful tool for genotyping *G. hirsutum* accessions and genome analysis // BMC Genomics. 2017. V. 18. P. 654. doi: 10.1186/s12864-017-4062-2.
 35. Charmet G., Storlie E. Implementation of genome-wide selection in wheat // Russian Journal of Genetics:

- Applied Research. 2012. V. 2. No. 4. P. 298–303. doi: 10.1134/S207905971204003X
36. Datwyler S.L., Weiblen G.D. Genetic variation in hemp and marijuana (*Cannabis sativa* L.) according to amplified fragment length polymorphisms // J Forensic Sci. 2006. V. 51. P. 371–375. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00061.x
 37. Devos K.M., Gale M.D. Extended genetic maps of homoeologous group 3 chromosomes of wheat, rye and barley // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 649–552.
 38. Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Gale M.D. Application of 2 microsatellite sequences in wheat orange proteins as molecular markers // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 247–252.
 39. Dohmen G., Hesserberg H., Geiger H.H., Tudzynski I. CMS in tye - comparative RFLP and transcript analyses of mitochondria from fertile and male-sterile plants. // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 89. P. 1014–1018.
 40. Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J., Morgounov A., Snape J. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 1174–1179.
 41. Heubl G. DNA-based authentication of TCM-plants: current progress and future perspectives. Evidence and National Based Research on Chinese Drugs. Eds H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich. Vienna: Springer Vienna. 2013.
 42. Idrees M., Irshad M. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review // European Academic Research. 2014. V. 2. P. 1513–1540.
 43. Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping // Nucleic Acids Research. 2001. V. 29. No. 4. E25.
 44. Jing H.C., Bayon C., Kanyuka K., Berry S., Wenzl P., Huttner E., Kilian A., Hammond-Kosack K.E. DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum* // BMC Genomics. 2009. V. 10. P. 458.
 45. Joy N., Abraham Z., Soniya E.V. A preliminary assessment of genetic relationships among agronomically important cultivars of black pepper // BMC Genet. 2007. V. 8. P. 42.
 46. Korzun V. Use of molecular markers in cereal breeding // Cellular and Molecular Biology Letters. 2002. V. 7. P. 811–820.
 47. Kostova A., Todorovska E., Christov N., Hristov K., Atanassov A. Assessment of genetic variability induced by chemical mutagenesis in elite maize germplasm via SSR markers // J. Crop Improv. 2006. V. 16. P. 37–48. doi: 10.1300/J411v16n01_03
 48. Lobo M., Bassett M.J., Hannah L.C. Inheritance and characterization of the fruit ripening mutation in 'Alcobaca' tomato // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1984. V. 109. P. 741–745.
 49. Lu X.P., Xiao B.G., Li Y.P., Gui Y.J., Wang Y., Fan L.J. Diversity arrays technology (DArT) for studying the genetic polymorphism of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum*) // Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 2013a. V. 14. No. 7. P. 570–577. doi: 10.1631/jzus.B1200227
 50. Lu X.P., Gui Y.J., Xiao B.G., Li Y., Tong Z.J., Liu Y., Bai X.F., Wu W.R., Xia L., Huttner E. Development of DArT markers for linkage map of flue-cured tobacco // Chin Sci Bull. 2013b. V. 58. No. 6. P. 641–648. doi: 10.1007/s11434-012-5453-z
 51. Matos M., Pinto-Carnide O., Benito C. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers // Hereditas. 2001. V. 134. P. 229–236. doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00229.x
 52. Mueller U.G., Wolfenbarger L.R. AFLP genotyping and fingerprinting // Tree. 1999. V. 14. No. 10. P. 389–394.
 53. Meuwissen T.H.E., Hayes B.J., Goddard M.E. Prediction of total genetic value using genome – wide dense marker maps // Genetics. 2001. V. 157. P. 1819–1829.
 54. Mustchler M.A. Inheritance and linkage of the 'Alcobaca' ripening mutant in tomato // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1984. V. 109. P. 500–503.
 55. Olivera P.D., Kilian A., Wenzl P., Steffenson B.J. Development of a genetic linkage map for Sharon goatgrass (*Aegilops sharonensis*) and mapping of a leaf rust resistance gene // Genome. 2013. V. 56. No. 7. P. 367–376.
 56. Ps S., Sv A.M., Prakash C., Mk R., Tiwari R., Mohapatra T., Singh N.K. High resolution mapping of QTLs for heat tolerance in rice using a 5K SNP Array // Rice (N Y). 2017. V. 10. P. 28. doi: 10.1186/s12284-017-0167-0
 57. Rayapati P.J., Gregory J.W., Lee N. A linkage map of diploid avena based on RFLP loci and a locus conferring resistance to 9 isolates of *Puccinia coronata* var. *Avenae* // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 89. P. 831–837.
 58. Sassanfar M., Walker G. DNA Microarray Technology. What is it and how is it useful? Complement to a lecture given by Eric Lander / Department of Biology Massachusetts Institute of Technology Cambridge, MA. 2003. P. 14.
 59. Savelkoul P.H.M., Aarts H.J.M., DeHass J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J. A. Minireview, Amplified-fragment length polymorphism analysis: The state of an art // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 37. P. 3083–3091.
 60. Semagn K., Bjornstad A., Skinnes H., Maroy A.G., Tarkegne Y., William M. Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population // Genome. 2006. V. 46. No. 5. P. 545–555.

61. Solodenko A. Sivolap Yu. Genotyping of *Helianthus* based on microsatellite sequences // *Helia*. 2005. V. 28. No. 42. P. 19–26.
62. Song Y.C., Gustafson J.P. The physical location of 14 RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.). // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 113–119.
63. Song K., Slocum M.K., Osborn T. Molecular marker analysis of genes-controlling morphological variation in *Brassica rapa* (Syn. *Campestris*). // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 1–10.
64. Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinbholz A., Kilian A. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. V. 101. No. 26. P. 9915–9920.
65. Wiesner I., Wiesnerova D. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns // *Cell. and Mol. Biol. Letters*. 2003. No. 8. P. 743–748.
66. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6531–6535.
67. Zhao J., Wang X., Deng B., Lou P., Wu J., Sun R., Xu Z., Vromans J., Koornneef M., Bonnema G. Genetic relationships within *Brassica rapa* as inferred from AFLP fingerprints // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 110. P. 1301–1314.
68. Zhu Y., Hu J., Han R., Wang Y., Zhu S. Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers // *Australian Journal of Crop Science*. 2011. V. 5 No. 7. P. 846–850.