УДК 577.21:582.475.2

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-МАРКЕРОВ В ПРИРОДНЫХ И ИСКУСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИСТВЕННИЦЫ

[1]Нечаева Ю.С., [1]Боронникова С.В., [1]Юсупов Р.Р., [2]Хайнце Б.

[1]ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, e-mail: svboronnikova@yandex.ru;

[2]Федеральный научно-исследовательский центр лесов, опасных природных явлений и ландшафта, Вена, e-mail: berthold.heinze@bfw.gv.at

Выполнен сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров и генетического разнообразия природной и искусственной популяций лиственницы Пермского края. Из 20 протестированных ISSR-праймеров выявлены пять эффективных для анализа полиморфизма ДНК лиственницы. Анализ ISSR-спектров растений природной популяции лиственницы выявил 80 фрагментов ДНК, из которых 74 были полиморфными. У деревьев из искусственных насаждений выявлено 110 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 96 полиморфные. Показано, что ISSR-спектры искусственной популяции характеризуются наличием длинных фрагментов ДНК в отличие от таковых природной популяции, особенно четко это отражали спектры динуклеотидных праймеров. Определены основные параметры генетического разнообразия популяций. Доля полиморфных локусов природной популяции лиственницы высока и составила 0,925, а у искусственной популяции этот показатель ниже (P_{95} = 0,872), то есть искусственная популяция содержит генетически более гомогенные деревья. Выявлен идентификационный уникальный ISSR-маркер для природной популяции лиственницы, который может быть использован при составлении молекулярно-генетической формулы популяций.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, полиморфизм ДНК, ISSR-маркеры, Larix

THE STUDY OF ISSR-MARKERS POLYMORPHISM IN NATURAL END CULTURAL POPULATIONS OF LARCH

[1]Nechaeva Y.S., [1]Boronnikova S.V., [1]Yusupov R.R., [2]Heinze B.

[1]Perm State University, Perm, e-mail: svboronnikova@yandex.ru;

[2]Federal Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscape, Vienna, e-mail: berthold.heinze@bfw.gv.at

Currently particularly relevant study genetic diversity and intraspecific differentiation of forest trees in connection with the problem of forest genetic resources conservation. Recently, for these purposes are widely used ISSR-markers. The aim of the study is a comparative analysis of ISSR-markers polymorphism and genetic diversity in natural and cultural populations of larch in Perm region. Selected informative ISSR-primers. Analysis of ISSR-spectra plant larch natural population revealed 80 DNA fragments, of which 74 were polymorphic. In trees cultural population found 110 of amplified DNA fragments, of which 96 polymorphic. It is shown that the ISSR-spectra of cultural population characterized by the presence of long DNA fragments in contrast to those of the natural population. The main parameters of the populations genetic diversity are revealed. The proportion of polymorphic loci of the natural population of larch is high and was 0,925, while to those of the cultural population is lower (P95 = 0,872), that is, an cultural population is more genetically homogeneous. Identified a unique ISSR-marker for natural population of larch, which can be used in the preparation of populations molecular genetic formula.

Keywords: genetic diversity, DNA polymorphism, ISSR-markers, Larix

Изучение генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации лесообразующих видов хвойных растений, в том числе и видов рода *Larix*, имеющих важное биосферное и ресурсное значение, является одной из важнейших задач популяционной биологии. Особую актуальность исследование этих вопросов приобрело в связи с проблемой сохранения генетических ресурсов хвойных видов растений. В последние десятилетия в результате увеличения антропогенного давления на природные растительные сообщества и экосистемы возникла серьезная угроза сокращения их генетического разнообразия. Только на основании точных сведений о генетической структуре популяций хвойных, уровня их генетической изменчивости и характере ее распределения в пределах ареалов видов может быть оценен генетический потенциал видов и разработан для каждого из них комплекс мероприятий, направленных на максимальное сохранение генетического разнообразия в процессе их использования и воспроизводства [1].

Успешность решения задач общей и частной популяционной генетики многих видов зависит от изученности различных элементов генома и их полиморфизма [13]. В последнее время для этих целей широко используются микросателлитные [11, 14] и межмикросателлитные [17] или ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats). В качестве праймеров для ISSR-анализа полиморфизма ДНК в ПЦР используют короткие ди- и тринуклеотидные микроса-

теллитные повторы. Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными инвертированными микросателлитами (как правило, это уникальная ДНК). В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Полученные паттерны ПЦР-продуктов видоспецифичны. В геномах растений количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к этим генам, ISSR-маркирование не требует предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК [7]. Метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования [6]. Эти маркеры нашли широкое применение в популяционно-генетических исследованиях различных объектов [2, 4, 5]. Однако, поскольку геномное распределение микросателлитов существенно отличается у разных таксонов [7], а возможные причины таких отличий до сих пор недостаточно изучены, перед использованием ISSR-маркеров для изучения генетической изменчивости и идентификации видов необходимо исследовать полиморфизм спектров получаемых фрагментов ДНК в зависимости от корового мотива микросателлита [12]. В связи с чем в данной работе выполнен сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров, полученных с использованием в качестве праймеров разных мотивов микросателлитов у популяций лиственницы различного происхождения.

Целью данного исследования являлся анализ полиморфизма ISSR-маркеров и генетического разнообразия природной и искусственной популяций лиственницы Пермского края.

Материал и методы исследования

Сбор растительного материала (хвои) произведен с 26 случайно выбранных деревьев искусственных насаждений лиственницы, расположенных в Кишертском районе на территории УНБ «Предуралье», и с 28 растений естественной популяции, расположенной в 500 м северо-восточнее д. Заборье Добрянского района Пермского края. Выделение ДНК проводили с использованием СТАВ-метода [15], модифицированного нами для хвойных видов [10]. Концентрацию и качество полученной ДНК определяли с помощью прибора Nanodrop ND-2000 (Thermo scientific, USA). Геномную ДНК разбавляли до концентрации 10 нг/мкл в ТЕ-буфере. Для ПЦР использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую 2 единицы Tag-полимеразы, 2,5 мкл стандартного 10х буфера для ПЦР; 25 пМ праймера; 2,5 мМ Mg^{2+}; 0,25 мМ dNTP, 5 мкл геномной ДНК. В качестве отрицательного (К-) контроля в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили в термоциклере Gene Amp PCR System 9700 («Applied Biosystems», USA) по стандартной для ISSR-метода программе [9]. Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров опыт повторяли не менее трех раз.

Для выявления полиморфизма ДНК лиственницы был произведен выбор информативных ISSR-праймеров в соответствии со шкалой эффективности праймеров, предложенной Р.Н. Календарем и С.В. Боронниковой: от низкой (1) до высокой (5) [8]. Каждый праймер индивидуально был анализирован в ПЦР ISSR-методом с геномной ДНК. Нами протестировано 20 ISSR-праймеров, синтезированных в ЗАО «Синтол» (г. Москва), из которых отобраны 5 наиболее информативных для дальнейшего анализа (табл. 1).

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7% агарозном геле в 1х ТВЕ буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.5 + 3 Kb DNA Ladder) (ООО «СибЭнзим-М», Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One в системе гель-документации Gel Doc XR («Bio-Rad»,США). Для компьютерной обработки полученные результаты были представлены в виде матрицы бинарных данных. Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью компьютерных программ POPGENE 1.31 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel с определением: доли полиморфных локусов (P_{95}), абсолютного числа аллелей (n_a), эффективного числа аллелей (n_e), ожидаемой гетерозиготности (H_E) [15].

Результаты исследования и их обсуждение

Протестированные 20 ISSR-праймеров содержали последовательности ди- и тринуклеотидных микросателлитных мотивов с добавлением якорного нуклеотида на 3'-конце. Таким образом, из 20 протестированных ISSR-праймеров 6 показали высокую эффективность (5), так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся фрагментов ДНК, четыре праймера обнаружили среднюю (4) и остальные праймеры показали невысокую эффективность (3 и ниже). Для проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК лиственницы были отобраны следующие праймеры: (AC)8CT, (ACC)6G, (AGC)6C, (GAC)6C, (CA)6GT (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность ISSR-праймеров

Праймер		Температура отжига (T_m, °C)	Эффективность праймера	Праймер		Температура отжига (T_m, °C)	Эффективность праймера
1	$(AC)_8CG$	56	3	11	$(AG)_8CA$	54	3
2	$(AC)_8CC$	56	1	12	$(AG)_8CG$	56	3
3	$(AC)_8CT$	54	5	13	$(CTC)_6C$	64	3
4	$(GA)_8C$	53	2	14	$(GAG)_6C$	56	5
5	$(ACC)_6G$	62	5	15	$(ACG)_7G$	64	4
6	$(AGC)_6C$	64	5	16	$(ATG)_7C$	60	4
7	$(AGC)_6G$	64	4	17	$(CT)_8TC$	54	2
8	$(AC)_8T$	50	5	18	$(CA)_6GT$	56	5
9	$(TG)_8AA$	52	1	19	$(GA)_6GG$	46	4
10	$(TG)_8GC$	56	1	20	$(GT)_6GG$	46	3

Примечание. Эффективность праймеров от 1 (низкая) до 5 (высокая) определена по шкале, предложенной С.В. Боронниковой и Р.Н. Календарем (2007).

Это свидетельствует о том, что структурные элементы генома, фланкированные ACA-повторами, представлены в геноме исследованного вида с большей частотой, чем участки, фланкированные GT-повторами. Обнаружено, что каждый используемый праймер в ISSR-методе приводил к формированию специфичных спектров продуктов амплификации, причем их полиморфизм не был прямо связан с количеством выявляемых локусов. Спектры, получаемые с использованием ди- и тринуклеотидных микросателлитных мотивов в качестве праймеров, оказались в равной степени насыщены ампликонами.

ISSR-маркирование природной популяции лиственницы выявило 80 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 74 были полиморфными (P_{95} = 0,925).

Число амплифицированных фрагментов ДНК варьировалось в зависимости от праймера от 11 до 26, а их размеры – от 200 до 2190 пн. Наибольшее число локусов выявил праймер $(ACC)_6G$. Доля полиморфных локусов природной популяции лиственницы высока и варьировалась от 0,923 до 1,000 (табл. 2).

Таблица 2

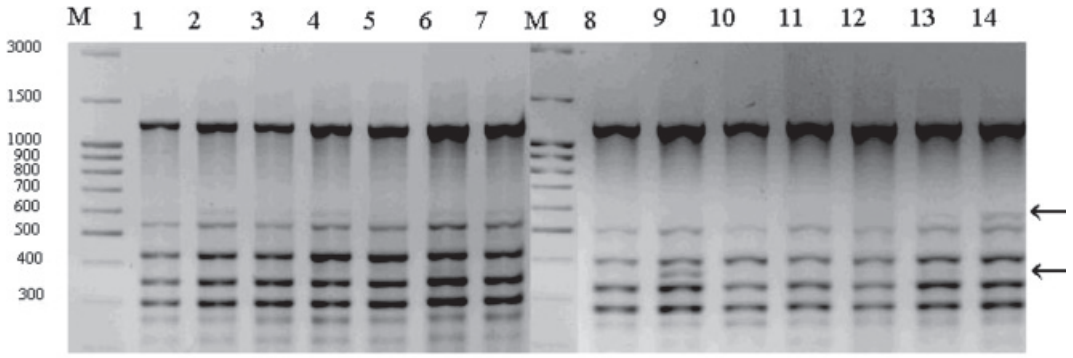
Характеристика ISSR-спектров изученных популяций лиственницы

Праймер	Популяция	Границы длин локусов спектра, п.н.	Число ампликонов в спектре	Число полиморфных ампликонов	Доля полиморфных ампликонов
(AC)8 CT	искусственная	1160–260	30	30	1
	природная	640–280	11	10	0,909
$(ACC)_6G$	искусственная	2190–200	19	17	0,895
	природная	2190–230	26	26	1
$(AGC)_6C$	искусственная	1190–270	8	2	0,250
	природная	1190–220	17	14	0,823
$(GAG)_6C$	искусственная	1960–290	21	19	0,905
	природная	1660–240	11	10	0,909
$(CA)_6GT$	искусственная	1130–200	32	28	0,875
	природная	620–200	15	14	0,933

Анализ ISSR-спектров лиственницы из искусственных насаждений выявил 110 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 96 (P_{95} = 0,872) были полиморфными. Число амплифицированных ISSR-фрагментов в зависимости от праймера варьировалось от 8 до 32. Доля полиморфных локусов искусственной популяции ли-

ственницы ниже и варьировалась от 0,250 до 1,000. Размеры ISSR-фрагментов у растений из искусственных насаждений лиственницы изменялись так же как, и у растений природной популяции – от 200 до 2190 пн (рисунок). Однако ISSR-спектры искусственной популяции характеризуются наличием длинных фрагментов ДНК в отличие от таковых природной популяции, особенно четко это отражали спектры динуклеотидных праймеров $(AC)_8CT$ и $(CA)_6GT$ (табл. 2).

Праймеры $(GAG)_6C$ и $(AGC)_6C$ выявили сходные спектры по диапазону длин ампликонов, но отличаются по доле полиморфных локусов. Так, ISSR-спектры, выявляемые с использованием в ПЦР праймера $(AGC)_6C$, оказались менее полиморфными для обеих выборок ($P_{95} = 0,250$ для искусственной, $P_{95} = 0,823$ для естественной популяции). Высокая доля полиморфных локусов установлена с использованием праймера $(GAC)_6C$ (0,905 и 0,909 соответственно) (рисунок).



Фрагмент ISSR-спектра искусственной популяции с праймером $(AGC)_6C$: М – маркер молекулярного веса; 1–14 – номера проб ДНК, стрелками обозначены некоторые полиморфные фрагменты

Сравнительный анализ генетических структур по полилокусным спектрам продуктов амплификации ISSR-маркеров различных по происхождению популяций лиственниц показал, что в искусственной популяции 44,5% выявленных локусов являлись уникальными, а в природной популяции – только 25%. Примечательно, что фрагмент длинной 220 п.н. спектра праймера $(AGC)_6C$ являлся мономорфным для природной популяции и не был отмечен нами ни у одного растения из искусственной популяции. Этот факт позволяет обозначить этот ISSR-маркер как идентификационный для природной популяции. Мономорфными для искусственной популяций являлись 7 (0,53%) амплифицированных фрагментов ДНК, но в природной популяции они встречались с низкой частотой. В природной популяции отмечено только 3 (0,02%) мономорфных фрагмента. Интересено, что из 10 мономорфных фрагментов ДНК, отмеченных в двух изученных популяциях, только 6 (0,46%) встречались в обеих популяциях (табл. 3).

На основании проведенного анализа полиморфизма ДНК выполнена оценка параметров генетического разнообразия исследованных популяций (табл. 4).

Таблица 3

Частота ISSR-маркеров двух изученных популяций лиственницы

Праймер	Длины фрагментов, п.н.	Частота	
		искусственная популяция	природная популяция
$(AC)_8$ CT	640	0,308	1,000
	500	0,500	1,000
$(ACC)_6G$	620	1,000	0,643
	410	1,000	1,000
$(AGC)_6C$	1190	1,000	0,214
	540	1,000	0,643
	440	1,000	0,678
	350	1,000	1,000
	300	1,000	1,000
	270	1,000	0,143
	220	0	1,000
$(GAG)_6C$	610	1,000	1,000
	530	1,000	1,000
	350	0,231	0,857
$(CA)_6GT$	350	1,000	0,500
	300	1,000	0,714
	200	1,000	1,000

Таблица 4

Показатели генетического разнообразия двух популяций лиственницы

Популяция	H_E	n_a	n_e	P_{95}
Искусственные насаждения	0,197 (0,014)	1,740 (0,440)	1,302 (0,294)	0,872
Естественная популяция	0,161 (0,016)	1,557 (0,498)	1,263 (0,335)	0,925
На общую выборку	0,210 (0,013)	1,954 (0,209)	1,329 (0,299)	0,894

Примечание: H_E – ожидаемая гетерозиготность; n_a – абсолютное число аллелей на локус; n_e – ффективное число аллелей на локус; у всех вышеуказанных параметров в скобках даны стандартные отклонения.

Определенно, что природная популяция характеризуется более высокой долей полиморфных локусов (P_{95} = 0,925), а остальные показатели генетического разнообразия ниже у этой популяции (H_E = 0,161; n_a = 1,557; n_e = 1,263).

Заключение

Из 20 протестированных ISSR-праймеров выявлены пять эффективных для анализа полиморфизма ДНК лиственницы. Выполнен сравнительный анализ генетических структур по полилокусным спектрам продуктов амплификации ISSR-маркеров двух различных по происхождению популяций лиственниц. Анализ ISSR-спектров растений природной популяции лиственницы выявил 80 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 74 полиморфны (P_{95} = 0,925), у деревьев из искусственных насаждений – 110 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых полиморфны 96 (P_{95} = 0,872). Доля полиморфных локусов природной популяции лиственницы высока и варьировалась от 0,923 до 1,000, а у искусственной популяции этот показатель изменялся от 0,250 до 1,000, то есть искусственная популяция содержит генетически более гомогенные деревья. Выявлен идентификационный уникальный ISSR-маркер для природной популяции лиственницы. В дальнейших исследованиях данный фрагмент может быть использован при составлении молекулярно-генетической формулы по предложенной С.В. Боронниковой [3] методике молекулярно-генетической идентификации и паспортизации растений, в соответствии с которой мы обозначили его как $Ls_v220_{(AGC)6C}$. Показано, что ISSR-спектры искусственной популяции характеризуются наличием длинных фрагментов ДНК в отличие от таковых природной популяции, особенно четко это отражали спектры динуклеотидных праймеров.

Наибольшее число локусов выявил праймер $(ACC)_6G$. Показано, что структурные элементы генома лиственницы, фланкированные ACA-повторами, представлены с большей частотой, чем участки, фланкированные GT-повторами. Праймеры $(GAG)_6C$ и $(AGC)_6C$ выявили сходные спектры по диапазону длин ампликонов, но выраженные отличия по доле полиморфных локусов. Эти последовательности принадлежат к так называемым пурин/пиримидиновым трекам, способным формировать триплексные структуры, предположительно, принимающим участие в регуляции генной экспрессии [12]. При оценке параметров генетического разнообразия исследованных популяций лиственницы определено, что природная популяция характеризуется более высокой долей полиморфных локусов (P_{95} = 0,925), а остальные показатели генетического разнообразия ниже у этой популяции (H_E = 0,161; n_a = 1,557; n_e = 1,263).

Таким образом, сравнительный анализ генетических структур по полилокусным спектрам продуктов амплификации ISSR-маркеров различных по происхождению популяций лиственниц позволил установить в геноме этого вида наличие определенных микросателлитных повторов, определить основные параметры генетического разнообразия популяций и выявить идентификационные фрагменты и их сочетания для каждой популяции.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием на оказание услуг, частично финансируемых Министерством образования и науки РФ из средств федерального бюджета, на оборудовании, закупленном в ходе реализации проекта развития Пермского национального исследовательского университета.

Список литературы

1. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России / отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин; Рос. академ. наук, Сиб. отд-ние, Инт-леса им. В.Н. Сукачева. – Новосибирск: Академ. изд-во «Гео», 2010. – 159 с.

2. Бобошина И.В., Боронникова С.В. Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6 (1). – С. 92–97.

3. Боронникова С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений: монография. – Пермь: Перм. ун-т., 2008. – 120 с.

4. Боронникова С.В. Исследование генетической изменчивости популяций редкого вида Урала Adenophora lilifolia (L.) DC. на основании анализа полиморфизма ISSR-маркеров // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 5. – С. 1–4.

5. Генетическая дифференциация популяций Populus tremula L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров / Т.Н. Светлакова, И.В. Бобошина, Ю.С. Нечаева и др. // Аграрный Вестник Урала. – 2012. – № 3 (95). – С. 11–13.

6. Глазко В.И., Глазко Т.Т. ДНК-технологии в генетике и селекции: курс лекций. – Краснодар: ВНИИ риса, 2006. – 399с.

7. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2002. – № 4. – С. 279–296.

8. Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно–генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Материалы Четвертого Моск. междунар. конгресса. Ч. 2. – М.: ЗАО «Экспо–биохим–технологии»; Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделееева, 2007. – 121 с.

9. Молекулярная генетика: учеб.-метод. пособие / под ред С.В. Боронниковой; Перм. ун-т. – Пермь, 2007. – 150 с.

10. Оптимизация методик выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края / Ю.С. Нечаева, Н.Н. Бельтюкова, Я.В. Пришнивская и др. // Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование: материалы междунар. науч. конф. Т.2. (Пермь, 21-25 нояб. 2011г.) – Пермь, 2011. – С. 278–282.

11. Орешкова Н.В., Белоконь М.М., Жамъянсурен С. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 2. – С. 204–213.

12. Феофилов А.В. Полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов, в исследованиях пород овец, крупного рогатого скота, лошадей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Дубровицы, 2012. – 22 с.

13. Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. – М.: Воскресенье, 2006. – 480 с.

14. Microsatellite analysis of small anonymous seedlot samples from pedunculate oak (Quercus robur): a promising approach to monitor the number of different seed parents and pollen donors / C. Lexer, B. Heinze, S. Gerber [et al.] // Forestry sciences – 2001. – Vol. 70. – P. 239–250

15. Nei M. Molecular evolutionary genetics. – N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. – 512. p.

16. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 1 (19). – P. 69–76.

17. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – Vol. 20. – P. 176–183.

References

1. Bioraznoobrazie listvennic Aziatskoj Rossii [Biodiversity of larches Asian Russia]. Novosibirsk, Academic Publ. Hous «Geo», 2010. 159 p.

2. Boboshina I.V., Boronnikova S.V. *Fundamental'nye issledovanija*, 2013, no. 6 (1), pp. 92–97.

3. Boronnikova S.V. *Molekuljarno-geneticheskaja identifikacija i pasportizacija redkih i nahodjashhihsja pod ugrozoj ischeznovenija vidov rastenij* [Molecular genetic identification and certification of the rare and endangered plant species]. Perm: Perm. St. Univ., 2008. 120 p.

4. Boronnikova S.V. *Genetika*, 2009, Vol. 45, no. 5, pp. 1–4.

5. Svetlakova T.N., Boboshina I.V., Nechaeva Yu.S., Boronnikova S.V. *Agrarnyj Vestnik Urala*, 2012, no. 3 (95), pp. 11–13.

6. Glazko V.I., Glazko T.T. *DNK-tehnologii v genetike i selekcii* [DNA-technology in genetics and selection]. Krasnodar: All-Russian Rice Research Inst., 2006. 399 p.

7. Kalendar R.N., Glazko V.I. *Fiziol. i biohim. kul't. rastenij*, 2002, no. 4, pp. 279–296.

8. Kalendar R.N., Boronnikova S.V. *Materialy Chetvertogo Mosk. mezhdunar. kongressa. Ch. 2* (Proceedings of the Fourth Moscow. Intern. Congress. P. 2). Moscow: D. Mendeleyev Univ., 2007. 121 p.

9. *Molekuljarnaja genetika* [Molecular genetics]. Perm: Perm. St. Univ., 2007. 150 p.

10. Nechaeva Yu.S., Beltjukova N.N., Prishnivskaja Ya.V., Taiman K.E. *Sintez znanij v estestvennyh naukah. Rudnik budushhego: proekty, tehnologii, oborudovanie: materialy mezhdunar. nauch. konf. T.2.* (Synthesis of knowledge in the natural sciences. Mine of the Future: Projects, Technologies, Equipment: Proceedings of International. Scientific. Conf. Vol. 2). Perm: Perm. St. Univ., 2011. pp. 278–282.

11. Oreshkova N.V., Belokon M.M., Zhamjansuren S. *Genetika*, 2013, Vol. 49, no. 2, pp. 204–213.

12. Feofilov A.V. *Avtoref. dis. kand. biol. nauk.* [Abstract diss. of the candidate of biol. sciences]. Dubrovicy, 2012. 22 p.

13. Harchenko P.N., Glazko V.I. *DNK-tehnologii v razvitii agrobiologii* [DNA technology in development Agrobiology]. Moscow, Voskresen'e, 2006. 480 p.

14. Leher C., Heinze B., Gerber S. Steinkellner H., Ziegenhagen B., Kremer A., Glössl J. *Forestry sciences*, 2001, Vol. 70, pp. 239–250.

15. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. 512. p.

16. Rogers S.O., Bendich A.J. *Plant Molecular Biology*, 1985, Vol. 1 (19), pp. 69–76.

17. Zietkieshhicz E., Rafalski A., Labuda D. *Genomics*, 1994, Vol. 20, pp. 176–183.

Рецензенты:

Переведенцева Л.Г., д.б.н., профессор кафедры ботаники и генетики растений биологического факультета, ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь;

Новоселова Л.В., д.б.н., профессор кафедры ботаники и генетики растений биологического факультета, ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 03.06.2013.