МАСЛИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 1 (142-143), 2010

П. П. Фисенко[1],
кандидат сельскохозяйственных наук
А. В. Бабикова[2],
аспирантка
О. С. Ефремова[1],
младший научный сотрудник

[1]ГНУ Приморский НИИСХ Россельхозакадемии
тел.: 8(4234)39-27-19, факс 8(4234)39-24-00
e-mail: fe.smc_rf@mail.ru

[2]Биолого-почвенный институт ДВО РАН
690000 г. Владивосток, ул. Проспект 100-летия Владивостока, 159
тел.: 8(4232)34-83-86

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ* И ДЛИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СОМАКЛОНОВ СОИ

Ключевые слова: соя, сомаклоны, уровень генетической изменчивости, виды ионизирующего излучения

УДК 575.174.015.3:633.853.52+581.143.5

Введение. Новая возможность расширения генетического разнообразия в селекции открылась с организацией биотехнологических методов исследований. Полученные на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* растения-регенеранты, как правило, в той или иной степени отличаются от исходных форм и могут являться исходным материалом для традиционной селекции данной культуры, поскольку они представляют собой сомаклональные варианты [1].

Использование сомаклональной изменчивости в сочетании с отбором позволило О.А. Рожанской создать ценный селекционный материал сои, ярового рапса, нута, эспарцета, люцерны с признаками скороспелости, повышенной семенной и кормовой продуктивности, улучшенного химического состава, устойчивости к неблагоприятным гидротермическим условиям и патогенам [2].

В Казахстане группой ученых (С.В. Дидоренко, Ю.Г. Карягиным и Б.М. Жанысбаевым) сомаклональная изменчивость применяется как источник генетического разнообразия в создании новых форм сои [3].

В Приморском НИИСХ коллективом двух лабораторий: биотехнологии и селекции сои – с использованием метода культуры тканей создан первый в России сорт сои Приморская 81, который с 2004 г. районирован [4].

Важным моментом в технологии регенерации путем органогенеза являются условия, способствующие возникновению генетических изменений в рекомбинантах. По данным M.S. Wright и др. [5], дополнительные почки в пазухах семядольного узла сои закладываются de novo под влиянием 6-бензиламинопурина (БАП). R.A. Graybosch, M.E. Edge и X. Delannay [6] стимулировали побегообразование из вновь образовавшихся и ранее существовавших меристематических участков проводящей ткани семядольного узла на среде с БАП. Среди полученных линий исследователи наблюдали вариабильность по урожайности и другим признакам. A.H. Freytag с коллегами [7] изучали процесс регенерации растений сои из семядольного узла эксплантов эпикотиля. Авторы выявили генотипы, в потомстве регенерантов у которых отклонения от нормы появлялись чаще.

По мнению Рожанской [8], изоляция семядольных узлов на стадии развития проростка нарушает контролирующее влияние организма, приводит к неорганизованной пролиферации ткани и способствует возникновению генетических изменений у адвентивных почек, формирующихся в семядольных пазухах изолированных узлов.

Величины вариабельности признаков у регенерантов сои недостаточно высокие, поэтому с целью повышения генетического разнообразия мы использовали в качестве исходных эксплантов ткани мутантов. Существует много приёмов получения индуцированных мутаций. В основе их лежит воздействие на организм различными физическими и химическими факторами, называемыми мутагенами.

Действуя ими на растения, можно резко повысить их мутационную изменчивость. В селекционной работе используются любые виды ионизирующих излучений. Наиболее широко применяют рентгеновское, гамма- и нейтронное излучения. [9].

Наряду с этим существует вопрос о влиянии длительности культивирования на уровень генетической изменчивости сомаклонов сои. Как считают некоторые исследователи, уровень изменчивости сомаклонов повышается при более продолжительном культивировании ткани. Рядом авторов [10, 11] определено, что чем длительнее эксплант находится на питательной среде, тем больше вероятность получить регенеранты, отличающиеся от исходных форм.

Однако по данным M.S. Wright и др. [5], проводивших гистологический анализ пазух семядольного узла у исследуемых ими растений сои, через 6 дней после прорастания семян на среде с БАП базальные участки эпикотиля и семядолей, примыкающие к придаточным почкам, становятся меристематическими зонами. В эпидермальных и субэпидермальных тканях формируются прорегенеративные очаги, способные к морфогенезу, возникают новообразования – дополнительные адвентивные почки.

На основании вышеизложенных результатов и мнений ученых, нами была поставлена задача выяснить, оказывают ли влияние различные виды ионизирующего излучения и длительность культивирования на уровень генетической изменчивости сомаклонов сои.

Материалы и методы. Исследования проводились в лаборатории биотехнологии Приморского НИИСХ, в качестве исходных форм использовали сорт Ходсон и его мутанты. Для получения мутантов сухие семена обрабатывали в Институте цитологии и генетики СО РАН следующими электромагнитными излучениями: красным когерентным светом оптического квантового гелий-неонового генератора (лазера) с длиной волны 632,8 нм при плотности потока мощностью 0,08 мВт/см^2 в течение 15 мин; γ-излучением кобальтовой пушки в дозе 50 грей.

В качестве первичных эксплантов использовали семядольные узлы стерильных микрорастений. Для получения последних зрелые семена стерилизовали в разделительной воронке концентрированной серной кислотой (H_2SO_4) в течение 2-х мин, с последующей многократной отмывкой стерильной дистиллированной водой согласно методике, предложенной А.М. Смирновым, в изложении В.А. Тильбы [12].

Регенерацию осуществляли по рекомендации M.S.Wright и M.G. Carnes [5].

Семядольные узлы культивировали на питательной среде 1/2MS + БАП (1,13 и 0,23 мг/л) до 60 дней. Адвентивные побеги, образовавшиеся *de novo* через 7-14 дней (R_0-1) и через 31-60 дней (R_0-2), снимали и помещали на среду 1/2MS+ИМК (0,5 мг/л), не содержащую БАП, для дальнейшего роста и развития.

Степень поражения (%) грибными патогенами: септориозом (Septoria glycines), церкоспорозом (Cercospora sojina), пероноспорозом (Peronospora manshurica) – определяли при искусственном заражении листовой поверхности на жестком инфекционном фоне совместно с сотрудниками лаборатории селекции сои ПримНИИСХ по методике ВИР [13] и согласно Международному классификатору [14].

Биохимический состав семян исходных форм и регенерантных линий проведен во ВНИИ сои на ИК-сканере Nir-42 по следующим показателям: аминокислоты (аргинин, валин, пролин, глютамин, лизин, гистидин, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, аланин+глицин, треанин, серин, аспарагиновая кислота), жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая), минеральные элементы (K, Ca, P, Mg), белок, масло. Оценка сомаклонов по химическому составу дана на основании классификатора [14].

Регенеранты третьего поколения выращивали в полевых условиях в соответствии с принятой для Приморского края агротехникой.

Статистическая обработка материала проведена методом дисперсионного анализа в изложении Б.А. Доспехова [15].

Для проведения генетического анализа все исследуемые образцы были разделены на три группы, каждая из которых была представлена растениями исходной формы и ее сомаклонами. Первая группа – сорт Ходсон и сомаклоны R_0-1-690, R_0-1-691, R_0-1-699, R_0-1-717, R_0-1-722 и R_0-2-617. Вторая группа – популяция Ходсон-*L*, растения которой получены из облученных лазером семян, и сомаклоны R_0-1-731, R_0-2-616 и R_0-2-623. Третья группа – популяция Ходсон-γ, растения которой получены из облученных γ-излучением семян, и сомаклоны R_0-1-651, R_0-1-688, R_0-1-715 и R_0-2-615.

Выделение ДНК и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в БПИ ДВО РАН, как было описано нами ранее [16]. Для анализа полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК 52 образцов использовали 12 праймеров, комплементарных к микросателлитным повторам (табл. 1). При оценке электрофореграмм учитывали только четко видимые и воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты (ампликоны). Для каждого из праймеров были составлены бинарные матрицы, в которых присутствие или отсутствие в спектре фрагментов с одинаковыми молекулярными массами обозначали как "1" или "0". Разная интенсивность полос одинаковых по размеру ампликонов у сравниваемых образцов не учитывалась. Для определения длины фрагментов использовали маркер молекулярных масс – EcoRI + HindIII-рестрикты ДНК фага лямбда (Fermentas, Литва).

Таблица 1 – ***Праймеры, используемые в данной работе***

Код праймера	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Код праймера	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
пр812	$(GA)_8T$	прС1	$(AGC)_6T$
пр825	$(AC)_8T$	прС3	$(AGC)_6C$
пр840	$(GA)_8$(CT) T	прС4	(AGC)6G
пр842	$(GA)_8$(CT)G	прС5	$(TCG)_6G$
пр888	(CGT) (ACT) (CGT) $(CA)_7$	прS1	$(CA)_8TG$
пр889	(AGT) (CGT) (AGT) $(AC)_7$	прS10	$(GA)_8TC$

Объединенная бинарная матрица была использована для расчета частот фрагментов, доли полиморфных локусов (*P*), генного разнообразия (*H*) и индекса Шеннона (*SI*) с помощью пакета программ POPGENE [17]. Для определения генетических расстояний Нея-Ли (D_N) и построения дендрограммы генетических взаимоотношений между отдельными растениями на основе значений D_N посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) с бутстрэпными оценками степени надежности порядка ветвления (1000 реплик) использовали пакет программ TREECON [18, 19].

Результаты и обсуждения. В результате ISSR-анализа выявлено 183 фрагмента, из них 164 были полиморфными. Популяция Ходсон-γ характеризовалась наибольшим уровнем полиморфизма и значениями генного разнообразия и индекса Шеннона, чем все другие исследуемые популяции исходных форм (табл. 2).

Таблица 2 – ***Основные показатели генетической изменчивости исходных форм сои***

Сорт/популяция	Доля полиморфных локусов (*P*, %)	Генное разнообразие (*H*)	Индекс Шеннона (*SI*)
Ходсон	12,57	0,041	0,062
Ходсон-*L*	10,93	0,040	0,062
Ходсон-γ	18,03	0,063	0,099

Генетические дистанции (D_N) между парами анализируемых образцов (популяций) варьировали, достигая 10-кратного различия (табл. 3). Наименьшее значение D_N (0,0642) отмечено между исходными популяциями Ходсон-γ и Ходсон-*L*, наибольшее (0,6043) – между сомаклоном R_0-2-616 популяции Ходсон-*L* и сомаклоном R_0-1-691 сорта Ходсон.

Таблица 3 – ***Матрица значений генетических различий (D_N) между исследуемыми образцами сои, рассчитанных по 183 ISSR-фрагментам***

Образец (популяция)	Ходсон (n=10)	R_0-1-690 (Ходсон)	R_0-1-691 (Ходсон)	R_0-1-699 (Ходсон)	R_0-1-717 (Ходсон)	R_0-1-722 (Ходсон)	R_0-2-617 (Ходсон)	Ходсон L (n=13)	R_0-1-731 (Ходсон-L)	R_0-2-616 (Ходсон-L)	R_0-2-623 (Ходсон-L)	Ходсон γ (n=16)	R_0-1-651 (Ходсон-γ)	R_0-1-688 (Ходсон-γ)	R_0-1-715 (Ходсон-γ)	R_0-2-615 (Ходсон-γ)
Ходсон (n=10)	*****															
R_0-1-690 (Ходсон)	0,179	*****														
R_0-1-691 (Ходсон)	0,545	0,447	*****													
R_0-1-699 (Ходсон)	0,337	0,261	0,381	*****												
R_0-1-717 (Ходсон)	0,211	0,141	0,465	0,206	*****											
R_0-1-722 (Ходсон)	0,165	0,092	0,414	0,247	0,116	*****										
R_0-2-617 (Ходсон)	0,199	0,141	0,518	0,319	0,166	0,153	*****									
Ходсон L (n=13)	0,531	0,469	0,569	0,319	0,443	0,477	0,564	*****								
R_0-1-731 (Ходсон-L)	0,210	0,172	0,509	0,254	0,134	0,160	0,186	0,439	*****							
R_0-2-616 (Ходсон-L)	0,264	0,212	0,604	0,312	0,172	0,212	0,186	0,534	0,141	*****						
R_0-2-623 (Ходсон-L)	0,225	0,206	0,594	0,365	0,219	0,192	0,179	0,524	0,172	0,086	*****					
Ходсон γ (n=16)	0,548	0,524	0,594	0,332	0,455	0,508	0,590	0,064	0,455	0,560	0,557	*****				
R_0-1-651 (Ходсон-γ)	0,272	0,172	0,358	0,199	0,147	0,147	0,226	0,365	0,166	0,247	0,268	0,374	*****			
R_0-1-688 (Ходсон-γ)	0,217	0,128	0,334	0,179	0,116	0,104	0,206	0,446	0,160	0,240	0,275	0,459	0,110	*****		
R_0-1-715 (Ходсон-γ)	0,295	0,186	0,456	0,268	0,147	0,1725	0,240	0,339	0,166	0,219	0,254	0,368	0,141	0,160	*****	
R_0-2-615 (Ходсон-γ)	0,257	0,172	0,509	0,297	0,199	0,199	0,212	0,536	0,166	0,166	0,226	0,565	0,261	0,212	0,247	*****

Наибольшими генетическими отличиями от исходной формы характеризуются сомаклоны R_0-1-691 и R_0-1-699 в первой группе, R_0-2-616 и R_0-2-623 – во второй и R_0-2-615 – в третьей (табл. 4). Однако уровень генетической изменчивости исследованных сомаклонов не зависит от длительности культивирования первичных эксплантов на питательной среде.

Таблица 4 – ***Значения генетических дистанций между сомаклонами и выборками их исходных форм и длительность культивирования сомаклонов in vitro***

Сомаклон	Длительность культивирования *in vitro*, сут.	Генетические дистанции (D_N)		
		Ходсон	Ходсон-*L*	Ходсон-γ
R_0-1-690 (Ходсон)	7-14	0,1789	0,4695	0,5235
R_0-1-691 (Ходсон)	7-14	0,5451	0,5694	0,5937
R_0-1-699 (Ходсон)	7-14	0,3369	0,3188	0,3324
R_0-1-717 (Ходсон)	7-14	0,2108	0,4433	0,4547
R_0-1-722 (Ходсон)	7-14	0,1646	0,4772	0,5084
R_0-2-617 (Ходсон)	32	0,1993	0,5645	0,5904
R_0-1-731 (Ходсон-*L*)	7-14	0,2098	0,4393	0,4550
R_0-2-616 (Ходсон-*L*)	48	0,2643	0,5340	0,5596
R_0-2-623 (Ходсон-*L*)	57	0,2249	0,5245	0,5571
R_0-1-651 (Ходсон-γ)	7-14	0,2722	0,3650	0,3735
R_0-1-688 (Ходсон-γ)	7-14	0,2173	0,4456	0,4589
R_0-1-715 (Ходсон-γ)	7-14	0,2952	0,3392	0,3678
R_0-2-615 (Ходсон-γ)	31	0,2566	0,5355	0,5646

Длительность культивирования семядольных узлов сорта Ходсон не влияет на генетическую изменчивость его сомаклонов. В то время, как для возникновения генетической дифференциации сомаклонов популяций Ходсон-*L* и Ходсон-γ от их исходных форм, вероятно, необходимо более длительное культивирование (см. табл. 4).

К третьему поколению из числа изучаемых нами сомаклонов были исключены стерильные, слабофертильные формы с нежизнеспособными семенами, а также непродуктивные и характеризующиеся другими отрицательными признаками (R_0-1-691, R_0-1-699, R_0-1-690, R_0-2-617, R_0-1-651 и R_0-1-688). Среди оставшихся сомаклонов по биохимическим показателям (содержание белка, гистидина, линолевой и олеиновой кислот) исходную форму превышали: сомаклон R617 первой группы (D_N 0,1993), все сомаклональные линии второй группы и регенерант R615 третьей группы (D_N 0,5646) (табл. 5).

Кроме того, сомаклон R623 второй группы (D_N 0,5245) обладал высоким уровнем устойчивости к церкоспорозу, а регенерант R715 третьей группы (D_N 0,3678) характеризовался высоким уровнем устойчивости к пероноспорозу и церкоспорозу.

Таблица 5 – ***Сомаклональные линии сои третьего поколения, имеющие преимущество перед исходными формами по некоторым признакам***

Исходная форма (и.ф.), выделившаяся сомаклональная линия (R)	Продуктивность, г/раст.	Содержание в семенах масла, %	Содержание кислоты, % от общего количества масла в семенах			Содержание белка в семенах, %	Содержание гистидина, от общего количества аминокислот, %	Степень поражения патогенами листовой поверхности, %		
			линолевая	линоленовая	олеиновая			септориоз	церкоспороз	пероноспороз
Ходсон (и.ф.)	7,6	20,2	51,5	4,9	6,5	38,5	8,3	62,5	68,8	82,5
R_{617}	9,5*	20,5	52,6*	3,7	10,4*	38,4	10,2*	43,8	52,5	57,5
Ходсон-L (и.ф.)	7,5	21,2	51,9	4,8	4,5	37,4	10,7	50,0	57,5	70,0
R_{616}	6,3	21,6	52,3	5,0	4,8	39,3*	11,9*	41,3	29,8*	56,3
R_{623}	6,1	20,0	52,4	4,4	8,6	39,2*	10,3	35,0*	24,8*	57,5
R_{731}	8,2	21,5	51,9	5,4	4,3	37,6	11,9*	41,3	37,5	71,3
Ходсон-γ (и.ф.)	7,7	20,5	52,2	5,5	9,0	37,7	10,3	41,3	52,5	58,8
R_{615}	6,6	20,0	52,7	3,4*	10,7*	38,1*	9,6	40,0	47,5	58,8
R_{715}	6,9	20,3	51,7	4,7	6,5	38,1*	10,9	42,5	33,8*	50,0*
Примечание: * – достоверно превосходит исходную форму на 5% -ном уровне										

Следует отметить, что регенерантные формы, имеющие наибольшие генетические отличия от исходных форм, не всегда выделяются по биохимическим показателям, тогда как сомаклоны со средним (R715) и низким (R617) уровнем генетической изменчивости могут превышать исходную форму по селекционным признакам. В результате исследований в третьем поколении были выделены сомаклоны: R616, R623 и R617, которые рекомендованы селекционерам в качестве исходного материала для селекции сои в Приморском крае.

На рисунке представлена некорневая дендрограмма генетических взаимоотношений между исследуемыми образцами. Анализируемые растения распределились в два кластера: первый объединяет с высокой степенью достоверности (индекс бутстрепа 100 %) все растения популяций Ходсон-*L* и Ходсон-γ, которые группируются соответственно их происхождению; второй объединяет все растения исходного сорта Ходсон (индекс бутстрепа 100 %) и все исследуемые сомаклоны, за исключением двух (R_0-1-691 и R_0-1-699). Эти два сомаклона сорта Ходсон имеют наибольшие генетические отличия как от исходной формы, так и от всех других.

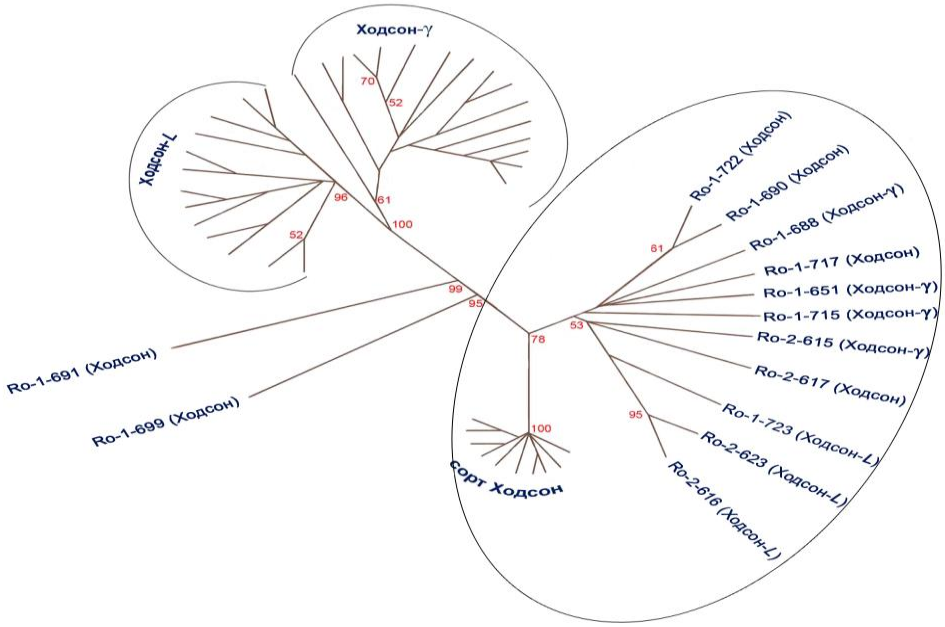

Рисунок – Некорневая дендрограмма генетических взаимоотношений между растениями сорта Ходсон, популяций Ходсон-γ и Ходсон-*L* и их сомаклонами.

Выводы. В результате проведенных исследований выявлено, что растения, выращенные из ткани обработанных различными видами облучения семян сорта Ходсон, генетически значительно отличаются от растений, выращенных из необработанных семян. Среди сомаклонов популяций Ходсон-γ и Ходсон-*L* выделены регенеранты, характеризующиеся повышенным содержанием белка, гистидина, линолевой и олеиновой кислот, а также более высокой устойчивостью к церкоспорозу и септориозу по сравнению с их исходными формами. Уровень генетической изменчивости сомаклонов не зависит от длительности культивирования первичных эксплантов на питательной среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ДВО РАН №05-II-СХ-06-002С "Методы биотехнологии в селекции сои и риса".

Список литературы

1. *Larkin, P.J.* Somaclonal variation –a novel source of variability from cell cultures for plant improvement/ P.J. Larkin, P.J., W.R. Scowcroft // Theor . Appl. Genet. –1981. – Vol. 60. – P.197-214.

2. *Рожанская, О.А.* Создание исходного материала для селекции кормовых культур в условиях Сибири с помощью методов биотехнологии: автореф. дис…доктора биол. наук: 06.01.05 / О.А. Рожанская. – Санкт-Петербург, 2007. – 35 с.

3. *Дидоренко, С.В.* Состояние и перспективы развития селекции зернобобовых культур на юго-востоке Казахстана // С.В. Дидоренко, Ю.Г. Карягин, Б.М. Жанысбаев // Кормопроизводство. – 2008. – № 5. – С.19-21.

4. *Ващенко, А.П.* Итоги научных исследований по сое за 2004-2007 гг. в Приморском НИИСХ и задачи НИР на последующий период // Современные проблемы селекции и технологии возделывания сои: сб. статей 2-й Междунар. конф. по сое, Россия, Краснодар, 9-10 октября 2008 г. РАСХН, ВНИИМК. – Краснодар, 2008. – С.150-154.

5. *Wright, M.S.* Plant regeneration from tissue cuitures of soybean by organogenesis / M.S. Wright, M.G. Garnes et al. // Cell. Cult. Som. Cell. Genenet. Plants. – 1986. – Vol. 3. – P.111. –119.

6. *Graybosch, R.A.* Somaclonal variation in soybean. Plants regenerated from the Cotyledonary node tissue culture system / R.A. Graybosch, M.E. Edge, X. Delannay // Crop Science. – 1987. – Vol. 27. – № 4. – P. 803-806.

7. *Freytag, A.H.* Somaclonal variation in soybean plants regenerated from culture / A.H. Freytag, A.P. Rao-Arelli, S.C. Anand et al. // Plant Cell. Rep. – 1989. – Vol. 8. – N 4. – P. 199-202.

8. *Рожанская, О.А.* Соя и нут в Сибири: культура тканей, сомаклоны, мутанты. – Новосибирск : Юпитер, 2005. – 155 с.

9. *Гужов, Ю.Л.* Селекция и семеноводство культурных растений / Ю.Л. Гужов, А.Фукс, П. Валичек; под ред. Ю.Л. Гужова. – М.: Агропромиздат, 1991. – 463 с.

10. Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая шк., 1998. – 416 с.

11. *Mc Coy, T.J.* Cytogenetic and lysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; High frequency of partial chromosome loss / T.J. Mc Coy, R.L. Phillips, H.W. Rines // Canad. J. Genet. and Cytol. – 1982. – Vol. 24. – P. 37-50.

12. *Тильба, В.А.* К вопросу определения численности клубеньковых бактерий сои в почве // Микробиологические и биохимические исследования почв: Конф. по методам микробиол. и биохим. исследований почв. 28-31 окт. 1969 г., Киев / ВАСХНИЛ [и др.]. – Киев. – Урожай, 1971. – С. 51-55.

13. Международный классификатор СЭВ рода Glycine Weld / [сост. СССР – Л.Щелко, Г.Седова. В.Корнейчук; ЧСФР – Л.Пастухова, Г.Синский, П.Гофирек и др.]; ВАСХНИЛ, ВИР. – Л., 1990. – 46 с.

14. Методические указания по изучению устойчивости сои к грибным болезням / [сост. Н.И. Корсаков, А.М. Овчинникова, В.И. Мизева]; ВАСХНИЛ, ВИР. – Л., 1979. – 46 с.

15. *Доспехов, Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статист, обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

16. *Козыренко, М.М.* Анализ генетического разнообразия сортов и сомаклональных линий культурной сои (Glycine max (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) / М.М. Козыренко, П.П. Фисенко, Е.В. Артюкова // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С.3-13.

17. Nei, M., Li, W.H. Mathematical model for studying genetics variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – 76. – P. 5269-5273.

18. *Miller M.P.* Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Computer software distributed by author.

19. *Van de Peer Y.* TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Applic. Biosci. –1994. – V. 10. – P. 569-570.