

ПАСПОРТИЗАЦИЯ НОВЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА СЕЛЕКЦИИ ВНИИМК С ПОМОЩЬЮ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

С.З. Гучетль,
кандидат биологических наук
Т.А. Челюстникова,
старший научный сотрудник
Т.С. Антонова,
доктор биологических наук

ФГБНУ ВНИИМК
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
E-mail: saida.guchetl@mail.ru

Для цитирования: Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Паспортизация новых линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК с помощью биохимических и молекулярных маркеров // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – Вып. 3 (163). – С. 31–37.

Ключевые слова: подсолнечник, паспортизация, SSR-маркеры, изоферментные локусы.

Паспортизация новых перспективных линий и гибридов подсолнечника по изоферментным маркерам и молекулярным микросателлитным локусам ДНК является важным инструментом для защиты прав селекционеров. Целью данной работы была паспортизация 12 линий и четырех гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК. Для характеристики селекционного материала использовали методы анализа изоферментов и полимеразной цепной реакции амплификации ДНК. С использованием пяти изоферментных и восьми SSR-локусов были составлены биохимические и молекулярно-генетические паспорта. По сравнению с группами линий ВНИИМК, изученными в предыдущие годы, уникальность набора новых линий, выявляемая методом анализа вариабельности изоферментных систем, стала меньше. Анализ биохимических характеристик 12 линий показал, что они группируются в восемь групп, отличающихся друг от друга. Гибридные комбинации обладали уникальными изоферментными спектрами. Уникальность линий и гибридов, полученная при помощи анализа изоферментных систем, составила 75 %. При анализе SSR-локусов выявлена индивидуальность аллельного состава каждой линии

и гибрида, за исключением линий VK1-ими А и VK1-ими Б, которые являются стерильным и фертильным аналогами. Уникальность линий и гибридов, полученная при помощи микросателлитных локусов, составила 93 %. Установлено, что полиморфными и информативными для данной группы образцов являются четыре изоферментные системы: эстераза, малатдегидрогеназа, 6-фосфо-глюконатдегидрогеназа, глюкозофосфатизомераза, и пять микросателлитных локусов: ORS509, ORS 595, ORS1144, ORS1796, ORS 1036. Среднее число аллелей на локус для них составило 2.

UDC 631.523:633.854.78

Certification of new sunflower lines and hybrids of VNIIMK breeding by means of biochemical and molecular markers.

Guchetl S.Z., candidate of biology
Tchelustnikova T.A., senior researcher
Antonova T.S., doctor of biology

ФГБНУ ВНИИМК
17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia
E-mail: saida.guchetl@mail.ru

Key words: sunflower, identification, SSR-markers, isozymes loci.

Certification of new promising sunflower lines and hybrids on isozyme markers and molecular microsatellite loci is an important method of breeders' rights protection. The purpose of this work was to certify 12 lines and four hybrids of sunflower of VNIIMK breeding. To characterize the breeding material there were used methods of isozyme analysis and polymerase chain reaction of DNA amplification. Using five isozyme and eight SSR-loci, biochemical and molecular-genetic passports were done. A set of the new lines revealed by analysis of variability of the isozyme systems became a less unique in comparison to sunflower lines of VNIIMK breeding studied in previous years. An analysis of biochemical characteristics of 12 lines showed that they can be united into eight groups differed from one another. The hybrid combinations possessed unique isozyme spectra. Singularity of the lines and hybrids showed by analysis of isozyme systems was 75%. At analyzing of SSR-loci an individuality of allele set for each line and hybrid was determined, except lines VK1-imi A and VK1-imi B being the sterile and fertile analogs. A singularity of the lines and hybrids obtained by means of microsatellite loci was 93%. The polymorphic and informative systems for this group of samples are determined to be four isozyme systems: esterase, malatdehydrogenase, 6-phosphorus-gluconatdehydrogenase, glucosephosphatisomerase, and five microsatellite loci: ORS509, ORS 595, ORS1144, ORS1796, and ORS 1036. An average number of alleles for locus for them were 2.

Введение. Паспортизация и идентификация линий, гибридов и сортов сельскохозяйственных культур с помощью биохимических и молекулярных маркеров широко применяется в селекционной практике. Для этих целей в качестве генетических маркеров используются и морфологические признаки. Однако количество информативных маркеров такого типа ограничено. К тому же фенотипические признаки могут иметь сложный характер наследования и часто зависят от условий внешней среды.

Биохимические и молекулярные маркеры не зависят от условий окружающей среды, являются многочисленными, в большинстве своем кодоминантно наследуются и их анализ осуществляется в лабораторных условиях в краткие сроки. С помощью биохимических и молекулярных маркеров в нашей стране и за рубежом производится генетическая паспортизация таких культур, как пшеница [1; 2], соя [3], яблоня [4], рис [5], виноград [6], подсолнечник [7; 8; 9]. Так, во Франции с использованием пяти SSR-маркеров (simple sequence repeat) паспортизировано 286 сортов картофеля с созданием базы данных, заключающей в себе аллельный состав каждого сорта [10]. Семьдесят восемь SSR-маркеров были отобраны и использованы для оценки генетической изменчивости среди набора 124 инбредных линий подсолнечника [11]. Согласно исследованиям Imerovski с соавторами, ДНК-локусы, ассоциированные с селекционно-ценными признаками, также являются эффективными для идентификации генотипов подсолнечника [8].

Паспортизация образцов, линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК при помощи изоферментных систем, RAPD и SSR-производных амплифицированных фрагментов ДНК проводится с середины 90-х годов прошлого века [12; 13; 14; 15].

Целью данной работы была характеристика районированных и перспективных линий и гибридов подсолнечника селек-

ции ВНИИМК по биохимическим – изоферментным маркерам и молекулярным – микросателлитным локусам ДНК.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 12 линий и четыре гибрида коллекции подсолнечника ВНИИМК (табл. 1, 2). Для определения однородности генотипов отбирали по 3–5 индивидуальных растений каждого образца.

Изоферменты экстрагировали гомогенизацией части семядоли сухой семянки в 20 мкл 0,1 М трис-НСl буфера с добавлением 0,1 %-ного поливинилпирролидона. Электрофорез выполняли в 12 %-ном крахмальном геле с добавлением 2 % сахарозы. Для электрофоретического разделения изоферментов использовали две буферные системы, составленные по методикам, предложенным Cardy et al. [16]. После электрофореза гелевая пластина разрезалась тонкой нихромовой нитью на 5–6 срезов. Выявление зон энзиматической активности проводилось окрашиванием по стандартным прописям Vallejos [17]. Исследовали пять изоферментных систем, описанных ранее в работе Туркав с соавторами [15].

Для проведения ПЦР (полимеразной цепной реакции амплификации) геномную ДНК выделяли из семядольных листьев 5–7-дневных этиолированных проростков подсолнечника с помощью модифицированного метода Saghai-Maroof et al. [18] с использованием СТАВ буфера. Для проведения ПЦР использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Москва). Для амплификации применяли термоциклер S1000™ (BioRad, США). Условия амплификации: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин; затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 60 °С в течение 40 с,

элонгация – 1 мин при 70 °С, денатурация при 94 °С – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Использовали восемь SSR-локусов, наследование которых было установлено исследованиями Челюстниковой [14], Гучетль с соавторами [13] и Antonova с соавторами [19].

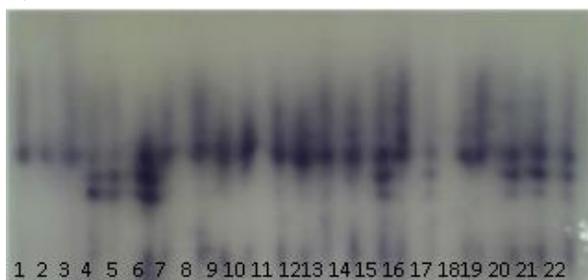
Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1 х ТАЕ-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE.2, ДНК-технология, Россия) в течение 1–1,5 часов при силе тока 58 mA и напряжении 90–100 V. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация результатов электрофореза в ультрафиолетовом свете и их документирование обеспечивались при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Результаты и обсуждение. По результатам предыдущих работ для характеристики линий и гибридов по биохимическим маркерам были выбраны полиморфные изоферментные системы с примерно равной частотой встречаемости аллозимных вариантов [12; 15]. Это эстераза (EST), малатдегидрогеназа (MDH), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6PGD), глюкозофосфатизомераза (GPI), глутаматдегидрогеназа (GDH). На рисунке 1 представлены энзиматические электрофоретические спектры некоторых изученных образцов.

А.



Б.



В.



Рисунок 1 – Электрофоретические спектры изоферментных систем подсолнечника:

А – глюкозофосфатизомераза (GPI);

Б – малатдегидрогеназа (MDH);

В – эстераза (EST).

Расположение на дорожках: 1–3 – ВК 302, 4–6 – ВК 101, 7–9 – RG, 10–12 – Р 96, 13–14 – ВК 551(К), 15–19 – Арсенал, 20–22 – Фактор

Изоферментные спектры контролируются локусами с 2–3 аллелями, которые обозначены как: SS – контролирующей аллозим с наиболее медленной электрофоретической подвижностью, FF – аллозим с быстрой электрофоретической подвижностью, vFvF – аллозим с наибольшей электрофоретической подвижностью. Обычно гомозиготные генотипы представлены на фореграммах одной фракцией. Исключение составляют образцы подсолнечника с генотипом Mdh – SS, представленные тремя фракциями. Гетерозиготные генотипы, в зависимости от четвертичной структуры фермента, представлены 2–5 фракциями.

Образец считали однородным, если все проанализированные семечки имели идентичный генотип. В случае если образец был неоднородным, то за типичный генотип принимали преобладающий. По всем инбредным линиям и гибридам были составлены изоферментные паспорта (табл. 1, 2).

Количество аллелей для различных локусов варьировало от 1 до 2. Среднее число аллелей на локус составило 1,6 (с учетом мономорфных локусов) и 2 (без учета мономорфных локусов). Анализ биохимических характеристик 12 линий показал, что они группируются в восемь

групп, отличающихся друг от друга (табл. 1).

Таблица 1

Изоферментные фенотипы 12 инбредных линий подсолнечника

ВНИИМК, г. Краснодар, 2015 г.

Линия	Изоферментный фенотип				
	EST	MDH	GPI	PGD	GDH
ВК 1ими А	FF	SS	FF	SS	SS
ВК 1ими Б	FF	SS	FF	SS	SS
ВК 22 ими	FF	SS	FF	SS	SS
ВК 301	FF	SS	FF	FF	SS
ВК 930	FF	SS	FF	FF	SS
ВА 760	vFvF	FF	SS	FF	SS
Р 96	FF	FF	SS	FF	SS
ВК 302	FF	FF	FF	FF	SS
ВК 101	SS	SS	SS	FF	SS
RG	SS	FF	FF	FF	SS
ВК 876	SS	SS	FF	SS	SS
ВК 195	SS	SS	FF	SS	SS

Таким образом, в некоторые группы попало несколько линий, имеющих сходный генотип по составу изоферментов. Уникальность анализируемой коллекции линий составила 67 %. Столь низкий процент уникальности вызван отчасти тем, что линии ВК 1 ими А и ВК 1 ими Б являются стерильным и фертильным аналогами соответственно, и должны совпадать по всем остальным признакам.

Линии ВК 876 и ВК 195 также обладают сходным спектром изоферментов. Тем не менее, необходимо признать, что по сравнению с группами других линий ВНИИМК, изученных нами в предыдущие годы также методом анализа вариабельности изоферментных систем, процент уникальности новых линий становится меньше. Так, уникальность анализируемых по изоферментным локусам 18 селекционных инбредных линий подсолнечника коллекции ВНИИМК в 1996 г. составила 78 % [15]. Уникальность 32 линий подсолнечника из той же коллекции, анализированной в 2004 г., составила 75 % [12]. Кроме того, некоторые изоферментные локусы, ранее характеризовавшиеся наличием нескольких аллелей, при изучении новых линий показывают только одно аллельное состояние. В более ранних исследованиях Туркав с соавторами [15] и Гучетль с соавторами

[12] паспортизация селекционного материала выполнялась по полиморфным системам, в состав которых входили эстераза, малатдегидрогеназа, 6-фосфоглюко-натдегидрогеназа, глюкозо-фосфатизомераза, глутаматдегидрогеназа. У изученно-го в 2015 г. набора линий, полиморфизм по глутаматдегидрогеназе выявлен не был. Уменьшение полиморфизма селекционного материала могло произойти либо из-за происхождения инбредных линий из одного или небольшого числа источников, либо из-за различной адаптивной ценности аллельных вариантов, приводящей к преобладанию в коллекции одного из аллелей.

Четыре исследованных гибрида имели отличающиеся изоферментные спектры (табл. 2). Совокупный процент уникальности анализированных линий и гибридов составил 75.

Таблица 2

Изоферментные фенотипы четырех гибридов подсолнечника

ВНИИМК, г. Краснодар, 2015 г.

Гибрид	Изоферментный фенотип				
	EST	MDH	GPI	PGD	GDH
Имидж	FF	SS	FF	SS	SS
Арсенал	FvF	FS	FS	FF	SS
Фактор	FS	FS	FS	FF	SS
Окси	SS	SS	FF	SS	SS

Гибриды Фактор и Арсенал гетерозиготны по трем изоферментным локусам – *Est*, *Mdh*, *Gpi*. В силу того, что родительские линии гибридов Имидж (ВК 1 ими и ВК 22 ими) и Окси (ВК 876 и ВК 195) имели идентичные фенотипы, у этих гибридов нет изоферментных локусов в гетерозиготном состоянии. Следовательно, определение уровня гибридности по изоферментным локусам невозможно. Но возможно определение генетической чистоты гибрида, поскольку для этого используются и гомозиготные гены, т.к. при биологическом и механическом засорении гибрида может изменяться спектр любого изофермента.

Изоферментные маркеры в условиях отсутствия роботизированной техники для проведения ПЦР остаются востребованными в силу быстроты их определе-

ния для паспортизации и для определения генетической чистоты коммерческих партий линий и гибридов подсолнечника. Но достичь с помощью только изоферментных маркеров 100 %-ной отличимости линий и гибридов не представляется возможным. Необходимо использование ПЦР-производных молекулярно-генетических маркеров и оптимизация их количества. В предыдущих работах было идентифицировано 17 инбредных линий коллекции ВНИИМК при помощи 10 SSR-локусов. Использование данных локусов позволило отличить генотипы друг от друга в 100 % случаев [19]. Использование трёх SSR и трёх SCAR-локусов для генотипирования коллекции 32 отечественных селекционных образцов подсолнечника позволило идентифицировать образцы лишь в 59 % случаев [13].

В результате анализа одиннадцати линий и четырех гибридов подсолнечника по восьми SSR-локусам были получены специфические и хорошо воспроизводимые фрагменты ДНК. Для каждого образца определены индивидуальные SSR-спектры, различающиеся числом ампликонов и их размерами на электрофореграммах (рис. 2).

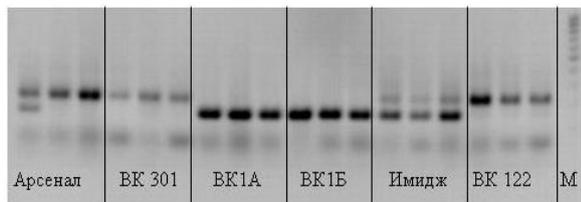


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК у линий и гибридов подсолнечника по локусу ORS 1796.

М – маркер молекулярного веса 100 пн

Количество аллелей для различных локусов варьировало от 1 до 2. Среднее число аллелей на локус составило 1,6 (с учетом мономорфных локусов) и 2 (без учета мономорфных локусов). Эти показатели совпадают с полученными ранее для других линий и гибридов подсолнечника [14; 19]. Три локуса не показали полиморфизма: IUB-6, ORS 553, RTS29. Остальные пять локусов показали по два аллельных состояния (табл. 3, 4).

Для обозначения аллельных вариантов использовали количество пар нуклеотидных оснований (пн) фрагмента ДНК. Гетерозиготные спектры, т.е. спектры, в которых присутствовали фракции двух разных аллелей, в таблицах обозначены двумя числами, разделенными косой чертой (/). При анализе электрофоретических спектров линий выявлена индивидуальность аллельного состава каждой из них, за исключением линий ВК 1 А ими и ВК 1 Б ими, которые, как было отмечено выше, являются стерильным и фертильным аналогами (табл. 3). Процент уникальности анализируемой группы линий составил 91.

Таблица 3

Аллельные состояния микросателлитных локусов 11 линий подсолнечника

Генотип	SSR-локус							
	ORS 509	ORS 595	IUB-6	ORS 1144	ORS 1796	ORS 553	RTS 29	ORS 1036
ВК 302	195*	100	350	177	157	135	320	245
ВК 101	220	127	350	136	157	135	320	245
ВК 876	195	127	350	136	157	135	320	245
ВК 195	195	127	350	177	157	135	320	245
Р 96	220	127	350	177	157	135	320	245
ВК 930	220	127	350	177	232	135	320	255
RG 8	220	127	350	136	232	135	320	255
ВК 301	220	127	350	177	232	135	320	245
ВК 1 А ими	220	127	350	136	157	135	320	245
ВК 1 Б ими	220	127	350	136	157	135	320	245
ВК 22	195	127	350	177	232	135	330	255

* – количество пар нуклеотидных оснований (пн) аллеля SSR-локуса

Четыре исследованных гибрида имели отличающиеся по аллельному составу микросателлитных локусов генотипы (табл. 4).

Таблица 4

Аллельные состояния микросателлитных локусов четырех гибридов подсолнечника

Генотип	SSR-локус							
	ORS 509	ORS 595	IUB-6	ORS 1144	ORS 1796	ORS 553	RTS 29	ORS 1036
Фактор	195**/220	100*	350	136/177	157	135	320	245
Окси	195	127	350	136/177	157	135	320	245
Арсенал	220	127	350	136/177	232	135	320	245
Имидж	195/220	127	350	136/177	157/232	135	320/330	245/255

* – количество пар нуклеотидных оснований (пн) аллеля гомозиготного SSR-локуса
 ** – количество пар нуклеотидных оснований (пн) аллелей SSR гетерозиготного локуса

Для гибрида Фактор характерно гетерозиготное состояние локусов ORS 509 и ORS 1144. Хотя родительские формы гибрида Фактор (линии ВК 101 и ВК 302) обладали отличающимися аллельными вариантами по локусу ORS 595, но в силу доминирования аллеля 100 пн у линии ВК 302 гибрид имеет по данному локусу лишь одно аллельное состояние – 100 пн. Гибриды Окси и Арсенал гетерозиготны по локусу ORS 1144. Гибрид Имидж обладал наибольшим количеством локусов в гетерозиготном состоянии: ORS 509, ORS 1144, ORS 1796, RTS 29 и ORS 1036. Для гибридов Имидж и Окси, у которых не было изоферментных локусов в гетерозиготном состоянии, выявлены SSR-локусы, по которым возможно определение уровня гибридности. Совокупный процент уникальности анализированных линий и гибридов составил 93.

Таким образом, с использованием пяти изоферментных и восьми SSR-локусов были составлены биохимические и молекулярно-генетические паспорта и установлена уникальность каждой инбредной линии (за исключением линий-аналогов) и гибридной комбинации. Процент уникальности линий, выявленный при помощи анализа изоферментных систем, составил 67, а при помощи микросателлитных локусов – 91. Совокупный процент уникальности линий и гибридов, выявленный при помощи анализа изоферментных систем, составил 75, при помощи микросателлитных локусов – 93. Установлено, что полиморфными и информативными для данной группы образцов являются четыре изоферментные системы: эстераза, малатдегидрогеназа, б-фосфоглюконатдегидрогеназа, глюкозофосфатизомераза и пять микросателлитных локусов: ORS509, ORS 595, ORS1144, ORS1796, ORS 1036.

Список литературы

1. Вдовиченко Л.Д., Глазко В.И. Генетическая паспортизация сортов пшеницы с использованием ISSR-PCR маркеров // Сельскохозяйственная биология. – 2007. – № 3. – С. 33–37.
2. Бобошина И.В., Боронникова С.В. Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросател-

литного анализа полиморфизма ДНК // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6. – С. 92–97.

3. Рамазанова С.А. Идентификация генотипов сои разного происхождения с использованием полиморфизма девяти микросателлитных локусов ДНК // Сб. статей 2-й междунар. конф. по сое: Современные проблемы селекции и технологии возделывания сои, Краснодар, 9–10 сентября. – 2008. – С. 129–136.

4. Сунрун И.И., Токмаков С.В., Малюченко О.П., Ушакова Я.В., Бабаков А.В. Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 6. – С. 162–166.

5. Гончарова Ю.К., Иванов А.Н., Князева К.В., Глазко В.И. Эстеразные спектры и адаптивная пластичность сортов риса // Доклады российской академии сельскохозяйственных наук. – 2007. – № 1. – С. 3–4.

6. Cabezas J.A., Ibáñez J., Lijavetzky D., Vélez D., Bravo G., Rodríguez V. [et al.]. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification // Plant Biology. – 2011. – № 11. – P. 153.

7. Саналатий А.В., Солоденко А.Е., Сиволан Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции при помощи SSRP-анализа // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40. – № 4. – С. 31–37.

8. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic D., Jovic S., Miklic V. Molecular profiles of sunflower lines resistant to broomrape (*Orobanche crotanensis* Wallr.) // International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower. Chisinau, Republic of Moldova. August 25–27. – 2011. – P. 25.

9. Усатов А.В., Маркин Н.В., Горбаченко Ф.И., Федорова М.А., Тихобаева В.Е., Горбаченко О.Ф., Азарин К.В. SSR-анализ геномной ДНК ЦМС-линий подсолнечника // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2011. – № 1 (146–147). – С. 15–20.

10. Moisan-Thiery M., Marhadour S., Kerlan M. C., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T., Hingrat Y. Le. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR) // Potato Research. – 2005. – Vol. 48. – Is 3–4. – P.191–200.

11. Zhang L. S., Le Clerc V., Li S., Zhang D. Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment // Canadian Journal of Botany. – 2005. – 83 (1). – P. 66–72.

12. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Рамазанова С.А., Антонова Т.С. Молекулярно-генетическая характеристика инбредных линий подсолнечника по изоферментным маркерам и ДНК профилям // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2004. – Вып. 2 (131). – С. 42–46.

13. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Арасланова Н.М., Антонова Т.С. SSR и SCAR генотипирование коллекции отечественных селекционных образцов подсолнечника, устойчивых и восприимчивых к расе E *Orobanche crotanensis* Wallr. // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2012. – Вып. № 1 (150). – С. 20–26.

14. Челюстникова Т.А. Полиморфизм микросателлитных локусов в генотипах культурного и дикорастущего подсолнечника // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК – 2008. – Вып. 2 (139). – С. 19–23.

15. Туркав С.З., Лоскутов А.В., Губенко Т.П. Оценка генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника с помощью изоферментных маркеров // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 1996. – Вып. 117. – С. 33–37.

16. Cardy B.S., Stuber C.W., Goodman M.M. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes for maize (*Zea mays* L.) // Institute of Statist. Mineograph. Series, 1317, North Carolina State Univ. – 1981. – 154 с.

17. Vallejos C.E. Enzyme activity staining // Isozymes in plant genetics and breeding: Part A. – Amsterdam: Elsevier. – 1983. – P. 469–516.

18. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // Proc. NAS USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 8014–8018.

19. Antonova T.S., Guchetl' S.Z., Tchelustnikova T.A., Ramazanov S.A. Development of marker system for identification and certification of sunflower lines and hybrids on the basis of SSR-analysis // Helia. – 2006. – Vol. 29. – № 45. – P. 63–72.

References

1. Vdovichenko L.D., Glazko V.I. Geneticheskaya passportizatsiya sortov pshenitsy s ispol'zovaniem ISSR-PCR markerov // Sel'skokochozyaistvennaya biologiya. – 2007. – № 3. – S. 33–37.

2. Boboshina I.V., Boronnikova S.V. Identifikatsiya perspektivnykh dlya Urala sortov pshenitsy myagkoy s ispol'zovaniem mejmikrosatellitnogo analiza polimorfizma DNK // Fundamental'nye issledovaniya. – 2013. – № 6. – S. 92–97.

3. Ramazanov S.A. Identifikatsiya genotipov soi raznogo proishozhdeniya s ispol'zovaniem polimorfizma devyati mikrosatellitnykh lokusov DNK // Sovremennye problemy selektsii i tehnologii vozdelivaniya soi. Sb. stateji 2-y megdunarodnoy konferentsii po soye, Krasnodar, 9–10 sentyabrja 2008 g. – S. 129–136.

4. Suprun I.I., Tokmakov S.V., Malyuchenko O.P., Ushakova Ya.V., Babakov A.V. Genotipirovanie sortov yabloni rossiyskoy selektsii s ispol'zovaniem mikrosatellitnykh markerov // Izvestiya TSHA. – 2011. – Vyp. 6. – S. 162–166.

5. Goncharova Yu.K., Ivanov A.N., Knyazeva K.V., Glazko V.I. Esteraznye spektry i adaptivnaya plastichnost' sortov risa // Doklady rossiyskoy akademii sel'skokochozyaystvennykh nauk. – 2007. – № 1. – S. 3–4.

6. Cabezas J.A., Ibañez J., Lijavetzky D., Vélez D., Bravo G., Rodríguez V. [et al.]. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification // Plant Biology. – 2011. – No 11. – P. 153.

7. Sanalaty A.V., Solodenko A.E., Sivolap Yu.M. Identifikatsiya genotipov podsolnechnika ukrainskoy

selektsii pri pomoschi SSRP-analiza // Tsitologiya i genetika. – 2006. – T. 40. – № 4. – S. 31–37.

8. Imerovski I., Dimitrijevic A., Miladinovic D., Dedic D., Jovic S., Miklic V. Molecular profiles of sunflower lines resistant to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // Intern. Symp. on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunfl., Chisinau, Republic of Moldova, Aug. 25–27, 2011. – P. 25.

9. Usatov A.V., Markin N.V., Gorbachenko F.I., Fedorova M.A., Tihobaeva V.E., Gorbachenko O.F., Azarin K.V. SSR-analiz genomnoy DNK TSMS-linij podsolnechnika // Maslichnye kul'tury. NTB VNIIMK. – 2011. – № 1 (146–147). – S. 15–20.

10. Moisan-Thiery M., Marhadour S., Kerlan M.C., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T., Hingrat Y.Le. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR) // Potato Research. – 2005. – Vol. 48. – Is. 3–4. – P. 191–200.

11. Zhang L.S., Le Clerc V., Li S., Zhang D. Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment // Canadian Journal of Botany. – 2005. – V. 83 (1). – P. 66–72.

12. Guchetl' S.Z., Tchelyustnikova T.A., Ramazanov S.A., Antonova T.S. Molekulyarno-geneticheskaya kharakteristika inbrednykh linij podsolnechnika po izofermentnyim markeram i DNK profilyam // Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2004. – Vyp. 2 (131). – S. 42–46.

13. Guchetl' S.Z., Tchelyustnikova T.A., Araslanova N.M., Antonova T.S. SSR i SCAR genotipirovanie kollektzii otechestvennykh selektsionnykh obraztsov podsolnechnika, ustoychivyykh i vospriimchivyykh k rase E *Orobanche cumana* Wallr. // Maslichnye kul'tury. NTB VNIIMK. – 2012. – Vyp. 1 (150). – S. 20–26.

14. Tchelyustnikova T.A. Polimorfizm mikrosatellitnykh lokusov v genotipakh kul'turnogo i dikoras-tuschego podsolnechnika // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2008. – Vyp. 2 (139). – S. 19–23.

15. Turkav S.Z., Loskutov A.V., Gubenko T.P. Otsenka geneticheskoy chistoty linij i gibridov podsolnechnika s pomosch'yu izofermentnykh markerov // Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 1996. – Vyp. 117. – S. 33–37.

16. Cardy B.S., Stuber C.W., Goodman M.M. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes for maize (*Zea mays* L.) // Institute of Statist. Mineograph. – Series 1317. – North Carolina State Univ. – 1981. – 154 p.

17. Vallejos C.E. Enzyme activity staining // Isozymes in plant genetics and breeding: Part A. – Amsterdam: Elsevier. – 1983. – P. 469–516.

18. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // Proc. NAS USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 8014–8018.

19. Antonova T.S., Guchetl' S.Z., Tchelustnikova T.A., Ramazanov S.A. Development of marker system for identification and certification of sunflower lines and hybrids on the basis of SSR-analysis // Helia. – 2006. – Vol. 29. – № 45. – P. 63–72.