

В.М. Косолапов, академик РАН

Н.Н. Козлов, кандидат сельскохозяйственных наук

И.А. Клименко, кандидат сельскохозяйственных наук

В.Н. Золотарев, кандидат сельскохозяйственных наук

*Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса
РФ, 141055, Московская обл., г. Лобня, ул. Научный городок, корп. 1*

E-mail: nnkozlov@rambler.ru

УДК 633.1:631.523.5

DOI: 10.30850/vrsn/2020/5/40-46

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ СЕЛЕКЦИОННЫХ ДОСТИЖЕНИЙ КОРМОВЫХ КУЛЬТУР

Методы генетической идентификации сортов и форм кормовых культур приобретают все большее научное и практическое значение в решении вопросов селекции, семеноводства и защиты авторских прав селекционеров. Для этих целей широко применяются молекулярные маркеры, разработанные на основе изучения полиморфизма ДНК – непосредственного носителя наследственной информации. В аналитическом обзоре рассматриваются возможности и перспективы использования различных методов ДНК-анализа для оценки генетического разнообразия кормовых растений и создания на этой основе генетических паспортов селекционных достижений. Объективная оценка структуры сортов и наличия в них примесей – необходимое условие для усовершенствования методических подходов к апробации и своевременного решения вопросов сортообновления и сортосмены. В первичном семеноводстве система ДНК-маркеров, отраженная в генетическом паспорте, позволит надежно сохранять исходную генетическую структуру сорта и обеспечить длительное поддержание его в производстве без изменения хозяйственно ценных признаков и свойств. Для создания генетических паспортов селекционных достижений кормовых культур приведена блок-схема, визуализирующая алгоритм действий при паспорттизации.

Ключевые слова: генетическая паспорттизация, кормовые культуры, ДНК-маркеры, генетические карты, отличимость, однородность, стабильность, сортообновление, сортосмена.

V.M. Kosolapov, Academician of RAS

N.N. Kozlov, PhD in Agricultural sciences

I.A. Klimenko, PhD in Agricultural sciences

V.N. Zolotarev, PhD in Agricultural sciences

*V.R. Vil'yams Federal Research Center of Forage Production and Agroecology
RF, 141055, Moskovskaya obl., g. Lobnya, ul. Nauchnyj gorodok, korp. 1*

E-mail: nnkozlov@rambler.ru

GENETIC CERTIFICATION OF FODDER CROPS BREEDING ACHIEVEMENTS

The methods of genetic identification of forage crops varieties and forms have significant scientific and practical importance in breeding and seed multiplication, in protection of author's rights. At the current moment molecular markers on the base of DNA-polymorphism have been applied widely for these aims. This analytical review examines the possibilities and the prospects of application the different DNA-analysis methods for assessment of forage crops genetic diversity and for development the molecular-genetic passports of breeding achievements. The objective estimation of varieties structure and presence impurities is a necessary condition for improving the methodical approaches in approbation of crops and for decision the problems of timely variety-seed renovation and its systematic replacement. The system of DNA markers that registered in genetic passport will enable to keep the initial genetic structure of variety and to maintain it in production process during long time without fluctuations of agronomic important characteristics and properties. This factor is especially valuable for development the primary seed multiplication.

Key words: genetic certification, forage crops, DNA markers, variability, uniformity, stability, variety-seed renovation, systematic replacement of varieties.

Генетическая паспорттизация селекционных достижений растительных объектов подразумевает создание официальных документов о его таксономической принадлежности, ближайшем родстве и характерных отличиях, устойчиво передающихся из поколения в поколение в связи с их генетической детерминированностью.

Проведение генетической паспорттизации селекционных достижений считается актуальнейшей задачей современной селекции. [6] В первую очередь она необходима для решения теоретических и прикладных проблем интродукции, изучения, хранения, воспроизведения, идентификации и регистрации генетических ресурсов растений. Особое внимание уделяется методам паспорттизации в сорто-

испытании, селекции, семеноводстве и семенном контроле. Необходима она и для предоставления селекционером права интеллектуальной собственности. Отсутствие охраны прав селекционеров делает эти цели труднодостижимыми, поскольку ничто не мешает неправомочным лицам заниматься размножением семян и осуществлять их коммерческий сбыт.

По мнению академика А.А. Жученко [4], каждый образец селекционной коллекции должен быть идентифицирован и паспорттизирован еще и потому, что это поможет сохранению целостности генетических ресурсов. Это послужит расширению генетической базы для селекции культурных растений.

Цель работы – на основе аналитического обзора различных методов ДНК-анализа обозначить пер-

спективы их использования для создания генетических паспортов селекционных достижений.

Ведущая роль в современной истории селекции и семеноводства, включая и паспортизацию селекционных достижений, принадлежит Международному союзу по охране новых сортов растений (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV), учрежденному Международной конвенцией по охране новых сортов растений (Париж, 1961 г.). Основная цель UPOV – обеспечение признания членами Союза достижений селекционеров, предоставление им права интеллектуальной собственности на основании четко оговоренных принципов. [5] Эти принципы предполагают: отличимость (*distinction (D)*) селекционного достижения от уже существующих общеизвестных сортов; достаточную однородность (*uniformity (U)*); стабильность (*stability (S)*) передачи основных признаков и свойств из поколения в поколение.

Отличимость – главный компонент DUS, оценивают, как качественное отличие нового сорта от уже существующих хотя бы по одному из признаков. Однако, так как большинство кормовых культур представляют собой популяции со сложной генетической структурой и низкой наследуемостью основных селекционно ценных признаков и свойств, при апробации приходится прибегать к построению и сравнению вариационных рядов, как это принято для клевера лугового. Но и этот прием позволяет различать сорта, относящиеся к альтернативным группам по своей скороспелости и морфологии. [12]

Новый сорт должен быть достаточно **однородным** по своим морфологическим, цитологическим, химическим и другим признакам с учетом отдельных отклонений, существующих в связи с особенностями размножения. Внутрисортная изменчивость нового селекционного достижения не должна быть выше, чем у ранее зарегистрированных сортов. Этот критерий трудно применить к кормовым культурам из-за высокой гетерогенности сортовых популяций и полиплоидией, которая маскирует гетерозиготность и снижает эффект выравнивающего отбора. [7] Кроме того, часть сортов, используемых в производстве – межвидовые гибриды, которые в течение многих поколений продолжают расщепляться [1], создавая тем самым избыточное варьирование хозяйственно ценных признаков и свойств внутри сортов-популяций.

Стабильность предполагает, что признаки сорта остаются неизменными после неоднократного размножения. Но у кормовых растений при высокой гетерогенности сортов-популяций и под воздействием резких флюктуаций агроклиматических условий может существенно измениться соотношение аллелей, что потребует большого объема корректирующих отборов по возврату генетической структуры сортов-популяций к оригиналу.

Оценку DUS и подготовку документов на передачу перспективного образца в государственное сортоиспытание проводят на основе обязательных, рекомендуемых и вспомогательных критериев: 1. Количественные морфологические характеристики (высота растения, форма листа); 2. Физиологические признаки (устойчивость к болезням и вредителям); 3. Биохимические характеристики

(по запасным белкам) относят к вспомогательным. Согласно методике государственного сортоиспытания, в зависимости от культуры, учитывают от 10 до 15 признаков, характеризующих продуктивность, экологическую устойчивость и кормовые достоинства. Большинство признаков, подлежащих регистрации, имеют сложный генетический контроль с большим количеством генов и аллелей на фоне сильного влияния внешней среды на их экспрессию. В связи с этим, оценка посевов путем апробации и грунтового контроля по фенотипическому проявлению признаков не всегда может гарантировать высокую точность этих показателей. Поэтому в федеральном законе «О семеноводстве», предусмотрено введение лабораторного контроля сортовой чистоты и сортового соответствия оригинальных и репродукционных семян.

В связи с требованиями Госкомиссии по сортоиспытанию на отличимость новых сортов, большинство из которых – это сложные популяции, появился интерес к легко распознаваемым по фенотипическому проявлению генам маркерам. Маркерные (сигнальные) признаки, как отмечал А.С. Серебровский [9], позволяют следить за наследованием того участка хромосом, в котором эти сигналы расположены. В современном представлении генетическая паспортизация включает получение генетически детерминированных (индивидуальные и/или групповые) характеристик с помощью морфологических и/или молекулярных маркеров.

Морфологические маркеры начали изучать и применять в начале прошлого века. Однако широкого распространения они не нашли, так как условиям маркера отвечало лишь ограниченное количество признаков, имеющих простой тип наследования, то есть те, которые контролировались не более чем 2–3 генами с хорошо выраженными фенотипическими эффектами аллелей – маркерные признаки должны иметь качественный тип наследования. Количество таких признаков внутри вида невелико: у клевера лугового их насчитывается около 15, а у люцерны – около 20. [3] Это существенно ограничивает возможности их применения для массового маркирования хозяйственно ценных признаков и свойств культурных видов и селекционных достижений. Кроме того, большинство из них специфичны, у растений с многолетним циклом развития признаки могут проявляться лишь на второй или в последующие годы жизни, что требует дополнительных финансовых и материальных затрат для их выявления.

С конца пятидесятых годов добавилась маркерная система, основанная на полиморфизме изоферментных спектров [6, 10], которая получила официальный статус при маркировании селекционных достижений. Для этой маркерной системы также характерны общие с фенотипическими маркерами недостатки – ограниченное количество изоферментов, строгая органоспецифичность и существенная зависимость от условий внешней среды. [8]

Во второй половине прошлого века при стремительном развитии ДНК-технологий были созданы методы определения наследственной изменчивости через оценку последовательности нуклеотидов генома. Сравнение полиморфизма ДНК с многооб-

разием фенотипических форм и экспрессией благоприятных признаков позволяет выделить целый ряд маркеров, которые можно использовать в селекции и семеноводстве культурных растений. [13] Успех в этой области был достигнут в 1980 году Д. Ботштейном с соавторами, получившими первые монолокусные генетические маркеры на основе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК, показав, что с их помощью можно формировать генетические карты.

Настоящий переворот в молекулярной генетике произошел после разработки К. Мюллисом с соавторами в 1986 году метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) – polymerase chain reaction (PCR). В основе ПЦР лежит способность ДНК-полимераз синтезировать цепь ДНК по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до нескольких тысяч звеньев.

В результате, помимо морфологических и белковых, появились молекулярные маркеры, созданные на основе полиморфизма ДНК – основного носителя наследственной изменчивости. За последние три десятилетия исследования в этом направлении велись настолько интенсивно, что в настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров (табл. 1). [11]

Большинство исследователей полимеразной цепной реакции начинали выявлять полиморфизм с использования единичного короткого, обычно 10-членного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью, получившего название RAPD – random amplified polymorphic DNA. Метод прост и универсален, широко использовался для исследований разных растительных видов, в том числе при паспортизации сортов и маркирования

селекционно ценных признаков и свойств, несмотря на невысокую воспроизводимость результатов исследований. [13 и др.]

До недавнего времени очень популярны были микросателлитные праймеры (SSR), созданные на основе простых повторов с высоким уровнем полиморфизма, они широко распространены в геноме. Микросателлиты состоят из участков ДНК длиной в 2–6 пар оснований, tandemно повторяющихся много раз. Однако их недостаточно для тонкого картирования отдельных областей геномов, а высокая стоимость оборудования и реактивов не способствует расширению сферы применения этого метода.

В последние годы популярными становятся методы, созданные на основе однонуклеотидного полиморфизма (SNP – single nucleotide polymorphisms), вызванного точечными мутациями, которые могут происходить как спонтанно, так и под действием мутагенов. Различие даже в одну пару оснований может быть причиной изменения признака. SNP широко распространен в геномах всех живых организмов и растений, имеющих миллионы точечных мутаций. Никакой другой из известных типов геномных различий не способен обеспечить такую плотность маркеров. В отличие от участков, детектируемых микросателлитами, однонуклеотидный полиморфизм характеризуется низким уровнем мутаций на поколение (~10⁻⁸), что делает эти маркеры удобными для популяционно-генетического анализа. Основное достоинство SNP – возможность использования автоматических методов их детекции, например, с использованием ДНК-матриц. Единицу лабораторно-технического исследования, за которую тестируется 54 001 маркер, называют «чип» или «54К-чип», чтобы указать число исследуемых маркеров. [24]

Таблица 1.

Основные классы наиболее широко используемых ДНК маркеров

Биологическая платформа	Тип ДНК маркеров	
	Монолокусный	Мультилокусный
Блот-гибридизация	RFLP Botstein et al., 1980 (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	VNTR Jeffreys et al., 1985, иначе называемый (variable number tandem repeats)
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	SSR Litt et al., 1989 (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) STS Olson et al., 1989 (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью SSCP Orita et al., 1989 (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК CAPS Konieczny et al., 1993 (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности SCAR Paran, Michelmore, 1993 (sequence characterized amplified region) – последовательность, характеризующая амплифицированный фрагмент	RAPD Williams et al., 1990 (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК ISSR Bowcock et al., 1994 (inter-simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности. AFLP Vos et al., 1995 (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов SSAP Waugh et al., 1997 (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм сиквенс-специфичной амплификации IRAP Kalendar et al., 1999 (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами
ДНК – чипы	SNP Brookes, 1999 (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм	DArT Jaccoud et al., 2001 (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия

С 2009 года крупнейшие животноводческие компании США (Cooperative Resources International), Нидерландов, Германии, Австралии внедряют генную селекцию в программы разведения крупного рогатого скота и свиней. Быки разных пород генотипированы с использованием более 50 000 SNP.

Интересные для исследователей результаты по генотипированию растений SNP-праймерами получены в Японии, где выявлен мононуклеотидный полиморфизм в 7054 локусах 40 форм томатов. [20]

Положительным примером практического использования SNP-праймеров могут служить работы по маркированию устойчивости клевера лугового к склеротиниозу и фузариозу. [22]

Благодаря стремительному прогрессу в области ДНК-технологий, биологи и практики будут оперировать огромными массивами маркеров, которые имеют важное теоретическое и прикладное значение:

- картирование генов и количественных селекционно ценных признаков и свойств;
- маркирование генов, хромосом и геномов растительных видов, подвидов, экотипов и форм;
- филогенетические исследования по изучению сходства и дивергенции ботанических объектов;
- отбор с помощью ДНК-маркеров в программах по селекции растений и животных (маркер-вспомогательная селекция, геномная селекция);
- молекулярная паспортизация сортов и перспективного исходного материала.

Такая информация необходима для создания подробных генетических паспортов современных селекционных достижений, так как, кроме отличимости, однородности и стабильности, она содержит наиболее точные и всесторонние данные о норме реакции его хозяйственно ценных признаков и свойств, способах его селекционного улучшения и особенностях семеноводства.

Для эффективного использования ДНК маркеров в паспортизации селекционных достижений необходимо разработать методы генетической классификации, экономической оценки в простой и понятной форме представления. Таким интегрированным инструментом может быть генетическая карта как апофеоз генетических исследований. Разработка генетических карт с использованием ДНК маркеров уже стала нормой. Например, только с 2000 по 2006 год создано 13 генетических карт для 7 основных видов кормовых растений (табл. 2).

Преимущество при ДНК картировании следует отдавать насыщенным генетическим картам с более 1000 шт. ДНК-маркеров. Важна при этом привязка групп сцепления к хромосомам для быстрого поиска маркеров, тесно ($\leq 1\text{cM}$) связанных с селективируемым признаком. [22]

Универсальность, объективность и высокая производительность современных методов оценки полиморфизма ДНК способствовали быстрому их распространению в различных сферах науки и производства. Дополнение этих методов к апробации, грунтовому и лабораторному сортовому контролю, а в ряде случаев полное замещение их, позволяет объективно оценить принадлежности сельскохозяйственных растений или партий семян к определенному сорту. Нет сомнения в том, что в скором будущем методы на основе анализа полиморфизма

ДНК селекционного достижения будут занимать ведущее место при сертификации и решении споров о взимании налогов (роялти) за использование семян запатентованных сортов.

На основе достижений последних лет в области исследований полиморфизма ДНК разрабатывают алгоритмы паспортизации селекционных достижений, учитывающие морфофизиологическую специфику видов, пloidность, а также степень межсортового и внутрисортового генетического полиморфизма кормовых культур.

Большинство культурных видов кормовых растений – анемофильные или энтомофильные перекрестники. Следовательно, в своем большинстве – это популяции с высокой степенью гетерогенности особей. В связи с этим, на первых этапах паспортизации встает вопрос о выборе метода формирования представительной выборки при оценке генетического разнообразия селекционного достижения. Один из них предполагает индивидуальный анализ ДНК генотипов (растений), что влечет за собой резкое увеличение количества анализов, а вместе с ним – затрат времени и расходов на реактивы. Второй способ основан на формировании представительной выборки генотипов из популяции селекционного достижения с последующим объединением их ДНК на паритетной основе (bulk DNA). Такой метод предпочтителен как с точки зрения затрат времени, так и финансов. Однако, несмотря на очевидную простоту и экономические преимущества метода, следует учитывать, что точность исследований полиморфизма ДНК в этом случае будет во многом зависеть от представительности выборки генотипов, составляющих смесь. Особенно это важно при необходимости оценки полиморфизма редких, как правило, уникальных аллелей. На это указывают многие исследователи. [31 и др.] Например, Crossa расчетами статистического распределения аллелей в диплоидных популяциях показал, что для таковых, встречающихся с вероятностью 10 % необходимо отбирать не менее 40 растений. [17] Если в выборке будет участвовать 100 растений, то можно

Таблица 2.
Генетические карты на основе ДНК-маркеров для кормовых культур

Ботанический вид	Метод оценки ДНК-полиморфизма	Авторы
Райграс многолетний (<i>Lolium perenne</i> L.)	SSR AFLP	Jones et al., 2002 [25] King et al., 2002 [28]
Райграс однолетний (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.)	RFLP	Inoue et al., 2004 [21]
Овсяница луговая (<i>Festuca pratense</i> Huds.)	AFLP	Alm et al., 2003 [14]
Овсяница гигантская (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	SSR и AFLP	Saha et al., 2005 [29]
Клевер ползучий (<i>Trifolium repens</i> L.)	SSR и AFLP SSR	Jones et al., 2003 [26] Barrett et al., 2004 [15]
Клевер луговой (<i>Trifolium pratense</i> L.)	RFLP SSR	Isobe et al., 2003 [23] Sato et al., 2005 [30]
Люцерна (<i>Medicago sativa</i> L.)	SSR RFLP SSR	Herrmann et al., 2006 [19] Brouwer, 1999 [16] Diwan et al., 2000 [18] Kalo et al., 2000 [27]

охватить уже аллели с 5 %-й частотой встречаемости. Для определения внутри- и межпопуляционного разнообразия такого энтомофильно опыляемого вида, как клевер луговой, часто использовали выборку в 25 растений, что позволяло с 90 %-й точностью оценить аллели, встречаемость которых в популяции составляла 10 %.

На втором этапе паспортизации необходима генетическая карта, чтобы выбрать те маркеры, а следовательно, праймеры, которые обеспечат оценку полиморфизма ДНК каждой из хромосом, равномерно покрывающих как область центромеры, так левого и правого плеча.

Важное значение при паспортизации селекционных достижений имеет процедура поиска уникальных маркеров, характерных только для конкретного селекционного достижения. Это делается простым визуальным сравнением электрофореграмм образцов. В случае отсутствия таковых, необходимо применять упорядочивание объектов в относительно однородные/удаленные классы на основе сравнения их по предварительно подготовленным и измеренным критериям. Наиболее широко распространенный метод для этих целей – кластерный анализ, который позволяет провести иерархическую группировку данных с графическим изображением результатов в виде дендрограммы. [2] Статистическая обработка дает возможность выявить в селекционных достижениях максимальное число различий или общих черт и сгруппировать их в отдельные генетические кластеры. Подобную объективную информацию легко использовать при паспортизации растительных объектов.

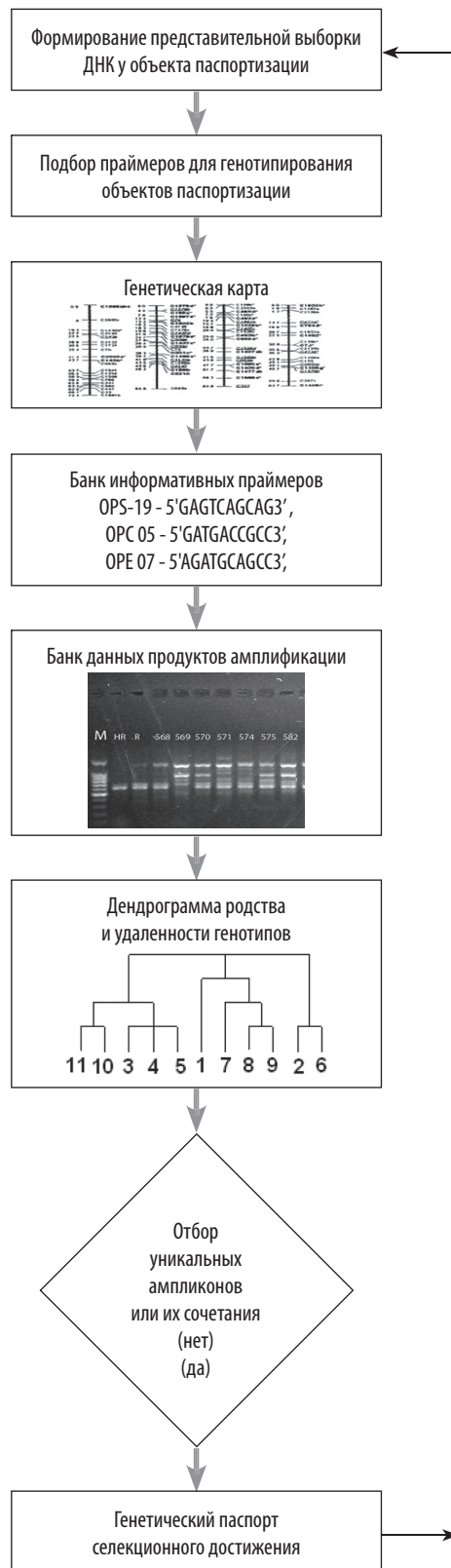
В случае отсутствия уникальных ампликонов или их сочетания, необходимо вернуться к подбору праймеров, расширив его, или даже перейти к иному классу, повторяя эту процедуру до тех пор, пока необходимые данные об уникальных генетических особенностях нового селекционного достижения будут выявлены. По завершении составляется генетический паспорт, который включает: метод анализа полиморфизма ДНК, перечень информативных праймеров, уникальные ампликоны и их сочетание (см. рисунок).

Генетический паспорт будет служить важным дополнением к общепринятому набору документов. При регистрации сорта он несет объективную оценку генетической структуры сортов, что будет способствовать усовершенствованию методических подходов к апробации и своевременному сортообновлению. Особую роль генетический паспорт, созданный на основе ДНК-маркеров, будет играть в первичном семеноводстве, где возможно сохранять исходную генетическую структуру сорта путем корректирующих отборов, обеспечивая тем самым длительное поддержание его в производстве без существенных изменений хозяйственно ценных признаков и свойств.

Заключение. Паспортизация селекционных достижений кормовых растений должна быть обязательной процедурой современной селекционно-семеноводческой практики.

Ведущая роль в генетической паспортизации на современном этапе принадлежит ДНК-маркерам,

обеспечивающим наиболее точную наследственную информацию о хозяйственно ценных признаках и свойствах сортов. Предпочтение отдается ДНК-маркерам, созданным на базе одно-нуклеотидного полиморфизма, обеспечивающего необычайно вы-



Блок-схема создания генетического паспорта селекционного достижения.

сокую плотность покрытия, точность, воспроизводимость и автоматизацию процесса.

Информация о ДНК-полиморфизме селекционного достижения, представленная в формате насыщенных генетических карт, будет отражать отличимость, однородность и стабильность основных хозяйственно ценных признаков и свойств сорта.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Бехтин, Н.С. Фестулолиум (*Festulolium*). В кн.: Основные виды и сорта кормовых культур / Н.С. Бехтин. – М.: Наука, 2015. – с. 207–210.
- Буреева, Н.Е. Многомерный статистический анализ с использованием ППП “Statistica” / Н.Е. Буреева. – Нижний Новгород, 2007. – 114 с.
- Дзюбенко, Н.И. Генетика диплоидной и тетраплоидной люцерны. В сб.: Генетические коллекции растений / Н.И. Дзюбенко, Е.А. Дзюбенко. – Новосибирск. – 1993. – С. 87–124.
- Жученко, А.А. Экологическая генетика культурных растений / А.А. Жученко. – Кишинев: «Штиинца». – 1980. – 588 с.
- Петер, К. Международный союз по охране селекционных достижений УПОВ. Организация семеноводства – основа получения высоких урожаев и высококачественной продукции с.-х. культур / К. Петер. – Пятигорск. – 2002.
- Конарев, А.А. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства / А.А. Конарев, В.Г. Конарев, Н.К. Губарева и др. – Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34. – С. 91–104.
- Новоселов, М.Ю. Клевер луговой (*Trifolium pretense* L.). В кн.: Основные виды и сорта кормовых культур / М.Ю. Новоселов. – М.: Наука, 2015. – С. 22–73.
- Поморцев, А.А. Идентификация и оценка сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна / А.А. Поморцев, Е.В. Лялина. – М.: МСХА, 2003. – С. 85.
- Серебровский, А.С. Генетический анализ / А.С. Серебровский. – М.: Наука, 1970. – 342 с.
- Созинов, А.А. Полиморфизм глиадина и возможности его использования. Растительные белки и их биосинтез / А.А. Созинов, Ф.А. Попереля. – М.: Наука, 1975. – С. 65–76.
- Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и селекции / Е.К. Хлесткина. – Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Том 17. – № 4/2. – С. 1044–1054.
- Чесноков, Ю.В. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса / Ю.В. Чесноков, В.М. Косолапов. – М., 2016. – 171 с.
- Чесноков, Ю.В. Молекулярные маркеры в популяционной генетике и селекции культурных растений / Ю.В. Чесноков, Н.В. Кочерин, В.М. Косолапов. – М.: ООО «Угрешская Типография». – 2019. – 200 с.
- Alm, V. A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds) and comparative mapping with other Poaceae species / V. Alm, C. Fang, C.S. Busso et al. – Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – P. 25–40.
- Barrett, B. A microsatellite map of white clover (*Trifolium repens* L.) / B. Barrett, A. Griffiths, M. Scriber et al. – Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – P. 596–608.
- Brouwer, D.J. A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) / D.J. Brouwer, T.C. Osborn. – Theor Appl Genet. – 1999. – P. 1194–1200.
- Crossa, J. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops / J. Crossa. – Theor Appl Genet. – 1989. – P. 153–161.
- Divan, N. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa / N. Divan, J.H. Bouton, G. Kochert, P.B. Cregan. – Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – P. 165–172.
- Herrmann, D. QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pretense* L.) / D. Herrmann B. Boller, B. Studer et.al. – Theor Appl Genet. – 2006. – P. 536–545.
- Hirakawa, H. Genome-Wide SNP Genotyping to Infer the Effects on Gene Functions in Tomato / H. Hirakawa, K. Shirasawa, A. Ohya et. al. – DNA Research. – 2013. – № 20. – P. 221–233.
- Inoue, M. Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers / M. Inoue, Z.S. Gao, M. Hirata et al. – Genome. – 2004. – № 47. – P. 57–65.
- Isobe, S. Genome-wide SNP marker development and QTL identification for genomic selection in red clover / S. Isobe, B. Boller, I. Klimenko et.al. In: Barth S and Milbourne D (eds) Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement. Springer Science+Business Media, New York. – 2012. – P. 29–35.
- Isobe, S. First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pretense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm / S. Isobe, I. Klimenko, S. Ivashuta et al. – Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – № 108. – P. 105–112.
- Jaccoud, D. Diversity arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping / D. Jaccoud, K. Peng, D. Feinstein, A. Kilian. – Nucl. Acids Res. – 2001. – V. 29(4). P. 25–31.
- Jones, E.S. An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) / E.S. Jones, M.D. Dupal, J.L. Dumsday et al. – Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – № 105. – P. 577–584.
- Jones, E.S. An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L.) / E.S. Jones, L.J. Hughes, M.C. Drayton et al. – Plant Science. – 2003. – № 165. – P. 531–539.
- Kaló, P. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*) / P. Kaló, G. Endre, L. Zimányi et.al. – Theor Appl Genet. – 2000. – № 100. – P. 641–657.
- King, J. Physical and Genetic Mapping in the Grasses *Lolium perenne* and *Festuca pratensis* / J. King, I.P. Armstead, I.S. Donnison et.al. – Genetics. – 2002. – Vol. 161. – P. 315–324.
- Saha, M.C. An SSR- and AFLP-based genetic map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) / M.C. Saha, R. Mian, J.C. Zwonitzer et al. – Theoretical and Applied Genetics. – 2005. – № 110. – P. 323–336.
- Sato, S. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pretense* L.) / S. Sato, S. Isobe, E. Asamizu et al. – DNA research – 2005. – № 12. – P. 301–364.
- Semerikov, V.L. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals / V.L. Semerikov, A.Y. Belyaev, M. Lascoux. – Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – № 106. – P. 127–132.

LIST OF SOURCES

- Bekhtin, N.S. Festulolium (Festulolium). V kn.: Osnovnye vidy i sorta kormovykh kul'tur / N.S. Bekhtin. — M.: Nauka, 2015. — s. 207–210.
- Bureeva, N.E. Mnogomernyj statisticheskij analiz s ispol'zovaniem PPP "Statistica" / N.E. Bureeva. — Nizhnij Novgorod, 2007. — 114 s.
- Dzyubenko, N.I. Genetika diploidnoj i tetraploidnoj lyucerny. V sb.: Geneticheskie kollekcii rastenij / N.I. Dzyubenko, E.A. Dzyubenko. — Novosibirsk. — 1993. — S. 87–124.
- Zhuchenko, A.A. Ekologicheskaya genetika kul'turnykh rastenij / A.A. Zhuchenko. — Kishinev: "Shtiinca". — 1980. — 588 s.
- Reter, K. Mezhdunarodnyj soyuz po ohrane selekcionnykh dostizhenij UPOV. Organizaciya semenovodstva — osnova polucheniya vysokih urozhaev i vysokokachestvennoj produkcii s.-h. kul'tur / K. Reter. — Pyatigorsk. — 2002.
- Konarev, A.A. Belki semyan kak markery v reshenii problem geneticheskikh resursov rastenij, selekcii i semenovodstva / A.A. Konarev, V.G. Konarev, N.K. Gubareva i dr. — Citologiya i genetika. — 2000. — T. 34. — S. 91–104.
- Novoselov, M.Yu. Klever lugovoj (Trifolium pretense L.). V kn.: Osnovnye vidy i sorta kormovykh kul'tur / M.Yu. Novoselov. — M.: Nauka, 2015. — S. 22–73.
- Pomorcev, A.A. Identifikaciya i ocenka sortovoj chistoty semyan yachmenya metodom elektroforeticheskogo analiza zapasnykh belkov zerna / A.A. Pomorcev, E.V. Lyalina. — M.: MSKHA, 2003. — S. 85.
- Serebrovskij, A.S. Geneticheskij analiz / A.S. Serebrovskij. — M.: Nauka, 1970. — 342 s.
- Sozinov, A.A. Polimorfizm gliadina i vozmozhnosti ego ispol'zovaniya. Rastitel'nye belki i ih biosintez / A.A. Sozinov, F.A. Poperelya. — M.: Nauka, 1975. — S. 65–76.
- Hlestkina, E.K. Molekulyarnye markery v geneticheskikh issledovaniyah i selekcii / E.K. Hlestkina. — Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. — 2013. — Tom 17. — № 4/2. — S. 1044–1054.
- Chesnokov, Yu.V. Geneticheskie resursy rastenij i uskorenije selekcionnogo processa / Yu.V. Chesnokov, V.M. Kosolapov. — M., 2016. — 171 s.
- Chesnokov, Yu.V. Molekulyarnye markery v populyacionnoj genetike i selekcii kul'turnykh rastenij / Yu.V. Chesnokov, N.V. Kocherin, V.M. Kosolapov. — M.: OOO «Ugreshskaya Tipografiya». — 2019. — 200 s.
- Alm, V. A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds) and comparative mapping with other Poaceae species / V. Alm, C. Fang, C.S. Busso et al. — Theoretical and Applied Genetics. — 2003. — R. 25–40.
- Barrett, B. A microsatellite map of white clover (*Trifolium repens* L.) / B. Barrett, A. Griffiths, M. Screiber et al. — Theoretical and Applied Genetics. — 2004. — R. 596–608.
- Brouwer, D.J. A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) / D.J. Brouwer, T.C. Osborn. — Theor Appl Genet. — 1999. — R. 1194–1200.
- Crossa, J. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops / J. Crossa. — Theor Appl Genet. — 1989. — R. 153–161.
- Divan, N. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa / N. Divan, J.H. Bouton, G. Kochert, P.B. Cregan. — Theoretical and Applied Genetics. — 2000. — R. 165–172.
- Herrmann, D. QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pretense* L.) / D. Herrmann B. Boller, B. Studer et.al. — Theor Appl Genet. — 2006. — R. 536–545.
- Hirakawa, H. Genome-Wide SNP Genotyping to Infer the Effects on Gene Functions in Tomato / H. Hirakawa, K. Shirasawa, A. Ohya et. al. — DNA Research. — 2013. — № 20. — R. 221–233.
- Inoue, M. Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers / M. Inoue, Z.S. Gao, M. Hirata et al. — Genome. — 2004. — № 47. — R. 57–65.
- Isobe, S. Genome-wide SNP marker development and QTL identification for genomic selection in red clover / S. Isobe, B. Boller, I. Klimenko et.al. In: Barth S and Milbourne D (eds) Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement. Springer Science+Business Media, New York. — 2012. — R. 29–35.
- Isobe, S. First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pretense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm / S. Isobe, I. Klimenko, S. Ivashuta et al. — Theoretical and Applied Genetics. — 2003. — № 108. — R. 105–112.
- Jaccoud, D. Diversity arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping / D. Jaccoud, K. Peng, D. Feinstein, A. Kilian. — Nucl. Acids Res. — 2001. — V. 29(4). — R. 25–31.
- Jones, E.S. An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) / E.S. Jones, M.D. Dupal, J.L. Dumsday et al. — Theoretical and Applied Genetics. — 2002. — № 105. — R. 577–584.
- Jones, E.S. An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L.) / E.S. Jones, L.J. Hughes, M.C. Drayton et al. — Plant Science. — 2003. — № 165. — R. 531–539.
- Kaló, P. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*) / P. Kaló, G. Endre, L. Zimányi et.al. — Theor Appl Genet. — 2000. — № 100. — R. 641–657.
- King, J. Physical and Genetic Mapping in the Grasses *Lolium perenne* and *Festuca pratensis* / J. King, I.P. Armstead, I.S. Donnison et.al. — Genetics. — 2002. — Vol. 161. — R. 315–324.
- Saha, M.C. An SSR- and AFLP-based genetic map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) / M.C. Saha, R. Mian, J.C. Zwonitzer et al. — Theoretical and Applied Genetics. — 2005. — № 110. — R. 323–336.
- Sato, S. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pretense* L.) / S. Sato, S. Isobe, E. Asamizu et al. — DNA research — 2005. — № 12. — R. 301–364.
- Semerikov, V.L. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pretense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals / V.L. Semerikov, A.Y. Belyaev, M. Lascoux. — Theoretical and Applied Genetics. — 2002. — № 106. — R. 127–132.