

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.21:57.085.23:633.11:633.14
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-199-208>

Поступило в редакцию 20.02.2019
Received 20.02.2019

**Е. В. Лагуновская¹, А. А. Буракова¹, В. Н. Буштевич², В. И. Сакович¹,
В. А. Лемеш¹, академик С. И. Гриб²**

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
²Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию,
Жодино, Республика Беларусь

АНАЛИЗ МЕЖЛИНЕЙНОГО ПОЛИМОРФИЗМА И СТЕПЕНИ ГОМОЗИГОТНОСТИ ЛИНИЙ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ТРИТИКАЛЕ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Аннотация. Дана оценка степени полиморфизма линий удвоенных гаплоидов гексаплоидного тритикале, полученных методом индуцированного андрогенеза *in vitro* на основе гибридов F1 и F2 гексаплоидного тритикале ярового и озимого типов развития. С использованием семи маркеров к микросателлитным локусам, расположенным на хромосомах А- (*Xgwm186*, *Xgwm291*, *Xgwm595*) и В- (*Xgwm371*, *Xgwm540*, *Xgwm554*, *Xgwm234*) генома, изучен полиморфизм у 38 линий удвоенных гаплоидов и проведена оценка степени гомозиготности исследуемых линий. Полученные результаты свидетельствуют о наличии межлинейного полиморфизма по шести микросателлитным локусам. Обнаружено, что локус *Xgwm554* не является полиморфным у исследуемых линий удвоенных гаплоидов. Наибольший полиморфизм отмечался для локусов *Xgwm186*, *Xgwm291* и *Xgwm595*. По результатам кластерного анализа все исследованные линии распределились в три основных кластера, независимо от происхождения. Выделено восемь линий удвоенных гаплоидов, являющихся гетерозиготными как минимум по одному из исследуемых микросателлитных локусов. Показана возможность использования SSR-маркеров для оценки межлинейного полиморфизма и степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов тритикале, полученных методом индуцированного андрогенеза *in vitro*.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, полиморфизм, гексаплоидное тритикале, линии удвоенных гаплоидов, гомозиготность

Для цитирования: Анализ межлинейного полиморфизма и степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов тритикале с помощью микросателлитных маркеров / Е. В. Лагуновская [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 2. – С. 199–208. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-199-208>

**Alena V. Lagunovskaya¹, Aryna A. Buracova¹, Victor N. Bushtevich², Valiantsina I. Sakovich¹,
Valiantsina A. Lemesh¹, Academician Stanislau I. Gryb²**

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
²Research and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming,
Zhodino, Republic of Belarus

ANALYSIS OF THE INTRALINEAR POLYMORPHISM AND THE HOMOZYGOSITY RATE OF TRITICALE DOUBLED HAPLOID LINES BY MICROSATELLITE MARKERS

Abstract. We evaluated the rate of polymorphism of doubled haploid lines of hexaploid triticale obtained by the method of anther culture based on hybrids of spring and winter types. Using 7 SSR markers for the loci on the chromosomes A- (*Xgwm186*, *Xgwm291*, *Xgwm595*) and B- (*Xgwm371*, *Xgwm540*, *Xgwm554*, *Xgwm234*), polymorphism of 38 doubled haploid lines of hexaploid triticale was studied. Interlinear polymorphism along six microsatellite loci except the *Xgwm554* locus, which is not polymorphic in the studied doubled haploid lines, was revealed. The highest polymorphism was observed for the *Xgwm186*, *Xgwm291* and *Xgwm595* loci. The cluster analysis showed that all studied lines were divided into three main groups. The origin of the lines did not affect the distribution in groups. This confirms the influence of *in vitro* culture somaclonal variation. Eight lines of doubled haploids, which are heterozygous for one of the studied microsatellite loci, were identified. We showed the possibility of using SSR markers to assess interlinear polymorphism and the homozygosity rate in the triticale doubled haploid lines obtained by the method of induced androgenesis *in vitro*.

Keywords: molecular markers, polymorphism, hexaploid triticale, double haploid lines, homozygosity

For citation: Lagunovskaya A. V., Buracova A. A., Bushtevich V. N., Sakovich V. I., Lemesh V. A., Gryb S. I. Analysis of the intralinear polymorphism and the homozygosity rate of triticale doubled haploid lines by microsatellite markers. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 2, pp. 199–208 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-199-208>

Введение. Тритикале является одной из основных зернофуражных культур Республики Беларусь, посевные площади которой составляют около 450–500 тыс. га. Благодаря высокому потенциалу урожайности в сочетании с хорошей питательной ценностью, повышенной устойчивостью к болезням, меньшей требовательностью к почвенному плодородию, тритикале обеспечивает в республике 18–20 % валового сбора зерна [1]. Зерно тритикале в основном используется на фураж, а также представляет ценность в качестве технического сырья для крахмального и спиртового производства, перспективу для выпечки хлеба и кондитерских изделий.

Несмотря на достигнутые успехи тритикале, как и другие сельскохозяйственные культуры, требует совершенствования. Дальнейший прогресс в селекции тритикале предполагает ускоренное создание конкурентоспособных высокопродуктивных скороспелых сортов, характеризующихся устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессорам. Перспективным направлением для решения данных проблем является комплексное использование современных биотехнологических и молекулярно-генетических подходов в сочетании с классическими методами селекции тритикале. Использование методов индуцированного андрогенеза *in vitro* позволяет, с одной стороны, наиболее полно выявлять потенциальное генетическое разнообразие гибридной популяции, так как дает возможность сохранить генотипы, которые гибнут на разных стадиях формирования гамет, с другой – получить за короткий срок стабильные гомозиготные линии и исключить длительный процесс инбридинга, применяемый в классической селекции для закрепления желательных признаков [2; 3].

Удвоенные гаплоиды тритикале, полученные от гибридов первого или второго поколения, в культуре пыльников *in vitro* проявляют огромный спектр трансгрессивной изменчивости, вплоть до выщепления генотипов, сходных с одной из родительских форм. В случае, если они созданы на основе различающихся гибридных форм, можно получить рекомбинатные растения-регенеранты, несущие совершенно новые сочетания полезных генов [4]. Однако необходимо подтверждение гомозиготности получаемых в культуре пыльников растений-регенерантов, поскольку теоретически они могут брать начало не из гаметофитных, а из спорофитных тканей пыльника. Для этого используют морфологическую оценку созданных форм, однако более быстрые и точные результаты могут быть получены с использованием ДНК-маркеров. Применение молекулярных маркеров обеспечивает быстрый скрининг и адресный поиск интересующих генов и их комбинаций для отбора селекционно-ценных форм. Поскольку основу полиморфизма ДНК составляют нуклеотидные замены, вставки, делеции, а также изменение числа tandemных повторов, ДНК-маркеры широко используются для анализа однородности генетического материала, в частности для оценки гомозиготности линий удвоенных гаплоидов [5; 6]. Данный подход активно используется в практической селекции пшеницы [7] и ячменя [8], но для тритикале пока не получил широкого применения в связи с недостаточной эффективностью существующих методов получения линий удвоенных гаплоидов и ограниченным количеством разработанных молекулярных маркеров для данной культуры.

Цель работы – изучение генетического полиморфизма и определение степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов гексаплоидного тритикале с использованием SSR-маркеров.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследований служили 38 линий удвоенных гаплоидов гексаплоидного тритикале ярового и озимого типов развития, созданные методом культуры пыльников *in vitro* в лаборатории генетической и клеточной инженерии Института генетики и цитологии НАН Беларуси (на основе гибридов, полученных в лаборатории тритикале НППЦ НАН Беларуси по земледелию) в рамках мероприятия 5 подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии–2020» ГП «Наукоемкие технологии и техника» (табл. 1).

Выделение геномной ДНК у тритикале проводили из зерновок стандартным фенольно-хлороформным методом [9]. Анализ качества и количества выделенной ДНК проверяли в 1 %-ном агарозном геле, а также с использованием спектрофотометрии. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «Ultrospec 3300pro» (Amersham Biosciences).

Для анализа внутри- и межлинейного полиморфизма и оценки степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов были выбраны 7 микросателлитных локусов, находящихся на хромо-

Т а б л и ц а 1. Линии удвоенных гаплоидов тритикале, исследуемые с помощью SSR-маркеров

T a b l e 1. Triticale doubled haploid lines studied using SSR markers

Линия Line	Происхождение Origin	Тип развития Type of development
ДН-77-13-1р	Динаро Э-2551 × Рубин	Яровой
ДН-77-13-6р	Динаро Э-2551 × Рубин	– // –
ДН-77-13-9р	Динаро Э-2551 × Рубин	– // –
ДН-77-1-13	Динаро Э-2551 × Рубин	– // –
ДН-77-3-13	Динаро Э-2551 × Рубин	– // –
ДН-79-1-1-13	[(Матейко × Модерато) × Нети 414] × Нагано	– // –
ДН-80-1-13	Д-8038 × Нагано	– // –
ДН-80-2-13	Д-8038 × Нагано	– // –
ДН-80-3-13	Д-8038 × Нагано	– // –
ДН-80-4-13	Д-8038 × Нагано	– // –
ДН-81-1-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-81-2-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-81-3-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-81-5-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-81-6-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-81-3-1-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-81-3-2-13	Д-8038 × Рубин	– // –
ДН-82-1-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-3-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-4-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-5-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-6-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-3-2-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-4(1)-2-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-82-4(2)-3-13	Лотос × Рубин	– // –
ДН-83-1-13	Легінь харьковский × Рубин	– // –
ДН-84-1-13	№ 295 Э-2579 × СНД 492/02 Э-2266	– // –
ДН-84-1-13 (Г)	№ 295 Э-2579 × СНД 492/02 Э-2266	– // –
ДН-85-3-13	Садко × Рубин	– // –
ДН-85-4-13	Садко × Рубин	– // –
ДН-85-5-13	Садко × Рубин	– // –
ДН-85-7-13	Садко × Рубин	– // –
ДН-85-8-13	Садко × Рубин	– // –
ДН-97-2-1-15	F2 д.44/15 Г-1962 Нагано × МАН 17569/2642	– // –
ДН-97-2-2-15	F2 д.44/15 Г-1962 Нагано × МАН 17569/2642	– // –
ДН-99-6-2-15	F1 9/15 Г-2085 (Гренадо × Узор) × МАН 17569/2642	– // –
ДН-25-2-1-15	(тр. Aswo × пш. Капылянка F2) × тр. Aswo F6 44/8	Озимый
ДН-25-2-3-15	(тр. Aswo × пш. Капылянка F2) × тр. Aswo F6 44/8	– // –

сомах А- (*Xgwm186*, *Xgwm291*, *Xgwm595*) и В- (*Xgwm371*, *Xgwm540*, *Xgwm554*, *Xgwm234*) генома. Последовательности праймеров подбирали с использованием базы данных GrainGenes [10]. ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем из расчета на одну реакцию: MgCl₂ – 2 мМ, прямого флуоресцентно-меченного и обратного праймеров к одному из маркеров – по 0,1 пМ, дНТФ –

80 мкМ, 1 единицу Taq полимеразы в инкубационном буфере, деионизированную стерильную воду – 13,7 мкл. Концентрация геномной ДНК составляла 80 нг на 25 мкл. Температуру отжига выбирали в зависимости от последовательности праймера: 59 °С для праймера *Xgwm186*, 64 °С для праймеров *Xgwm595*, *Xgwm291*, *Xgwm371*, 57 °С для праймеров *Xgwm540*, *Xgwm554*.

Для получения анализируемых фрагментов проводили ПЦР с мечеными праймерами к выбранным локусам: в каждой паре «прямой–обратный праймер» один из праймеров метился флуоресцентным красителем. Использовались следующие флуоресцентные метки: R6G для праймеров к локусам *Xgwm186* и *Xgwm554*; FAM для праймеров к локусам *Xgwm291*, *Xgwm595* и *Xgwm540*; TAMRA для праймеров к локусам *Xgwm291* и *Xgwm234*. Для точного определения размеров фрагментов, получаемых в результате прохождения ПЦР, проводили фрагментный анализ с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Для проведения анализа в лунки платы вносили 1 мкл полученного ПЦР-продукта, 9 мкл деионизированного формамида и 0,5–1 мкл внутреннего стандарта Orange DNA Size Standard (MCLab), который использовался в качестве маркера молекулярного веса.

Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы GeneMapper v.5.0. Информация об аллельном составе SSR-локусов у изученных образцов была занесена в электронную базу данных в формате Microsoft Excel–2003. Наличие определенного амплифицированного фрагмента ДНК у данного генотипа обозначали цифрой «1», отсутствие – цифрой «0». Для расчета степени гетерозиготности использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel – GenAlEx 6.41 [11].

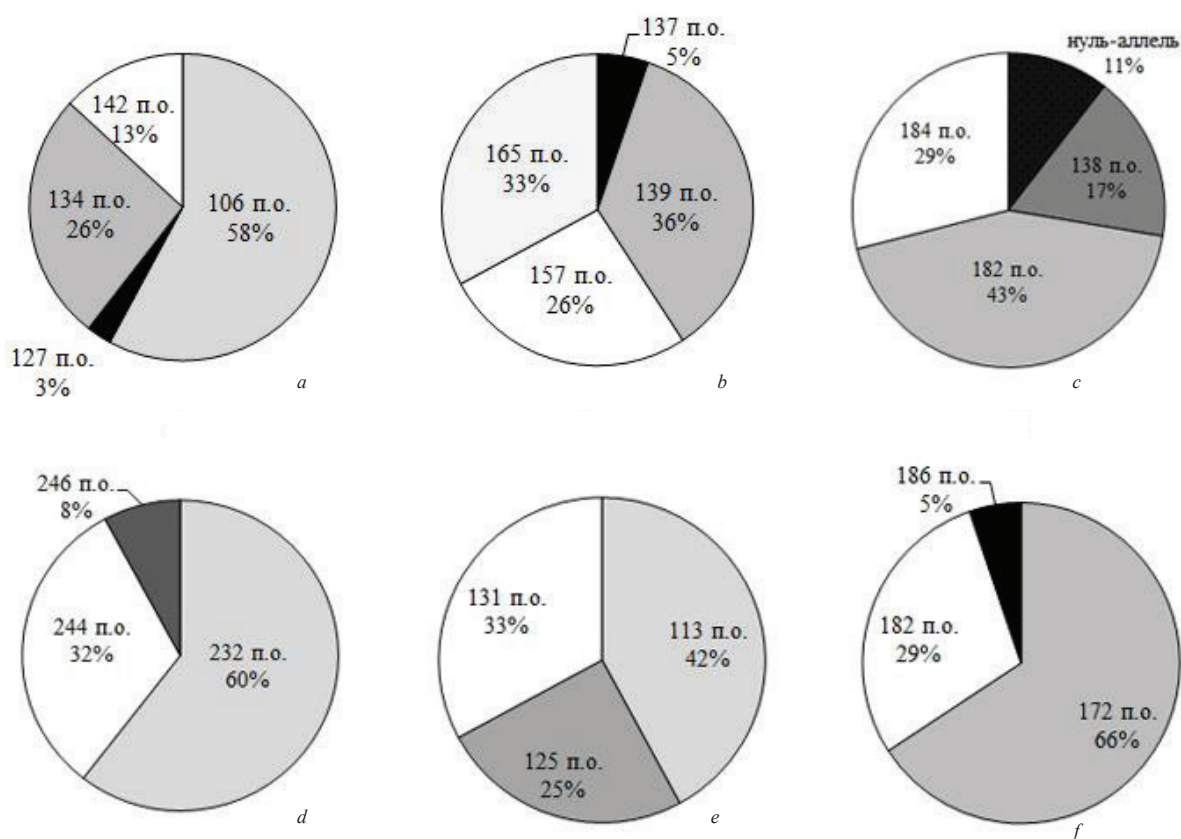


Рис. 1. Частота встречаемости различных аллелей микросателлитных локусов у линий удвоенных гаплоидов тритикале: *a* – локус *Xgwm186*, *b* – локус *Xgwm291*, *c* – локус *Xgwm595*, *d* – локус *Xgwm234*, *e* – локус *Xgwm540*, *f* – локус *Xgwm371*

Fig. 1. Frequency of occurrence of different alleles of microsatellite loci in the triticale doubled haploid lines: *a* – *Xgwm186* locus, *b* – *Xgwm291* locus, *c* – *Xgwm595* locus, *d* – *Xgwm234* locus, *e* – *Xgwm540* locus, *f* – *Xgwm371* locus

Для построения дендрограмм, демонстрирующих филогенетические отношения между изучаемыми линиями удвоенных гаплоидов, применяли метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением UPGMA [12]. Кластерный анализ исследуемой популяции линий удвоенных гаплоидов проводили с помощью программы DARwin5 (версия 6.0.018) [13].

Результаты и их обсуждение. Линии удвоенных гаплоидов являются эффективным материалом для улучшения генетического разнообразия, поскольку ценные сельскохозяйственные признаки могут сохраняться в последующих поколениях и усиливаться по сравнению с исходным генотипом [14]. Линии со стабильно сохраняющимися признаками могут служить исходным материалом для селекции новых сортов пшеницы.

Поскольку часто на основе одной гибридной комбинации (и даже на основе одного растения) создается несколько линий, необходимо убедиться, что они не являются генетически идентичными. Наиболее точную и быструю оценку наличия либо отсутствия межлинейного полиморфизма у исследуемых линий можно получить с использованием SSR-маркеров.

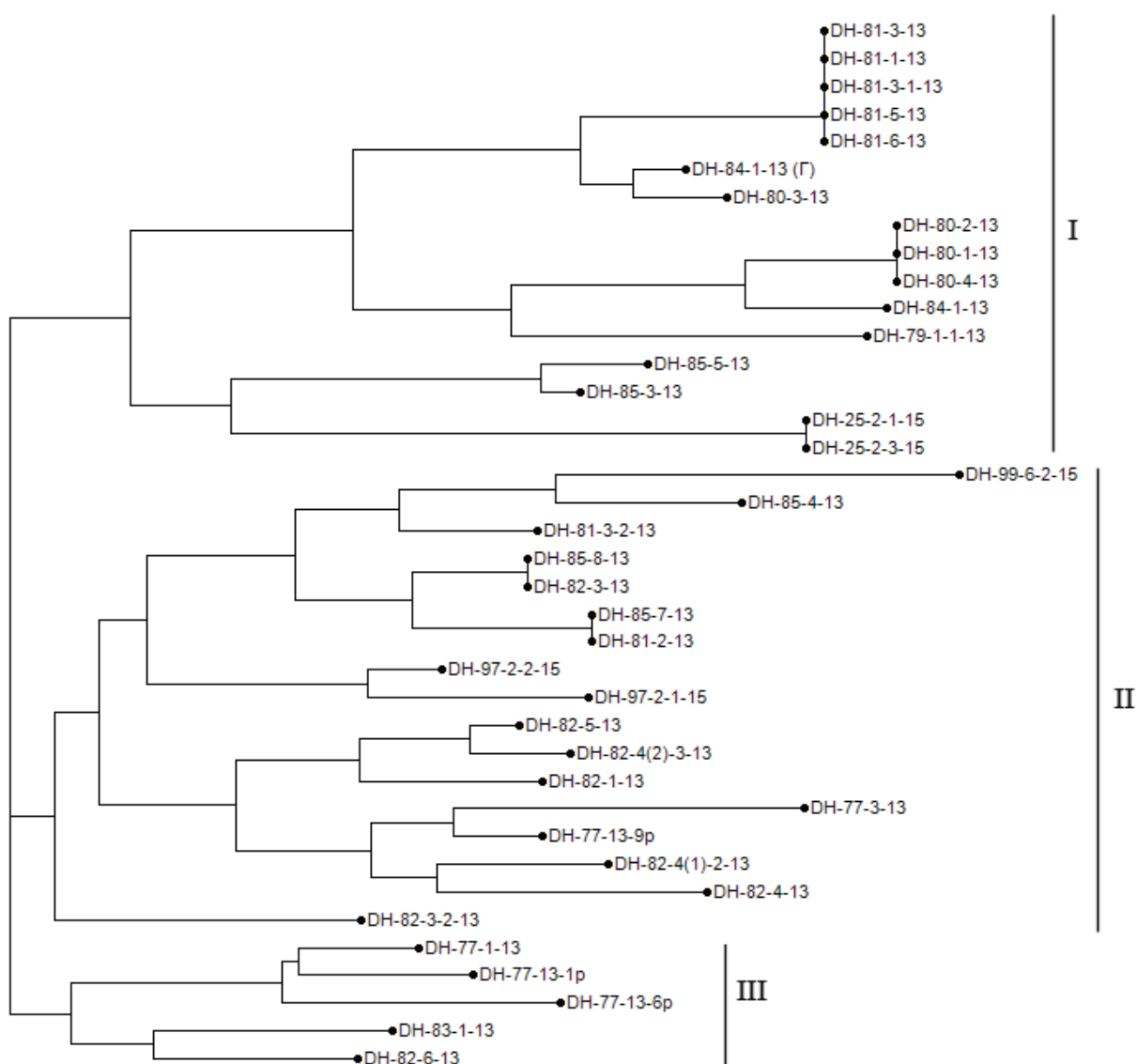


Рис. 2. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между линиями удвоенных гаплоидов тритикале, построенная на основании анализа генетических дистанций

Fig. 2. Dendrogram of phylogenetic interactions between triticale doubled haploid lines constructed on the basis of the genetic distance analysis

С помощью семи SSR-маркеров к микросателлитным локусам генома тритикале нами были изучены 38 линий удвоенных гаплоидов тритикале. Анализ полученных данных выявил полиморфизм по всем исследуемым локусам, кроме локуса *Xgwm554*: в данном локусе размер детектируемого фрагмента составил 142 п. о. у всех линий удвоенных гаплоидов. Наибольший полиморфизм отмечался для локусов *Xgwm186*, *Xgwm291* и *Xgwm595* – для каждого локуса у исследуемых линий было выявлено 4 аллеля (рис. 1, *a–c*). Для локусов *Xgwm234*, *Xgwm540* и *Xgwm371* было детектировано по 3 аллеля (рис. 1, *d–f*). Частота встречаемости конкретного аллеля по каждому локусу варьировала в достаточно широких пределах.

Для каждого локуса наблюдалось наличие редких аллелей, частота встречаемости которых у исследуемых линий составляла 3–5 %, не превышая 11 %. Так, для локуса *Xgwm186* редким являлся аллель 127 п. о. (частота 3 %), для локусов *Xgwm291*, *Xgwm234* и *Xgwm371* наиболее редко встречающимися были аллели размером 137, 242 и 185 п. о. соответственно (частота 5 %), для локуса *Xgwm595* – нуль аллель (частота 11 %).

Полученные данные позволили провести анализ генетического сходства изученных линий удвоенных гаплоидов и построить дендрограмму генетического подобия методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) (рис. 2).

Как видно из представленной на рис. 2 дендрограммы, все исследованные линии распределены в три основных кластера (отмечены римскими цифрами). Самым малочисленным был кластер III, в который вошли 5 линий удвоенных гаплоидов тритикале: 3 линии, полученные на основе гибрида Динаро Э-2551 × Рубин (DH-77-1-13, DH-77-13-1р, DH-77-13-6р), выделившиеся в отдельный подкластер; 1 линия, полученная на основе гибрида Легінь харьковский × Рубин (DH-83-1-13), и 1 линия, полученная на основе гибрида Лотос × Рубин (DH-82-6-13). Во II кластер вошли 17 линий, а в I – 16 линий, полученных на основе различных гибридных комбинаций. В ходе исследования было установлено, что линии, полученные от одной гибридной комбинации, проявляют высокую степень межлинейного полиморфизма и могут быть носителями уникального сочетания полезных генов.

Удвоенные гаплоиды пшеницы развиваются из микроспор и представляют собой гомозиготные организмы, имеющие двойной набор одинаковых хромосом. Такая генетическая организация позволяет точно локализовать на хромосоме и описать не только доминантные, но и рецессивные признаки, которые обычно скрыты у гетерозиготных растений. Также при использовании линий удвоенных гаплоидов наблюдается менее сложное генетическое расщепление, что позволяет использовать для выделения определенной комбинации генов относительно небольшие популяции. Вместе с тем при получении линий удвоенных гаплоидов необходим контроль степени гомозиготности материала, так как растения-регенеранты, полученные в культуре пыльников *in vitro*, могут иметь как гаметофитное (из микроспор), так и спорофитное (из тканей пыльника) происхождение. Наличие гетерозиготности по какому-либо локусу может свидетельствовать о спорофитном происхождении полученной линии и, как следствие, невозможности использовать ее в подобных исследованиях.

Использование SSR-маркеров позволяет определить как степень гомозиготности, так и степень гетерозиготности генотипов. Для оценки степени гетерозиготности были рассчитаны значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности полиморфных SSR-локусов линий удвоенных гаплоидов тритикале (табл. 2).

Значения уровней наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности находились в пределах 0,481–0,694 (в среднем 0,609) и 0,0–0,079 (в среднем 0,039) соответственно. Низкое значение наблюдаемой гетерозиготности было ожидаемо, так как исследуемые линии являются удвоенными гаплоидами, однако присутствие аллелей SSR-локусов в гетерозиготном состоянии в изученном наборе генотипов позволяет предположить наличие линий, полученных не из микроспор, а из тканей пыльника.

В нашем исследовании SSR-маркеры использовались также для оценки степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов. Для этого проводилась ПЦР с мечеными праймерами, как и для оценки межлинейного полиморфизма, но для каждой линии по каждому из маркеров оценивались по 12 индивидуальных растений.

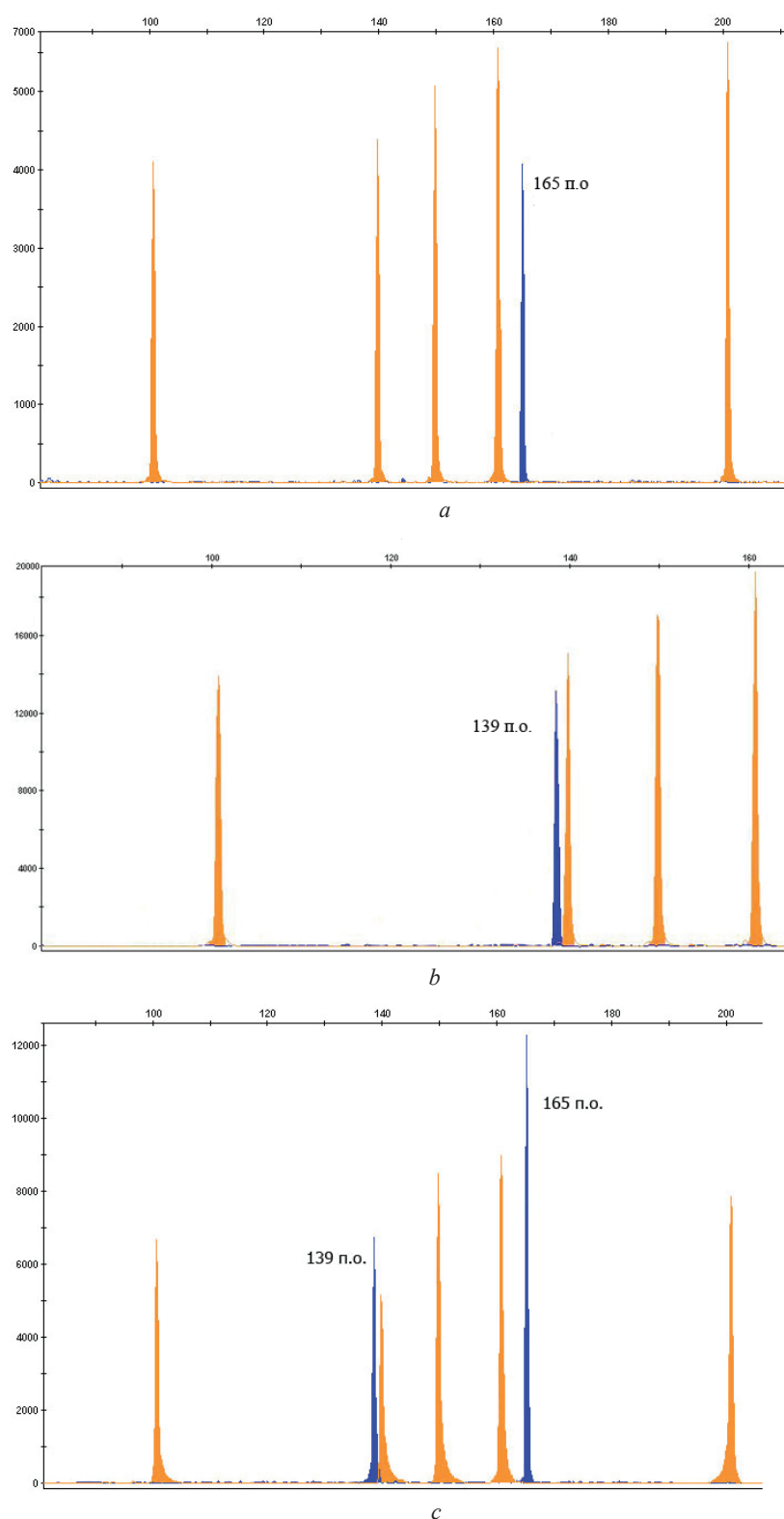


Рис. 3. Определение степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов тритикале с использованием SSR-маркера к локусу *Xgwm291* (метка FAM): *a* – гомозиготная линия DH-79-1-1-13; *b* – гомозиготная линия DH-25-2-3-15; *c* – гетерозиготная линия DH 83-1-13

Fig. 3. Determining the heterozygosity level of the triticale doubled haploid lines using the SSR marker in relation to the *Xgwm291* locus (mark FAM): *a* – homozygous line DH-79-1-1-13; *b* – homozygous line DH-25-2-3-15; *c* – heterozygous line DH 83-1-13

Т а б л и ц а 2. Значения ожидаемого и наблюдаемого уровней гетерозиготности в SSR-локусах линий удвоенных гаплоидов тритикале

Table 2. Values of the expected and observed heterozygosity levels in the SSR marker in relation to the loci in the triticale doubled haploid lines

Локус Locus	Число аллелей The number of alleles	H_E	H_O
Xgwm291	4	0,694	0,079
Xgwm186	4	0,583	0,053
Xgwm595	4	0,687	0,079
Xgwm234	3	0,555	0,000
Xgwm540	3	0,652	0,026
Xgwm371	3	0,481	0,000
Среднее на локус	$3,5 \pm 0,245$	$0,609 \pm 0,038$	$0,039 \pm 0,016$

Примечания: H_E – ожидаемая гетерозиготность; H_O – наблюдаемая гетерозиготность.
Notes: H_E – expected heterozygosity; H_O – observed heterozygosity.

В результате проведенного исследования были выявлены линии удвоенных гаплоидов, гетерозиготные по некоторым SSR-локусам. На рис. 3 представлен пример электрофоретического спектра линии DH 83-1-13, гетерозиготной по локусу *Xgwm291*.

Полученные с помощью фрагментного анализа данные показали, что гетерозиготность по одному из 6 исследуемых SSR-локусов проявили 8 линий удвоенных гаплоидов: по локусу *Xgwm291* – линии DH-81-3-2-13, DH-83-1-13, DH-84-1-13 (Г), по локусу *Xgwm186* – линия DH-85-5-13, по локусу *Xgwm595* – линии DH-82-4(2)-3-13, DH-82-4(1)-2-13, DH-77-3-13, по локусу *Xgwm540* – линия DH-77-13-6р. Все исследуемые линии были гомозиготны по локусам *Xgwm234* и *Xgwm371*.

Заключение. Полученные нами данные показали, что из 38 исследованных линий удвоенных гаплоидов гексаплоидного тритикале 8 линий являются гетерозиготными как минимум по одному микросателлитному локусу и, вероятнее всего, не являются истинными удвоенными гаплоидами, а происходят из клеток тканей пыльника, а не из микроспор. Таким образом, молекулярные маркеры на основе микросателлитных локусов являются удобным инструментом оценки внутри- и межлинейного полиморфизма у линий удвоенных гаплоидов тритикале, позволяющим быстро и точно выявить степень гомозиготности исследуемых линий. Молекулярно-генетический анализ с использованием SSR-маркеров дает возможность выявить гомозиготные и гетерозиготные линии удвоенных гаплоидов и принять решение по использованию их в дальнейших исследованиях. Выделенные гомозиготные линии удвоенных гаплоидов тритикале включены в селекционный процесс РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятия 5 «Разработать биотехнологию гомозиготизации генома тритикале на основе андрогенеза *in vitro* и ДНК-маркирования и создать высокопродуктивный сорт» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии–2020» ГП «Научное развитие технологий и техника» на 2016–2020 годы.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgement. The work was carried out in the context of the scientific event 5 “To develop the homozygosity biotechnology of genome in the triticale on the basis of androgenesis *in vitro* and DNA marking and to make a high-productive grade” subprogramme 1 “Innovation biotechnologies–2020” GP “High technologies and technique” in 2016–2020.

Список использованных источников

- Гриб, С. И. Генофонд, методы и результаты селекции тритикале в Беларуси / С. И. Гриб // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. аграр. наук. – 2014. – № 3. – С. 40–45.
- Eudes, F. An Overview of Triticale Doubled Haploids / F. Eudes, A. Chugh // Advances in Haploid Production in Higher Plants / eds. A. Touraev [et al.]. – Springer, 2008. – Ch. 6. – P. 87–96. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_6
- Doubled Haploids in Triticale / M. Wędzony [et al.] // Triticale / eds. F. Eudes. – Springer International Publishing, 2015. – Ch. 6. – P. 111–128. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22551-7_6
- Орлов, П. А. Функциональная геномика морфогенеза / П. А. Орлов. – Минск, 2005. – 518 с.

5. Гостимский С. А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров / С. А. Гостимский, З. Г. Кокаева, Ф. А. Коновалов // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 4. – С. 480–492.
6. Genetic map of triticale compiling DAiT, SSR, and AFLP markers / M. Tyrka [et al.] // Genome. – 2011. – Vol. 54, N 5. – P. 391–401. <https://doi.org/10.1139/g11-009>
7. Tuveesson, S. Wheat anther culture / S. Tuveesson, R. von Post, A. Ljungberg // Doubled haploid production in crop plants: a manual / eds. M. Maluszynski [et al.]. – Dordrecht, 2003. – Ch. 2.11. – P. 71–76. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_12
8. Jacquard, C. Anther culture in barley / C. Jacquard, G. Wojnarowicz, C. Clément // Doubled haploid production in crop plants: a manual / eds. M. Maluszynski [et al.]. – Dordrecht, 2003. – Ch. 2.3. – P. 21–27. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_4
9. Дорохов, Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
10. GrainGenes [Electronic resource]. – Mode of access: <https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi>. – Date of access: 10.01.2019.
11. Peakall, R. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, N 19. – P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
12. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1973. – Vol. 70, N 12. – P. 3321–3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
13. DARwin – Dissimilarity Analysis and Representation for Windows [Electronic resource]. – Mode of access: <http://darwin.cirad.fr/>. – Date of access: 12.12.2018.
14. Progress in doubled haploid technology in higher plants / M. Wędzony [et al.] // Advances in haploid production in higher plants. – Dordrecht, 2009. – P. 1–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1

References

1. Grib S. I. Gene pool, methods and results of triticale breeding in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2014, no. 3, pp. 40–45 (in Russian).
2. Eudes F., Chugh A. An Overview of Triticale Doubled Haploids. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer, 2008, ch. 6, pp. 87–96. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_6
3. Wędzony M., Żur I., Krzewska M., Dubas E., Szechyńska-Hebda M., Wąsek I. Doubled Haploids in Triticale. Eudes F. (eds.). *Triticale*. Springer International Publ., 2015, ch. 6, pp. 111–128. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22551-7_6
4. Orlov P. A. *Functional genomics of morphogenesis*. Minsk, 2005. 518 p. (in Russian).
5. Gostimsky S. A., Kokaeva Z. G., Kononov F. A. Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics*, 2005, vol. 41, no. 4, pp. 378–388. <https://doi.org/10.1007/s1177-005-0101-1>
6. Tyrka M., Bednarek P. T., Kilian A., Wędzony M., Hura T., Bauer E. Genetic map of triticale compiling DAiT, SSR, and AFLP markers. *Genome*, 2011, vol. 54, no. 5, pp. 391–401. <https://doi.org/10.1139/g11-009>
7. Tuveesson S., von Post R., Ljungberg A. Wheat anther culture. Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P., Szarejko I. (eds.). *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Dordrecht, 2003, ch. 2.11, pp. 71–76. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_12
8. Jacquard C., Wojnarowicz G., Clément C. Anther culture in barley. Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P., Szarejko I. (eds.). *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Dordrecht, 2003, ch. 2.3, pp. 21–27. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_4
9. Dorohov D. B., Kloke E. Fast and economical technology for RAPD analysis of plant genomes. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 1997, vol. 33, no. 4, pp. 443–450 (in Russian).
10. GrainGenes. Available at: <https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi> (accessed 10 January 2019).
11. Peakall R., Smouse P. E. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012, vol. 28, no. 19, pp. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
12. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, vol. 70, no. 12, pp. 3321–3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
13. *DARwin – Dissimilarity Analysis and Representation for Windows*. Available at: <http://darwin.cirad.fr/> (accessed 12 December 2018).
14. Wędzony M., Forster B. P., Żur I., Golemic E., Szechyńska-Hebda M., Dubas E., Gotębiowska G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. *Advances in haploid production in higher plants*. Dordrecht, 2009, pp. 1–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1

Информация об авторах

Лагуновская Елена Владимировна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.antonenko@igc.by.

Буракова Арина Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.burakova@igc.by.

Information about the authors

Lahunovskaya Alena V. – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.antonenko@igc.by.

Burakova Aryna A. – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.burakova@igc.by.

Бушчевич Виктор Николаевич – канд. с.-х. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: triticale@tut.by.

Сакович Валентина Ивановна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.sakovich@igc.by.

Лемеш Валентина Александровна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.lemesh@igc.by.

Гриб Станислав Иванович – академик, д-р с.-х. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: triticale@tut.by.

Bushtevich Victor N. – Ph. D. (Agrarian), Assistant professor, Head of the Laboratory. Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: triticale@tut.by.

Sakovich Valiantsina I. – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v.sakovich@igc.by.

Lemesh Valiantsina A. – Ph. D. (Biology), Assistant professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v.lemesh@igc.by.

Gryb Stanislaw I. – Academician, D. Sc. (Agrarian), Professor, Chief researcher. Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: triticale@tut.by.