

CAPS-маркеры в биологии растений

Ю.Н. Шавруков

Университет Аделаиды, отделение сельского хозяйства, питания и виноделия, Вайт Кампус, Хартли Гроув, Австралия

Возможности CAPS-маркеров (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК) для решения широкого спектра задач биологии растений способствовали их широкому использованию в последние годы в генетике и селекции растений. В данном обзоре проведен анализ результатов применения CAPS-маркеров за последние 3–5 лет. Особое внимание уделено работам, связанным с изучением генов, контролирующих хозяйственно важные признаки у различных видов растений, а также примерам использования CAPS-маркеров в селекции растений. Обсуждение данных работ предваряется упоминанием основных принципов разработки и анализа CAPS-маркеров, а также рассмотрением достоинств и недостатков данного класса ДНК-маркеров. Использование CAPS-маркеров основано на амплификации фрагмента ДНК при помощи ПЦР со специфическими праймерами и дальнейшем гидролизе с помощью эндонуклеаз рестрикции, продукты которого разделяются с помощью электрофореза в агарозном геле. Функциональные CAPS-маркеры разрабатывают на основе известной нуклеотидной последовательности изучаемого гена для характеристики его строения, функции, экспрессии и регуляции. CAPS-маркеры, основанные на фрагментах ДНК, тесно сцепленных с изучаемыми генами, особенно полезны для маркер-ориентированной селекции (Marker-Assisted Selection, MAS) и широко используются в отборе на устойчивость пшеницы, ячменя, сои, картофеля, томатов и других культурных растений к фитопатогенам. CAPS-маркеры часто применяют при создании генетических карт, а также для точной локализации изучаемых генов. С их использованием были впервые созданы молекулярно-генетические карты некоторых видов растений и картирован целый ряд генов и локусов количественных признаков (QTL), контролирующих тип развития растений, устойчивость к фитопатогенам, качество зерна (у некоторых видов злаков) и форму плодов (у томата). Важное применение CAPS-маркеры находят в филогенетических исследованиях, при изучении генетического полиморфизма, особенно у близких видов. Таким образом, CAPS-маркеры представляют собой эффективный инструмент как в молекулярно-генетических исследованиях, так и в селекции растений.

Ключевые слова: генетика и селекция растений; ДНК-маркеры; полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК; CAPS; Cleaved Amplified Polymorphic Sequences.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Шавруков Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(2):205-213. DOI 10.18699/VJ15.026

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(2):205-213. DOI 10.18699/VJ15.026

DOI 10.18699/VJ15.026

УДК 575.22:633

Поступила в редакцию 15.01.2015 г.

Принята к публикации 13.03.2015 г.

© АВТОР, 2015

 e-mail: yuri.shavrukov@adelaide.edu.au

CAPS markers in plant biology

Y.N. Shavrukov

School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Waite Campus, Hartley Grove, Australia

Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) markers are applicable in a wide range of tasks in plant biology. They have been developed for plant genetics and breeding and become especially useful. This mini-review analyzes information about the application of CAPS markers within the past 3–5 years. In the presented study, special attention is focused on CAPS markers linked with genes controlling important agricultural traits in different crops. The main principles of the development and analysis of CAPS markers, as well as advantages and disadvantages of this type of molecular markers, are briefly outlined in the beginning of this review. CAPS markers are based on PCR amplification of DNA fragments with specific primers followed by digestion with restriction enzymes and separation of the products in agarose gel. Functional CAPS markers can be developed on the known sequence of a gene of interest for the analyses of its structure, function, expression, and regulation. CAPS closely linked to the gene of interest are especially helpful for Marker-Assisted Selection, and they are widely used in the breeding of wheat, barley, soybean, potato, tomato, and other crops for tolerance to various pathogens. CAPS markers are often used for the preparation of genetic maps and fine mapping of studied genes. For some plants, first molecular-genetic maps were prepared using CAPS. This method was also successfully used for the mapping of both individual genes and QTLs controlling such important traits as plant growth habit, grain quality, and tolerance to pathogens in cereals, as well as the shape of tomato fruit. CAPS have important applications in the analyses of genetic polymorphism and phylogeny, particularly, in closely related species. Thus, CAPS are an effective tool for molecular-genetic research and plant breeding.

Key words: plant genetics and breeding; DNA markers; CAPS; Cleaved Amplified Polymorphic Sequences.

Молекулярные маркеры играют огромную роль в изучении наследования генов и их аллельного состояния, используются для анализа генетического полиморфизма и филогенетических отношений между видами, популяциями и отдельными индивидуумами, а также с целью выявления маркеров, тесно сцепленных с генами, контролирующими хозяйственно ценные признаки растений. В настоящее время существует огромное количество различных типов молекулярных маркеров, и их число постоянно увеличивается вместе с достижениями современных технологий и знаниями об отдельных генах и геномах растений в целом (Mohan et al., 1997; Хлесткина, Салина, 2006; Semagn et al., 2006; Henry, 2013; Poczai et al., 2013; Salgotra et al., 2014). Задачей настоящего мини-обзора является анализ опубликованных данных о разработке и применении единственной группы молекулярных маркеров, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК), в генетических и селекционных исследованиях у различных видов растений.

Принцип действия CAPS-маркеров

CAPS-маркеры представляют собой обособленную группу хорошо изученных и успешно применяемых (особенно в биологии растений) маркеров. Принцип работы CAPS-маркеров достаточно прост и основан как минимум на трех последовательных этапах: 1) проведение ПЦР со специфическими праймерами; 2) гидролиз фрагментов амплификации (ампликонов) с помощью эндонуклеаз рестрикции и 3) последующее разделение продуктов гидролиза в агарозном геле. По сути, принцип действия CAPS-маркеров объединяет широко распространенный метод ПЦР с классическим методом ПДРФ (полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов – Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), но основан на амплификации небольшого фрагмента ДНК вместо использования всего генома (Heubl, 2010, 2013; Lu et al., 2010; Hu et al., 2014).

Первая публикация с описанием и применением CAPS-маркеров у арабидопсиса положила начало использованию этих маркеров у разных видов растений (Konieczny, Ausubel, 1993). С тех пор данный метод проверяли, адаптировали и использовали на различных представителях царства растений, в результате чего появились многочисленные модификации и изменения CAPS-анализа, более подходящие для решения тех или иных задач (Heubl, 2013; Hu et al., 2014; Liu et al., 2014). Подробнее основные принципы создания и работы CAPS-маркеров представлены на рисунке (см. Дополнительные материалы 1¹).

В настоящее время, когда метод ПЦР стал широко доступным, а в любой молекулярно-генетической лаборатории ПЦР является необходимой составляющей, проведение первого этапа для изучения CAPS-маркеров не представляет особого труда. Для изучения определенных генов, которые в научной литературе часто называют «генами интереса» (ГИ), разрабатываются и используются специфические праймеры. Наиболее часто разработка

праймеров основана на знании последовательности нуклеотидов в экзонах, которые являются более консервативными для ГИ. Поэтому желательно, чтобы фрагменты амплификации содержали интрон, в котором с большей вероятностью можно обнаружить полиморфизмы (Lee et al., 2012; Lim, Ha, 2013 и Доп. материалы 1). Тем не менее CAPS-маркеры можно успешно разрабатывать на любых фрагментах генома. Разработка праймеров может быть проведена на основе использования нуклеотидных последовательностей, опубликованных в открытой печати, доступных из баз данных, а также полученных в собственных экспериментах (Liu et al., 2012, 2014; Hu et al., 2014; Ince et al., 2014; Ui et al., 2015). Стоит отметить, что ампликон сам по себе как продукт амплификации может быть полиморфным по длине, если в нем присутствуют инсерции или делеции нуклеотидов (как правило, в интронной части генов или в межгенных некодирующих районах). Очевидно, что чем больше инсерция или делеция в ампликоне ГИ, тем легче и точнее идентифицировать ее при разделении в геле. Однако такой полиморфизм называется аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР – Allele-specific PCR, AS-PCR) и имеет лишь косвенное отношение к CAPS-маркерам, так как небольшие по размеру инсерции или делеции, трудно различимые при разделении продуктов амплификации в геле, можно использовать для поиска специфической эндонуклеазы и дальнейшей разработки эффективного CAPS-маркера (Heubl, 2013). Таким образом, амплификация специфического фрагмента ГИ как первый этап создания CAPS-маркера представляет собой обычную ПЦР (см. Доп. материалы 1).

Главной особенностью второго этапа (применение эндонуклеаз) является частота различий в нуклеотидной последовательности между изучаемыми образцами ДНК, которая зависит от их биологических особенностей. В основном такие различия между образцами представляют собой однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), а также инсерции или делеции (Insertion-Deletion, InDel) (Хлесткина, Салина, 2006; Jehan, Lakhnpaul, 2006; Hazarika et al., 2014; Wu et al., 2014; Jiang et al., 2015). Частота таких изменений в ДНК в значительной мере зависит от вида растений и популяции, а также от ГИ и даже от положения ампликона в геноме (интрон, экзон или некодирующие районы). Очевидно, что чем выше частота изменений в изучаемых образцах, тем проще и удобнее разработать эффективный CAPS-маркер.

Главной особенностью создания и использования CAPS-маркеров является то, что генетические изменения в нуклеотидной последовательности должны затрагивать сайты распознавания эндонуклеаз (см. Доп. материалы 1). В простейшем случае образец амплификации, у которого присутствует сайт рестрикции, после обработки специфической эндонуклеазой будет представлен двумя фрагментами, в то время как полиморфный образец с измененным сайтом распознавания эндонуклеазы после такой же обработки будет представлен единственным фрагментом. Суть CAPS-маркеров как раз и состоит в обнаружении таких измененных сайтов рестрикции на ампликоне (Heubl, 2013).

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 3 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-06/appx3.pdf>

Стоит отметить, что если в изучаемом ампликоне слишком много измененных сайтов рестрикции, то следует проводить работу по их оптимизации и выбору наиболее удобного CAPS-маркера или более дешевой эндонуклеазы. Однако работа становится более сложной при незначительном полиморфизме и ограниченном выборе эндонуклеаз, а также невозможной, если полиморфные изменения вообще не затронули сайты распознавания эндонуклеаз. В последнем случае была разработана модификация основного метода, dCAPS (derived CAPS), при котором предстоит разработать новые праймеры, преобразующие сайты рестрикции (Neff et al., 1998; Li et al., 2012, 2014).

Для точного определения генетических изменений в сайтах распознавания эндонуклеаз крайне желательно провести секвенирование амплифицированных фрагментов (Lu et al., 2010, 2013; Nakatsuka et al., 2012; Bogacki et al., 2013 и Доп. материалы 1). После этого вопрос об идентификации и выборе оптимального фермента рестрикции становится чисто техническим (Hazarika et al., 2014). Однако, как показывает практика, при отсутствии возможности секвенирования также возможно разрабатывать CAPS-маркеры, но в этом случае процесс становится более длительным и носит статистический характер. Так, например, у многих видов с высокой частотой SNP или инсерций/делений можно проводить предварительную проверку на наличие сайтов рестрикции со всеми имеющимися эндонуклеазами (Řepková et al., 2009; Liu et al., 2014). Хотя такой метод не является наиболее оптимальным, он может упростить работу, если сайт распознавания хотя бы одной эндонуклеазы оказался полиморфным. Традиционно продукты рестрикции разделяют в агарозном или полиакриламидном геле, но современные технологии позволяют использовать капиллярный электрофорез продуктов, помеченных флуоресцентной меткой (Perovic et al., 2013). Такой метод значительно ускоряет процесс идентификации фрагментов рестрикции у CAPS-маркеров в гораздо большем числе образцов.

Таким образом, в большинстве случаев при правильном выборе фрагмента амплификации практически у любого вида растений и при сравнении любых форм можно обнаружить, разработать и с успехом применять CAPS-маркеры для молекулярно-генетических исследований.

Достоинства и недостатки метода CAPS-маркеров

Более чем за 30 лет, прошедших с момента появления CAPS-маркеров, стали очевидны как преимущества, так и ограничения их использования. Одним из самых важных положительных качеств является кодоминантный тип их наследования, при котором не только гомо-, но и гетерозиготные генотипы четко отличаются друг от друга (см. Доп. материалы 1). Очень часто данное преимущество может иметь решающее значение для генетических исследований, при которых CAPS-маркеры можно использовать как дополнительное средство для более точного анализа. Так, например, DArT (Diversity Arrays Technology)-маркеры являются чрезвычайно эффективным методом для картирования ГИ (Kilian et al., 2005; Akbari et al., 2006), но они имеют доминантную природу, в связи с чем не могут быть выявлены отличия между гомозиготными ге-

нотипами с доминантными аллелями и гетерозиготными генотипами. Поэтому область локализации ГИ насыщают дополнительными маркерами, имеющими кодоминантный тип наследования (Akbari et al., 2006; Park et al., 2013). По этой же причине многие генетические карты основаны на объединении различных типов маркеров с максимальным разрешением и удобством для работы (Carlier et al., 2012; Gautami et al., 2012; D'Agostino et al., 2013; Hu et al., 2013; Gonzalez-Cendales et al., 2014; Jahani et al., 2014; Liu et al., 2014).

Другим преимуществом CAPS-маркеров является отсутствие необходимости использования дорогостоящего и сложного оборудования. Действительно, как отмечено выше, непосредственно для работы с CAPS-маркерами требуется лишь обычное оборудование для проведения ПЦР, термостат для гидролиза продуктов ПЦР и аппарат для электрофоретического разделения продуктов ПЦР в агарозном геле. Для сравнения, многие современные подходы, основанные на данных полного или частичного секвенирования геномов растений, невозможно применять без использования сложного, автоматизированного и дорогостоящего оборудования (Mammadov et al., 2012; Bevan, Uauy, 2013; Neelam et al., 2013; Wang et al., 2014).

Немаловажным преимуществом CAPS-маркеров является простота идентификации получаемых результатов, так как продукты гидролиза четко представлены всего одним или несколькими фрагментами в геле, а интерпретация результатов настолько проста, что доступна обслуживающему персоналу и студентам (см. Доп. материалы 1).

Тем не менее очевидны и ограничения при разработке и применении CAPS-маркеров. В первую очередь, к ним можно отнести отсутствие возможности автоматизировать трехэтапный процесс анализа на уровне среднего по сравнению с другими типами ДНК-маркеров (ПЦР, гидролиз и электрофорез), а также стоимость самого анализа. Последнее в основном связано с высокими ценами на некоторые уникальные и дорогостоящие эндонуклеазы и, разумеется, оптимизация выбора необходимой и недорогой эндонуклеазы для гидролиза может оказаться решающей для данного метода.

Следует также отметить, что CAPS-маркеры менее приемлемы для высокопродуктивной автоматизированной системы, например, с использованием роботов. Исключения могут составлять заранее проверенные CAPS-маркеры, для которых ПЦР и последующий гидролиз можно проводить в планшетах на 96 образцов или в системе «Multiplex» одновременно с несколькими парами праймеров, помеченными разными флуоресцентными метками, и капиллярным разделением продуктов амплификации и гидролиза (Perovic et al., 2013).

Совместимость CAPS

с другими молекулярными маркерами

В последнее время наблюдается быстрый прогресс в работах по полному секвенированию геномов. К полностью секвенированным видам (арабидопсис и рис) в ближайшее время ожидается добавить такие хозяйственно важные виды, как ячмень, сорго, рапс, соя и многие другие. Какие новые возможности дает это исследователям при

разработке и использовании CAPS-маркеров? На основе данных полного или частичного секвенирования генома можно гораздо проще и точнее разрабатывать праймеры для ГИ и наиболее точно подбирать эндонуклеазы для гидролиза продуктов амплификации. В результате эффективность CAPS метода значительно повышается.

Несмотря на свою специфику, CAPS-маркеры успешно дополняют другие молекулярные маркеры (Salgotra et al., 2014). Современные научные технологии быстро и активно развиваются, но это не отрицает возможности использования ранее разработанных методов. Так, например, классические маркеры RFLP связаны с трудоемким и дорогостоящим анализом, требующим применения радиоактивной метки. Однако для некоторых случаев он оказывается совершенно незаменимым. В то же время популярный в последние годы метод секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS) основан на секвенировании и использовании огромного количества выделенных SNP (Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм). Например, у пшеницы их число уже доведено до 90 000 (Wang et al., 2014) и продолжает постоянно расти. Очень часто CAPS-маркеры разрабатывают на основе технологии NGS-SNP, являющейся чрезвычайно результативным методом, особенно для маркер-ориентированной селекции (Marker-Assisted Selection, MAS) (Jun et al., 2012; Poczaï et al., 2013; Salgotra et al., 2014). Специально для работы с SNP была создана роботизированная система «KASPar», что позволило выделить эффективные CAPS-маркеры к генам устойчивости к листовой ржавчине у пшеницы (Neelam et al., 2013) и маркеры для анализа геномов у томатов (D'Agostino et al., 2013) и цитрусовых (Hazarika et al., 2014).

В настоящее время в разработке CAPS-маркеров используют генотипирование на основе отдельных нуклеотидных последовательностей (Genotyping-by-Sequencing, GBS) (Salgotra et al., 2014) или результаты полного секвенирования генома (Whole Genome Sequencing, WGS), как, например, показано на сое (Jun et al., 2012) и у модельного злакового растения *Brachypodium* (Cui et al., 2012). При этом исследователю остается только найти генетический фрагмент, на котором локализован ГИ. На указанных выше примерах с помощью CAPS-маркеров, успешно разработанных на основе данных полного секвенирования геномов, показана точная локализация генов устойчивости к мучнистой росе у сои (Jun et al., 2012) и к вирусу штриховатой мозаики у *Brachypodium* (Cui et al., 2012). Метод анализа SNP, например, с помощью технологии «Illumina GoldenGate», оказался весьма эффективным и удобным для разработки новых CAPS-маркеров у разных растений (Cui et al., 2012; Hofmann et al., 2013). Весьма впечатляющими оказались результаты разработки 2458 эффективных CAPS-маркеров на основе высокопродуктивной технологии «IlluminaHiSeq 2000» у арбуза. При этом около половины разработанных CAPS-маркеров оказались полиморфными и удобными для дальнейших генетико-селекционных исследований, что примерно в 12 раз превышало число маркеров, разработанных во всех предшествующих исследованиях, проведенных на данном виде растений (Liu et al., 2014).

Для успешной разработки новых CAPS-маркеров на различных растениях успешно применяют другие технологии, такие как высокоточный анализ кривой плавления при амплификации (High-Resolution Melting Curve Analysis) (Jun et al., 2012; Kim et al., 2013; Tan et al., 2013), которые можно адаптировать к роботизированной системе в планшетах на 384 образца (Jun et al., 2012), а также к методу микрокапиллярного электрофореза с флюоресцентной меткой (Perovic et al., 2013).

Примеры использования CAPS-маркеров в биологии растений

Обширная информация по изучению, разработке и применению CAPS-маркеров у разных видов растений за последние годы представлена в таблице (см. Доп. материалы 2), а также изложена в недавно опубликованной книге (см. Доп. материалы 3).

Все данные по разработке и использованию CAPS-маркеров, представленные в таблице, можно разделить на три группы, в зависимости от целей исследования и доступности нуклеотидных последовательностей. Первую группу составляют наиболее продвинутые работы по созданию функциональных маркеров, основанных на известных нуклеотидных последовательностях (полных или частичных) ГИ. Отличительной особенностью данной группы является небольшое количество используемых CAPS-маркеров (2–3), так как этого достаточно, если разработанные маркеры функциональны и основаны на данных о нуклеотидных последовательностях изучаемых генов. В данной группе CAPS-маркеры используют для изучения строения, функции, экспрессии и регуляции ГИ, а также фенотипического проявления ГИ на растениях. В таблице (Доп. материалы 2) приведены лишь некоторые примеры таких функциональных CAPS-маркеров, разработанных и успешно применяемых на различных видах растений. В этой группе представлены функциональные CAPS-маркеры, основанные на данных о нуклеотидных последовательностях генов, контролирующих признаки качества зерна, такие как устойчивость крахмала к перевариванию (Yang et al., 2012), пониженное содержание фитиновой кислоты у риса (Tan et al., 2013), низкое содержание амилозы в зерне сорго (Lu et al., 2013), а также вес 1000 зерен у пшеницы (Jiang et al., 2015). Другие функциональные CAPS-маркеры связаны с генами контроля биосинтеза пигментов антоцианов в цветках горечавки и в зерне риса (Nakatsuka et al., 2012; Lim, Ha, 2013). Гены устойчивости к токсическому содержанию бора в почве и к мучнистой росе легли в основу создания функциональных CAPS-маркеров у люцерны (Bogacki et al., 2013) и гороха (Santo et al., 2013; Pavan et al., 2014). Стоит отметить, что часть работ проведена при исследовании природного полиморфизма в линиях, сортах и популяциях (Nakatsuka et al., 2012; Lim, Ha, 2013; Jiang et al., 2015), в то время как остальные публикации посвящены изучению мутантов и гибридных популяций, полученных на их основе (Yang et al., 2012; Bogacki et al., 2013; Lu et al., 2013; Santo et al., 2013; Tan et al., 2013; Pavan et al., 2014). В некоторых работах приводятся данные по изучению экспрессии ГИ (Bogacki et al., 2013; Lim, Ha, 2013), влияния регуляторных генов (Nakatsuka et al., 2012; Lim, Ha, 2013), а также

случаи появления преждевременных «стоп»-кодонов, укорачивающих производимый полипептид (Nakatsuka et al., 2012; Lu et al., 2013; Santo et al., 2013). В то же время во всех исследованиях были идентифицированы изменения в кодирующих районах ГИ, затрагивающие сайты рестрикции эндонуклеаз, и авторы успешно разработали и использовали функциональные CAPS-маркеры для анализа строения и экспрессии ГИ.

При создании функциональных CAPS-маркеров особое место занимают работы по изучению генов в гомеологических группах хромосом мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В целом работать с аллополиплоидными видами, к которым принадлежит пшеница, гораздо сложнее, чем с диплоидными. Гексаплоидный геном мягкой пшеницы состоит из трех геномов, происходящих от разных видов, с незначительным полиморфизмом по трем гомеологическим копиям у многих генов. Поэтому гораздо сложнее обнаружить SNP у мягкой пшеницы, чем у таких диплоидных видов, как ячмень. Среди злаков геном пшеницы оценивается как один из наименее полиморфных, в нем частота обнаружения SNP примерно в 2,3–3,1 раза ниже, чем у ячменя (Shavrukov, 2014). Поэтому разработка CAPS-маркеров у мягкой пшеницы представляется особенно сложной задачей, и тем интереснее оказались результаты, полученные с помощью CAPS-маркеров на огромной коллекции сортов при изучении *TaCWI*, гена инвертазы в клеточной стенке, связанного с признаком веса зерна (Jiang et al., 2015). Авторам удалось точно локализовать ген на хромосомах 4A, 5B и 5D у разных гаплотипов, указать на архаичную генетическую транслокацию на хромосомах 4A-5A-7B и высчитать влияние направлений отбора по данному признаку за многолетнюю историю селекции пшеницы (Jiang et al., 2015). Тетраплоидная пшеница содержит только два генома, но работа по локализации и анализу ГИ сопряжена с теми же трудностями, что и у мягкой пшеницы. При исследовании дикого тетраплоидного вида *T. dicoccoides* с помощью CAPS-маркеров ученым удалось успешно идентифицировать, локализовать и полностью охарактеризовать гены, контролирующие такие хозяйственно важные признаки, как устойчивость к разным расам штриховатой мозаики (*Yr36*, *Yr15* и *YrH52*) и мучнистой росе (*PmG16* и *PmG3M*) (Raats et al., 2014). Успех исследовательской группы выразался в создании эффективных CAPS-маркеров, удобных для выделения, интрогрессии и контроля ГИ у селекционных материалов с использованием дикого вида. Авторы пришли к заключению, что CAPS-маркеры могут выступать в качестве «простого решения для анализа сложного генома» (Raats et al., 2014). Это может служить прекрасным примером успешной разработки и удачного применения CAPS-маркеров для изучения генов пшеницы.

Следующее направление, в котором широко используются CAPS-маркеры, – это MAS (Marker Assisted Selection – маркер-ориентированная селекция) по хозяйственно важным признакам. При этом нуклеотидная последовательность потенциальных ГИ может оставаться неизвестной. В данной группе представлены три обзора, посвященные анализу применения CAPS-маркеров для практической селекции на разных культурах. Так, например, результаты применения CAPS-маркеров в селекции

трех масличных культур (соя, подсолнечник и рапс) свидетельствуют об их высокой эффективности на данной группе растений, которые, с ботанической точки зрения, принадлежат к совершенно различным семействам – бобовых, сложноцветных и крестоцветных соответственно (Miladinović et al., 2014). Автор приводит и анализирует многочисленные примеры успешного применения маркер-ориентированной селекции на данных культурах с помощью CAPS-маркеров. О практическом применении CAPS-маркеров в селекции пивоваренного ячменя по различным признакам качества зерна сообщается в статье Iimure с соавт. (2014). Очевидно, что такие исследования представляют особый интерес для практической селекции, направленной на удовлетворение растущей потребности в качественном сырье для производства пива, и, как видно из статьи, японским селекционерам ячменя удалось добиться значительных успехов в его селекции с использованием CAPS-маркеров (Iimure et al., 2014). Еще одна работа посвящена анализу разработки и применения CAPS-маркеров у трав – райграсса, овсяницы и межвидовых гибридов между ними (Miura, 2014). Объект исследований в данном обзоре чрезвычайно интересен и важен для повышения продуктивности кормов. Однако с ботанико-генетической точки зрения, райграсс, овсяница и их межвидовые гибриды – очень сложные объекты, с особым генетическим контролем самонесовместимости и амфилоидной природой гибридов. Тем интереснее выглядят представленные в статье (Miura, 2014) результаты по разработке и успешному применению CAPS-маркеров у данных видов трав и их гибридов в маркер-ориентированной селекции на устойчивости к болезням и по признакам продуктивности и развития растений.

При проведении маркер-ориентированной селекции с использованием CAPS-маркеров чрезвычайно важной является работа с мутантами табака с низким содержанием никотина (Li et al., 2012, 2014). Всемирная организация здравоохранения и авторы статьи считают, что в обозримом будущем, помимо борьбы с курением, больше внимания будет уделено селекции табака с пониженным содержанием никотина. Li с соавт. (2012, 2014) приводят потрясающие результаты такой маркер-ориентированной селекции с использованием CAPS-маркеров на табаке. Авторам удалось выделить мутанты табака по трем ключевым генам, контролирующим пониженное содержание никотина в листьях, и доказать высокую эффективность использования CAPS-маркеров для идентификации данных мутаций и маркер-ориентированной селекции по ним (Li et al., 2012, 2014).

Несмотря на большое разнообразие исследований, связанных с применением CAPS-маркеров, основная часть этих работ нацелена на селекцию по признакам устойчивости к вирусам и болезням, а также к гербицидам. Однако при разработке CAPS-маркеров ученые решали задачи, специфические для каждого исследования и объекта. Например, среди растений сорного дикого сорго были выявлены образцы, устойчивые к гербициду FOP. После детального анализа было установлено, что все устойчивые растения имели точечную мутацию в гене ацетил-кофермент-А карбоксилазы, определяющую устойчивость к гербициду. Это было наглядно подтверждено

анализом большого числа образцов с помощью единственного CAPS-маркера (Scarabel et al., 2014). При изучении устойчивости пшеницы к гербициду IMI специально разработанный CAPS-маркер позволил точно изучить ареал распространения пыльцы с геном устойчивости (Beckie et al., 2012). Устойчивость к различным болезням является чрезвычайно важным признаком у разных культур, но гены, контролирующие данные признаки, как и их нуклеотидные последовательности, остаются пока неизвестными. Анализ публикаций, посвященных изучению устойчивости к вирусам и грибковым болезням (мучнистая роса и фитофтороз) у различных растений: репа, соя, дыня, картофель, томат и фасоль (Cho et al., 2012a; Jun et al., 2012; Kim et al., 2013; Lopez-Pardo et al., 2013; Panthee et al., 2013; Kumar et al., 2014; Pasev et al., 2014), позволяет сделать вывод о высокой эффективности использования правильно разработанных CAPS-маркеров. Это происходит независимо от типа изученного материала (селекционные линии, сорта, гибриды и популяции для картирования, в которых аллели генов устойчивости передавались либо от диких видов, либо от выделенных генотипов). Поэтому CAPS-маркер-ориентированная селекция по таким признакам остается достаточно важным инструментом в селекции растений. Результаты проведенных исследований являются прекрасной иллюстрацией анализа CAPS-маркеров и рекомендованы к применению в селекции по изучаемым признакам.

Еще одно направление, связанное с широким использованием CAPS-маркеров, включает исследование более общего плана, такие как составление генетических карт, локализация QTL (Quantitative Trait Loci – локусы количественных признаков) и вопросы филогенетических отношений между изучаемыми образцами (см. Доп. материалы 2). Ретроспективу развития исследований CAPS-маркеров для изучения мутантов и рекомбинантов у модельного растения арабидопсиса хорошо иллюстрирует обзор Kato с соавт. (2014). Основной целью работ в данном направлении является обнаружение максимального полиморфизма при использовании CAPS-маркеров. Это особенно важно для создания генетических карт (Carlier et al., 2012; Gautami et al., 2012; D'Agostino et al., 2013; Hu et al., 2013, 2014; Gonzalez-Cendales et al., 2014; Liu et al., 2014; Raats et al., 2014) и в дальнейшем для более точной локализации обнаруженного QTL (Hofmann et al., 2013; Jahani et al., 2014; Liu et al., 2014) или потенциального ГИ (Azhaguvel et al., 2012; Cho et al., 2012b; Cui et al., 2012; Song et al., 2012; Bang et al., 2013; Park et al., 2013; Chusreeaeom et al., 2014; Sabatini et al., 2014; Ui et al., 2015). На основе полиморфных маркеров, разработанных и представленных в данной группе, были установлены молекулярно-филогенетические взаимоотношения между изучаемыми образцами у разных видов растений (Amar et al., 2011; Hu et al., 2013, 2014; Ince et al., 2014). Чрезвычайно важное применение CAPS-маркеры нашли для определения генетического внутри- и межвидового полиморфизма у совершенно различных видов растений (Lee et al., 2012; Cheng, Stolt, 2014; Yatabe-Kakugawa, Ootsuki, 2014). Так, например, эндемичные для Китая виды крапивы (*Boehmeria*) и женьшеня (*Panax*) широко применяются для медицинских целей. Поэтому вполне понятны интерес

и ценность результатов изучения внутри- и межвидового полиморфизма, полученных с использованием CAPS-маркеров у данных видов (Lee et al., 2012; Cheng, Stolt, 2014). Дополнительно на основе такого полиморфизма по CAPS-маркерам уже разработаны и успешно применяются практические методы по проверке чистоты образцов женьшеня для фармакологических целей (Lu et al., 2010). По сравнению с описанными выше видами совершенно особую группу составляют папоротники, так как большую часть своей жизни они представляют собой гаплоидную, а не диплоидную форму растений. Тем не менее результаты изучения внутри- и межвидового полиморфизма у папоротников *Osmunda* и *Cyrtomium* наглядно показывают высокую эффективность разработки и применения CAPS-маркеров для данного типа исследований (Yatabe-Kakugawa, Ootsuki, 2014). Отдельно следует отметить их успешное применение для изучения микоризных грибов, обитающих на корнях древесных растений, что находит практическое применение в дендрологических исследованиях (García-González et al., 2014).

Все приведенные случаи являются примерами успешной разработки и эффективного применения CAPS-маркеров для генетических и селекционных исследований.

В последнее время наблюдается бурное развитие и внедрение методов анализа генома с помощью высокопроизводительного секвенирования и анализа полной нуклеотидной последовательности генома некоторых видов растений. Объем данных по секвенированию в базах данных растений постоянно увеличивается. Однако нередко ДНК-маркеры, в том числе CAPS, приходится использовать для решения задач, не требующих методов высокопроизводительного анализа, например, для изучения определенных участков генома или отдельных ГИ с целью их локализации и анализа аллельного полиморфизма. Каждый вид молекулярных маркеров имеет свои преимущества и ограничения, а также наиболее подходящие области применения, в зависимости от задачи исследования. Ученые вправе выбирать наиболее удобные маркеры. В этой связи за короткий период истории существования (с 1993 г.) CAPS-маркеры заняли достойное место, особенно в молекулярной биологии растений, и остаются достаточно эффективным и востребованным инструментом для решения задач современной генетики и селекции растений.

Благодарности

Автор благодарит д-ра Julie Hayes за критические замечания и помощь в оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы. Генетика. 2006;42(6):725-736.
- Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmsiek A., Kuchel H., Hayden M.J., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Kilian A. Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexa-

- ploid wheat genome. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113(8):1409-1420. DOI: 10.1007/s00122-006-0365-4
- Amar M.H., Biswas M.K., Zhang Z., Guoa W.W. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of Citrus germplasm collection. *Sci. Hortic.* 2011;128(3):220-227. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.01.021
- Azhaguvel P., Rudd J.C., Ma Y., Luo M.C., Weng Y. Fine genetic mapping of greenbug aphid-resistance gene *Gb3* in *Aegilops tauschii*. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(3):555-564. DOI: 10.1007/s00122-011-1728-z
- Bang H., Kim S., Park S.O., Yooa K.S., Patil B.S. Development of a codominant CAPS marker linked to the *Ms* locus controlling fertility restoration in onion (*Allium cepa* L.). *Sci. Hortic.* 2013;153:42-49. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.01.020
- Beckie H.J., Warwick S.L., Hall L.M., Harker K.N. Pollen-mediated gene flow in wheat fields in Western Canada. *AgBioForum.* 2012;15(1):36-43.
- Bevan M.W., Uauy C. Genomics reveals new landscapes for crop improvement. *Genome Biol.* 2013;14(6):206. DOI: 10.1186/gb-2013-14-6-206
- Bogacki P., Peck D.M., Nair R.M., Howie J., Oldach K.H. Genetic analysis of tolerance to Boron toxicity in the legume *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 2013;13:54. DOI: 10.1186/1471-2229-13-54
- Carlier J.D., Sousa N.H., Santo T.E., d'Eeckenbrugge G.C., Leitão J.M. A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. *Mol. Breeding.* 2012;29(1):245-260. DOI: 10.1007/s11032-010-9543-9
- Cheng A., Ismail I., Osman M., Hashim H. Simple and rapid molecular techniques for identification of amylose levels in rice varieties. *Intern. J. Mol. Sci.* 2012;13(5):6156-6166. DOI: 10.3390/ijms13056156
- Cheng C.M., Stolt P. Basic and applied research on *Boehmeria* (ramie) utilising CAPS marker technology. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology.* Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Cho K.H., Park S.H., Kim K.T., Kim S., Kim J.S., Park B.S., Woo J.G., Lee H.J. Mapping quantitative trait loci (QTL) for clubroot resistance in *Brassica rapa* L. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 2012a;87(4):325-333.
- Cho Y., Lee Y.P., Park B.S., Han T.H., Kim S. Construction of a high-resolution linkage map of *Rfd1*, a restorer-of-fertility locus for cytoplasmic male sterility conferred by DCGMS cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.) using synteny between radish and *Arabidopsis* genomes. *Theor. Appl. Genet.* 2012b;125(3):467-477. DOI: 10.1007/s00122-012-1846-2
- Chusreeaom K., Ariizumi T., Asamizu E., Okabe Y., Shirasawa K., Ezura H. A novel tomato mutant, *Solanum lycopersicum elongated fruit1* (*Slelf1*), exhibits an elongated fruit shape caused by increased cell layers in the proximal region of the ovary. *Mol. Genet. Genom.* 2014;289(3):399-409. DOI: 10.1007/s00438-014-0822-8
- Cui Y., Lee M.Y., Huo N., Bragg J., Yan L., Yuan C., Li C., Holditch S.J., Xie J., Luo M.C., Li D., Yu J., Martin J., Schackwitz W., Gu Y.Q., Vogel J.P., Jackson A.O., Liu Z., Garvin D.F. Fine mapping of the *Bsr1* barley stripe mosaic virus resistance gene in the model grass *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e38333. DOI: 10.1371/journal.pone.0038333
- D'Agostino N., Golas T., van de Geest H., Bombarely A., Dawood T., Zethof J., Driedonks N., Wijnker E., Bargsten J., Nap J.P., Mariani C., Rieu I. Genomic analysis of the native European *Solanum* species, *S. dulcamara*. *BMC Genomics.* 2013;14:356. DOI: 10.1186/1471-2164-14-356
- García-González R., Alday C.C., Ruz P.C., Gálvez B.C., Rodríguez A.D.A., Berríos M., Villagra E., González G., Gordillo F., Caligari P.D.S. Versatility of CAPS markers: Agriculture and forestry applications. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology.* Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Gautami B., Foncéca D., Pandey M.K., Moretzsohn M.C., Sujay V., Qin H., Hong Y., Faye I., Chen X., BhanuPrakash A., Shah T.M., Gowda M.V.C., Nigam S.N., Liang X., Hoisington D.A., Guo B., Bertoli D.J., Rami J.F., Varshney R.K. An international reference consensus genetic map with 897 marker loci based on 11 mapping populations for tetraploid groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS ONE.* 2012;7(7):e41213. DOI: 10.1371/journal.pone.0041213
- Gonzalez-Cendales Y., Huang D.T.T., Lim G.T.T., McGrath D.J., Catanzariti A.M., Jones D.A. Application of CAPS markers to the mapping and marker-assisted breeding of genes for resistance to Fusarium wilt in tomato. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology.* Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Hazarika T.K., Hazarika B.N., Shukla A.C. Genetic variability and phylogenetic relationships studies of genus *Citrus* L. with the application of molecular markers. *Genetic Res. Crop Evol.* 2014;61(8):1441-1454. DOI: 10.1007/s10722-014-0188-0
- Henry R.J. (Ed.) *Molecular Markers in Plants.* Wiley Blackwell: New Delhi. 2013.
- Heubl G. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Medica.* 2010;76(17):1963-1974.
- Heubl G. DNA-based authentication of TCM-plants: current progress and future perspectives. Evidence and National Based Research on Chinese Drugs. Eds H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich. Vienna: Springer Vienna, 2013.
- Hofmann K., Silvar C., Casas A.M., Herz M., Büttner B., Gracia M.P., Contreras-Moreira B., Wallwork H., Igartua E., Schweizer G. Fine mapping of the *Rrs1* resistance locus against scald in two large populations derived from Spanish barley landraces. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(12):3091-3102. DOI: 10.1007/s00122-013-2196-4
- Hu C.Y., Lee T.C., Tsai H.T., Tsai Y.Z., Lin S.F. Construction of an integrated genetic map based on maternal and paternal lineages of tea (*Camellia sinensis*). *Euphytica.* 2013;191(1):141-152. DOI: 10.1007/s10681-013-0908-0
- Hu C.Y., Tsai Y.Z., Lin S.F. Development of STS and CAPS markers for variety identification and genetic diversity analysis of tea germplasm in Taiwan. *Botanical Studies.* 2014;55(1):12. DOI: 10.1186/1999-3110-55-12
- Iimure T., Zhou T.S., Hoki T. Development of CAPS markers and its use for malting barley breeding. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology.* Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Ince A.G., Karaca M., Elmasulu S.Y. New microsatellite and CAPS-microsatellite markers for clarifying taxonomic and phylogenetic relationships within *Origanum* L. *Mol. Breeding.* 2014;34(2):643-654. DOI: 10.1007/s11032-014-0064-9
- Jahani M., Nematzadeh G., Dolatabadi B., Hashemi S.H., Mohammadi-Nejad G. Identification and validation of functional markers in a global rice collection by association mapping. *Genome.* 2014;57(6):355-362. DOI: 10.1139/gen-2014-0044
- Jehan T., Lakhnypaul S. Single nucleotide polymorphism (SNP) – methods and applications in plant genetics: a review. *Indian J. Biotechnol.* 2006;5(4):435-459.
- Jiang Y., Jiang Q., Hao C., Hou J., Wang L., Zhang H., Zhang S., Chen X., Zhang X. A yield-associated gene *TaCWI*, in wheat: its function, selection and evolution in global breeding revealed by haplotype analysis. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(1):131-143. DOI: 10.1007/s00122-014-2417-5
- Julián O., Herráiz J., Corella S., di-Lolli I., Soler S., Díez M.J., Pérez-de-Castro A. Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: Exploitation of resistance to viruses. *Euphytica.* 2013;193(2):183-196. DOI: 10.1007/s10681-013-0896-0
- Jun T.H., Mian M.A.R., Kang S.T., Michel A.P. Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene in soybean PI 567301B. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(6):1159-1168. DOI: 10.1007/s00122-012-1902-y
- Kato T., Toyota M., Tasaka M., Morita M.T. Mini-history of map-based cloning in *Arabidopsis* // *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology.* Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.

- Kilian A., Huttner E., Wenzl P., Jaccoud D., Carling J., Caig V., Evers M., Heller-Uszynska K., Cayla C., Patarapuwadol S., Xia L., Yang S., Thomson B. The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement. In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution. Proceedings of the International Congress. 27–31 May, 2003. Ed. R. Tuberosa, R.L. Phillips, M. Gale. Avenue Media: Bologna, Italy, 2005;443-461.
- Kim K.H., Ahn S.G., Hwang J.H., Choi Y.M., Moon H.S., Park Y.H. Inheritance of resistance to powdery mildew in the watermelon and development of a molecular marker for selecting resistant plants. Hort. Environ. Biotechnol. 2013;54(2):134-140. DOI: 10.1007/s13580-013-0156-1
- Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 1993;4(2):403-410. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1993.04020403.x
- Kumar A., Tiwari K.L., Datta D., Singh M. Marker assisted gene pyramiding for enhanced *Tomato leaf curl virus* disease resistance in tomato cultivars. Biol. Plantarum. 2014;58(4):792-797. DOI: 10.1007/s10535-014-0449-y
- Lee J.W., Bang K.H., Kim Y.C., Seo A.Y. Jo I.H., Lee J.H., Kim O.T., Hyun D.Y., Cha S.W., Cho J.H. CAPS markers using mitochondrial consensus primers for molecular identification of *Panax* species and Korean ginseng cultivars (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Mol. Biol. Rep. 2012;39(1):729-736. DOI: 10.1007/s11033-011-0792-4
- Li D., Lewis R.S., Jack A.M., Dewey R.E., Bowen S.W., Miller R.D. Development of CAPS and dCAPS markers for CYP82E4, CYP82E5v2 and CYP82E10 gene mutants reducing nicotine to nicotine conversion in tobacco. Mol. Breeding. 2012;29(3):589-599. DOI: 10.1007/s11032-011-9575-9
- Li D., Bao Y., Wu X., Jack A., Yang S. The use of CAPS and dCAPS markers in marker-assisted selection for tobacco breeding. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Lim S.H., Ha S.H. Marker development for the identification of rice seed color. Plant Biotechnol. Rep. 2013;7(3):391-398. DOI: 10.1007/s11816-013-0276-1
- Liu Z., Crampton M., Todd A., Kalavacharla V. Identification of expressed resistance gene-like sequences by data mining in 454-derived transcriptomic sequences of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC Plant Biol. 2012;12:42. DOI: 10.1186/1471-2229-12-42
- Liu S., Gao P., Wang X., Davis A.R., Baloch A.M., Luan F. Mapping of quantitative trait loci for lycopene content and fruit traits in *Citrullus lanatus*. Euphytica. 2014. DOI: 10.1007/s10681-014-1308-9
- Lopez-Pardo R., Barandalla L., Ritter E., de Galarreta J.I.R. Validation of molecular markers for pathogen resistance in potato. Plant Breeding. 2013;132(3):246-251. DOI: 10.1111/pbr.12062
- Lu K.T., Lee H.C., Liu F.S., Lo C.F., Lin J.H. Identification of Ginseng Radix in Chinese medicine preparations by nested PCR-DNA sequencing method and nested PCR-restriction fragment length polymorphism. J. Food Drug Analysis. 2010;18(1):58-63.
- Lu Y., Zhao G., Li Y., Fan J., Ding G., Zhao J., Ni X., Wang W. Identification of two novel waxy alleles and development of their molecular markers in sorghum. Genome. 2013;56(5):283-288. DOI: 10.1139/gen-2013-0047
- Mammadov J., Aggarwal R., Buyyarapu R., Kumpatla S. SNP markers and their impact on plant breeding. Intern. J. Plant Genom. 2012;2012:728398. DOI: 10.1155/2012/728398
- Miladinović D., Imerovski I., Dimitrijević A., Jocić S. CAPS markers in breeding of oil crops. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Miura Y. Development of CAPS markers and their use in breeding of ryegrasses and related species. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R., Sasaki T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Mol. Breeding. 1997;3(2):87-103. DOI: 10.1023/A:1009651919792
- Nakatsuka T., Saito M., Sato-Ushiku Y., Yamada E., Nakasato T., Hoshi N., Fujiwara K., Hikage T., Nishihara M. Development of DNA markers that discriminate between white- and blue-flowers in Japanese gentian plants. Euphytica. 2012;184(3):335-344. DOI: 10.1007/s10681-011-0534-7
- Neelam K., Brown-Guedira G., Huang L. Development and validation of a breeder-friendly KASPar marker for wheat leaf rust resistance locus *Lr21*. Mol. Breeding. 2013;31(1):233-237. DOI: 10.1007/s11032-012-9773-0
- Neff M.M., Neff J. D., Chory J., Pepper A.E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. Plant J. 1998;14(3):387-392. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1998.00124.x
- Okoń S., Kowalczyk K., Miazga D. Identification of *Ppd-B1* alleles in common wheat cultivars by CAPS marker. Генетика. 2012;48(5):628-633. DOI: 10.1134/S102279541205016X
- Panthee D.R., Brown A.F., Yousef G.G., Ibrahim R., Anderson C. Novel molecular marker associated with *Tm2a* gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato. Plant Breeding. 2013;132(4):413-416. DOI: 10.1111/pbr.12076
- Park J., Bang H., Cho D.Y., Yoon M.K., Patil B.S., Kim S. Construction of high-resolution linkage map of the *Ms* locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica. 2013;192(2):267-278. DOI: 10.1007/s10681-012-0851-5
- Pasev G., Kostova D., Sofkova S. Identification of genes for resistance to *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus* in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding lines using conventional and molecular methods. J. Phytopathol. 2014;162(1):19-25. DOI: 10.1111/jph.12149
- Pavan S., Schiavulli A., Lotti C., Ricciardi L. CAPS technology as a tool for the development of genic and functional markers: Study in peas. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Perovic J., Silvar C., Koenig J., Stein N., Perovic D., Ordon F. A versatile fluorescence-based multiplexing assay for CAPS genotyping electrophoresis systems. Mol. Breeding. 2013;32(1):61-69. DOI: 10.1007/s11032-013-9852-x
- Poczai P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N., Valkonen J.P.T., Hyvönen J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: A review. Plant Methods. 2013;9(1):6. DOI: 10.1186/1746-4811-9-6
- Raats D., Yaniv E., Distelfeld A., Ben-David R., Shanir J., Bocharova V., Schulman A., Fahima T. Application of CAPS markers for genomic studies in wild emmer wheat. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Řepková J., Dreiseitl A., Lízal P. New CAPS marker for selection of barley powdery mildew resistance gene in the *Mla* locus. Cereal Research Communications. 2009;37(1):93-99. DOI: 10.1556/CRC.37.2009.1.11
- Sabatini E., Palma D., Ciriaci T., Acciarri N. Development and applications of CAPS markers in tomato breeding: Successful story about *OVATE* gene. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Salgotra R.K., Gupta B.B., Stewart J.C.N. From genomics to functional markers in the era of next-generation sequencing. Biotechnology Letters. 2014;36(3):417-426. DOI: 10.1007/s10529-013-1377-1
- Santo T., Rashkova M., Alabaça C., Leitão J. The ENU-induced powdery mildew resistant mutant pea (*Pisum sativum* L.) lines *S(er1mut1)* and *F(er1mut2)* harbour early stop codons in the *PsMLO1* gene. Mol. Breeding. 2013;32(3):723-727. DOI: 10.1007/s11032-013-9889-x
- Scarabel L., Panozzo S., Savoia W., Sattin M. Target-site ACCase-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) selected in summer dicot crops. Weed Technology. 2014;28(2):307-315. DOI: 10.1614/WT-D-13-00137.1

- Semagn K., Bjørnstad A, Ndjioudjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2006;5(25):2540-2568. DOI: 10.5897/AJB2006.000-5110
- Shavrukov Y. Why are the development and application of CAPS markers so different in bread wheat compared to barley? *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology*. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.
- Shavrukov Y., Gupta N.K., Miyazaki J., Baho M.N., Chalmers K.J., Tester M., Langridge P., Collins N.C. *HvNax3* – a locus controlling shoot sodium exclusion derived from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). *Functional and Integrative Genomics*. 2010;10(2):277-291. DOI: 10.1007/s10142-009-0153-8
- Smyda P., Jakuczun H., Debski K., Śliwka J., Thieme R., Nachtigall M., Wasilewicz-Flis I., Zimnoch-Guzowska E. Development of somatic hybrids *Solanum* × *michoacanum* Bitter. (Rydb.) (+) *S. tuberosum* L. and autofused 4x *S.* × *michoacanum* plants as potential sources of late blight resistance for potato breeding // *Plant Cell Rep.* 2013;32(8):1231-1241. DOI: 10.1007/s00299-013-1422-5.
- Song X., Deng Z., Gong L., Hu J., Ma Q. Cloning and characterization of resistance gene candidate sequences and molecular marker development in gerbera (*Gerbera hybrida*). *Sci. Hortic.* 2012;145:68-75. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.07.027
- Tan Y.Y., Fu H.W., Zhao H.J., Lu S., Fu J.J., Li Y.Fa., Cui H.R., Shu Q.Y. Functional molecular markers and high-resolution melting curve analysis of low phytic acid mutations for marker-assisted selection in rice. *Mol. Breeding*. 2013;31(3):517-528. DOI: 10.1007/s11032-012-9809-5
- Ui H., Sameri M., Pourkheirandish M., Chang M.C., Shimada H., Stein N., Komatsuda T., Handa H. High-resolution genetic mapping and physical map construction for the fertility restorer *Rfm1* locus in barley. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(2):283-290. DOI: 10.1007/s00122-014-2428-2
- Wang S., Wong D., Forrest K., Allen A., Chao S., Huang B.E., Maccaferri M., Salvi S., Milner S.G., Cattivelli L., Mastrangelo A.M., Whan A., Stephen S., Barker G., Wieseke R., Plieske J., Lillemo M., Mather D., Appels R., Dolferus R., Brown-Guedira G., Korol A., Akhunova A.R., Feuillet C., Salse J., Morgante M., Pozniak C., Luo M.C., Dvorak J., Morel M., Dubcovsky J., Ganai M., Tuberosa R., Lawley C., Mikoulitch I., Cavanagh C., Edwards K.J., Hayden M., Akhunov E. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12(6):787-796. DOI: 10.1111/pbi.12183
- Wu J., Cao X., Guo L., Qi T., Wang H., Tang H., Zhang J., Xing C. Development of a candidate gene marker for *Rf₁* based on a *PPR* gene in cytoplasmic male sterile CMS-D2 Upland cotton. *Breeding*. 2014;34(1):231-240. DOI: 10.1007/s11032-014-0032-4
- Yang R., Sun C., Bai J., Luo Z., Shi B., Zhang J., Yan W., Piao Z. A putative gene *sbe3-rs* for resistant starch mutated from *SBE3* for starch branching enzyme in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE*. 2012;7(8):e43026. DOI: 10.1371/journal.pone.0043026
- Yatabe-Kakugawa Y., Ootsuki R. Development and analysis of CAPS markers in ferns. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology*. Ed. Y. Shavrukov. NOVA Publisher: N.Y., 2014.