

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ BIOTECHNOLOGY AND PLANT GENETICS

УДК 577.22:633.11

DOI: <http://dx.doi.org/10.14258/turczaninowia.16.4.12>

М.Г. Куцев¹
 М.А. Холодкова¹
 М.С. Иванова¹
 Д.В. Балабова¹
 У.А. Боярских²
 Е.А. Храпов²
 О.В. Уварова¹
 А.А. Кечайкин¹
 Т.А. Синицына¹
 М.В. Скапцов¹
 С.В. Смирнов¹
 А.И. Шмаков¹

M.G. Kutsev
 M.A. Kholodkova
 M.S. Ivanova
 D.V. Balabova
 U.A. Boyarskikh
 E.A. Khrapov
 O.V. Uvarova
 A.A. Kechaykin
 T.A. Sinityna
 M.V. Skaptsov
 S.V. Smirnov
 A.I. Shmakov

МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА СОРТОВ *TRITICUM*. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ С ПОМОЩЬЮ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

MOBILE ELEMENTS IN GENOME OF WHEAT KINDS. QUANTITATIVE REAL-TIME PCR ANALYSIS

Аннотация. Исследовано относительное содержание ретротранспозонов Ty1/copia и 5.8S рДНК в геномах 9 сортов пшеницы. Разработана методика ПЦР с детекцией в режиме реального времени для выявления количества ретротранспозонов Ty1/copia и 5.8S рДНК. Выявлено повышенное относительное содержание ретротранспозонов в гексаплоидных сортах пшеницы по сравнению с тетраплоидными.

Ключевые слова: ретротранспозоны, Ty1/copia, 5.8S рДНК, количественная ПЦР, *Triticum*, генотипирование

Summary. Relative concentration of retrotransposone Ty1/copia and 5.8S rDNA in genomes of 9 kinds of wheat was revealed. A method of real-time PCR for detecting the amount of Ty1/copia and 5.8S rDNA is elaborated. Hexaploid kinds of wheat are found to have higher concentration of retrotransposones compared to tetraploid ones.

Key words: retrotransposons, Ty1/copia, 5.8S rDNA, quantitative PCR, *Triticum*, genotyping.

Введение. Несмотря на быстрые темпы развития высокопроизводительного полногеномного секвенирования, методики генотипирования, основанные только на ПЦР, не теряют своей актуальности. На момент написания статьи в генбанке NCBI была размещена полная чистовая последовательность только одной хромосомы

Triticum aestivum. При этом основная сложность секвенирования больших геномов состоит в наличии огромного количества повторяющихся элементов. Важное значение в установлении таксон-связанного количества определенных элементов генома имеет выявление соотношений генов многолокусной локализации с помощью мето-

¹Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 8; 630090, Новосибирск, Россия; tax@niboch.nsc.ru

¹Altai State University, Lenina str., 61; 656049, Barnaul, Russia; e-mail: m_kucev@mail.ru

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS, Siberian Branch, Lavrentyeva str., 8; 630090, Novosibirsk, Russia

да qPCR, являющегося в настоящее время одним из наиболее точных количественных методов. Кроме того, ПЦР «в реальном времени» является наиболее пригодным для скрининговых исследований при генотипировании живых организмов.

Изучением генетики пшениц как важной хозяйственной культуры занимаются множество научных коллективов. На сегодняшний момент времени наиболее полно изучены мягкие пшеницы, намного хуже обстоят дела с изучением генетики твердых пшениц (Кудрявцев, 2007). По сравнению с остальными хлебными злаками, для пшениц хорошо изучены генетические карты (Гончаров, 2002), частично расшифрован геном. Селекционеры и генетики вплотную придвинулись к созданию генетических паспортов существующих сортов и культиваров пшеницы. Все это не только позволяет привести в порядок существующие коллекции культиваров пшеницы, которых насчитывается в мире свыше 800 тыс. образцов (Митрофанова, 2012), но и создает предпосылки для ведения эффективной целенаправленной селекции пшениц.

В геноме пшениц до 70% от размера занимают мобильные генетические элементы ДНК (Li et al., 2004; Matsuoka, Tsunewaki, 1999). Со-

держание ретротранспозонов относительно размера генома достоверно различается и сильно варьирует по сортам и группам пшениц (Куцев и др., 2012). Предполагается, что именно мобильные генетические элементы оптимально использовать для генотипирования как твердых, и так мягких сортов пшеницы.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы свежих листьев проростков, полученных из зерновок при естественном освещении и фотопериоде 16/24. Возраст проростков составлял 2 недели. Проанализированы следующие сорта: Алтайская 530, Сибирский Альянс, Сударыня, Новосибирская 15, Тюменская 80 (мягкие сорта на основе *Triticum aestivum*), и Омский Изумруд, Алейская, Жемчужина Сибири, Памяти Янченко (твердые сорта на основе *Triticum durum*). Для анализа брали по 10 экземпляров растений каждого сорта (табл. 1).

Для выделения ДНК из растительного материала использованы наборы реагентов DiamondDNA (ООО «АБТ», Россия). Амплификация осуществлялась на термоциклере BioRad CFX96 Touch Real Time System. Амплификацию проводили по следующей программе: предварительная денатурация 94 °С – 3 мин.; в по-

Таблица 1

Характеристика сортов пшеницы, использованных в анализе

№	Название	Оригинатор	Происхождение	Использование
<i>Мягкие сорта</i>				
1	Алтайская 530	ГНУ Алтайский НИИСХ	(Лютесценс 281 × К-54975) × Лютесценс 281.	Включен в госреестр в 2007 г.
2	Сибирский Альянс	ГНУ Алтайский НИИСХ, ГНУ Кемеровский НИИСХ	(Лютесценс 281 × к-54975) × Лютесценс 281	Включен в госреестр в 2012 г.
3	Сударыня	ГНУ Владимирский НИИСХ	Разновидность: лютесценс	На испытаниях с 2009 г.
4	Новосибирская 15	ГНУ Сибирский НИИСХ	[(Безенчукская 98 × Иртышанка 10) × Тулунская 10] × Новосибирская 22	Включен в госреестр в 2003 г.
5	Тюменская 80	Тюменский СХИ, ГНУ НИИСХ Северного Зауралья	Безостная 1 × Саратовская 29	Районирован в 1985 г.
<i>Твердые сорта</i>				
6	Омский изумруд	ГНУ Сибирский НИИСХ	Гордеиформе 94-8-5 × Омская янтарная*	На испытаниях с 2010 г.
7	Алейская	ГНУ Алтайский НИИСХ	(Алтайская Нива × НТ-7) × Алтайская Нива	Включен в госреестр в 2005 г.
8	Жемчужина Сибири	ГНУ Сибирский НИИСХ	[(Антей × Леукурум 6953) × (Алмаз × Омский рубин)] × Светлана	Включен в госреестр в 2006 г.
9	Памяти Янченко	ГНУ Алтайский НИИСХ	Гордеиформе 235 × Зарница Алтая	Включен в госреестр в 2012 г.

Примечание: *Омская янтарная = Гордеиформе ЕК27-1-1 × Гордеиформе 3Л35-2.

следующих пятидесяти двух циклах 95 °С – 10 сек.; 59 °С – 45 сек. (на данном шаге – снятие уровня флуоресценции). Флуоресценцию оценивали в каналах FAM и VIC. Расшифровку последовательностей ДНК проводили на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500 с применением стандартного набора реагентов.

Результаты и обсуждения. Основной задачей ставилась разработка методики относительного количественного анализа мобильных элементов. Первоначально проведен скрининг последовательностей ДНК обратной транскриптазы ретротрансонов, т. к. этот участок является наиболее консервативным, и не имеем значительных перестроек. Следует отметить, что мобильные генетические элементы в ходе эволюции в геноме претерпевают постоянные изменения из-за мутационных процессов, кроссинговера, и постепенно «растворяются» в геноме. Изначально нами намеренно были выбраны гены, пригодные для построения мультиплексной системы ПЦР «в реальном времени». Такие гены должны соответствовать ряду правил:

- копияемость (количество копий в геноме) анализируемого и референсного генов должна быть соизмеримой;
- гены должны иметь консервативные участки для создания праймеров и зондов;
- G/C-составы анализируемого и референсного генов должна быть по возможности соизмеримыми для близких температурных характеристик программы амплификации.

Первоначально в качестве анализируемых генов нам были взяты последовательности, кодирующие обратную транскриптазу (RT) ретротрансонов семейств non-LTR-типа – LINE и LTR-типа – *Ty1/copia*. Однако в дальнейшем оказалось невозможным добиться количественной ПЦР для гена LINE и в последующем анализе он не использован. Копийность (число копий) *Ty1/copia* *Triticum aestivum* составляет порядка 80 000 на диплоидный геном (Liu et Somerville, 1996).

В качестве референсного гена нами выбран участок 5.8S, кодирующий рРНК рибосомальной субъединицы 5S. Ядерные гены, кодирующие рРНК (рДНК), были предметом многих исследований у растений и других организмов. Количество копий рДНК растений может достигать 30000 на клетку (Dubouz, Shinoda, 1999). Пшеницы имеют среднее значение копииности 5.8S для *T. aestivum* порядка 8800–9000 копий на диплоидный геном, а для *T. durum* – порядка 8300 копий (Flavell, O'Dell, 1979; Flavell, Smith, 1974; Luo et al., 1998). Количество основных класте-

ров рДНК (ядрышковых организаторов) у тетраплоидных сортов пшениц – 4 субтерминальных, у гексаплоидных – 6 (четыре субтерминальных, 2 терминальных) (Abd El-Twab, 2007; Carvalho et al., 2011). И *Ty1/copia*, и 5.8S рДНК являются умеренно могокопийными генами.

Выбор участков с более высокой копийностью, возможно, вызвал бы проблемы с постановкой количественной ПЦР из-за перегрузки ДНК, т. к. большое исходное количество матрицы снижает эффективность ПЦР из-за сдвига от оптимума соотношения праймер/матрица.

Первоначально была проанализирована 91 последовательность обратной транскриптазы *Ty1/copia* и 73 последовательности 5.8S рДНК пшениц.

Выравнивание последовательностей произведено в программе Mega 5.0 (Tamura et al., 2011) с помощью алгоритма Clustal (Higgins, Sharp, 1988, 1989; Higgins et al., 1992).

В результате выравнивания выявлен «прямой» (5'-фланкирующий) стабильный участок *Ty1/copia* ретротранспозона пшениц: GAAGAGTTGTATATGATGCAACCAGAAGGTTTТ и «обратный» (3'-фланкирующий) стабильный участок *Ty1/copia* ретротранспозона пшениц: CTGGTGCAAGCCTCTCGGAGTTGGAA. Аналогичным образом выявлены мономорфные участки 5.8S пшениц: «прямой» – CAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAG; «обратный» – CATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGC GCCCGAGGCCACTCG.

Ранее нами была предпринята попытка проанализировать копииность ретротранспозонов *Ty1/copia* пшениц с использованием системы неспецифической ПЦР на основе интеркалирующего красителя Syto 9 (Куцев и др., 2012), однако такая система полностью непригодна для мультиплексирования. Разработка праймеров и систем ПЦР «в реальном времени» *Ty1/copia* 5.8S пшениц сопряжена с рядом очень серьезных ограничений. Во-первых, для всех видов ретротранспозонов отсутствуют стабильные внутренние участки амплифицируемых генов, что накладывает ограничение на использование систем, подобных TaqMan и Molecular Beacons; таким образом, невозможно создать мультиплексную систему на основе специфичных разрушаемых проб. Во-вторых, стабильные 5'- и 3'-фланкирующие участки очень коротки и имеют множество повторов (что не дает возможности использования таких систем, как FRET-зонды и Scorpions). За основу мультиплексной ПЦР нами взяты подходы, реализуемые при создании Amplifluor-праймеров и LUX-праймеров.

Последовательность праймеров подбирали с помощью программы Primer3 (Rozen, Skaletsky, 2000) с учетом максимально близких для обеих пар расчетных температур отжига и плавления продуктов амплификации на стабильные участки.

Праймеры LUX™ содержат 4–6 оснований на 5' конце праймера, который является комплементарным к внутренней последовательности праймера около 3' конца. Флуорофор присоединен ближе к концу 3' праймера (Stockett, Wittwer, 2001). Сигнал флуорофора гасится в растворе, если молекула праймера находится в виде шпильки. Флуорофор особенно сильно заглушен в непосредственной близости от остатков гуанидина. Во время первого цикла ПЦР праймеры LUX™ включаются в новую нить, когда дополнительная (вторая) нить воспроизводится, шпилька переходит в линейное состояние. Это структурное изменение увеличивает флуоресцентный сигнал в 10 раз по сравнению с фоновым. Однако классические праймеры LUX™ возможно создать, только если внутренняя их последовательность имеет в своем составе определенный набор нуклеотидов. В противном случае гашения не происходит, и чувствительности оптической части амплификатора недостаточно для обнаружения нарастания сигнала (Nazarenko et al., 2002). Классические праймеры Amplifluor™ имеют подобную LUX-структуру и дополнительно гаситель и флуорофор, расположенные как можно более близко к 5' концу. Ранее указывалось о нежелательности выбора комплементарного участка близко к 3' концу праймера (Nazarenko et al., 1997). Однако нами выявлено недостаточное «разгорание» классических праймеров Amplifluor™ при длине шпильки менее 10 пар нуклеотидов, поэтому, как и в технологии LUX™, флуорофор размещали на урацил-подобную структуру как можно ближе к 3' концу, а гаситель – на 5' конце праймера. Несколько низкая эффективность работы подобных праймеров из-за конкуренции шпильки с матрицей компенсировалась повышением их концентрации в растворе (табл. 2).

Полученные последовательности праймеров проанализированы с помощью Primer BLAST (Altschul et al., 1990) на предмет гомологии с другими участками ДНК, представленными в генбанке NCBI. При этом выявлено, что последовательности праймеров, выбранных нами для количественной ПЦР 5.8S рДНК пшениц, стабильны у всех покрытосеменных и могут быть использованы для выявления копияности рДНК как однодольных, так и двудольных.

Предварительно подбирали концентрации основных компонентов реакционной смеси для достижения количественных показателей ПЦР в серии разведений и получения прямой зависимости номера порогового цикла ПЦР от количества матрицы ДНК в пробе (рис. 1). Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 12,5 мкл содержала: вода – 8,8 мкл; 10X-буфер (с 1,5 мМ MgCl₂) – 1,25 мкл; праймер TT-R (10 мкМ) – 0,18 мкл; праймер TT-F(L)-fam (10 мкМ) – 0,32 мкл.; праймер 5.8-R (10 мкМ) – 0,15 мкл; праймер 5.8-F(L)-vic (10 мкМ) – 0,3 мкл; dNTPs (20 мМ) – 0,5 мкл; Taq-полимераза – 0,5 ед.; ДНК – 0,5 мкл.

Далее проводили ПЦР всех образцов всех сортов пшениц (рис. 2) и рассчитывали разницу пороговых циклов ПЦР в каналах детекции прибора VIC и FAM (рис. 3).

По ряду вероятных схем происхождения пшениц, *Triticum durum* – прародитель современных сортов твердых пшениц – образовался в результате доместикации *T. dicocum* с генотипом AABB, а *T. aestivum* – в результате аллополиплоидизации *T. dicocum* и *Aegilops tauschii* (*A. squarrosa*) с генотипом DD (Dvorak et al., 1993; Goncharov et al., 2008). Н. Swift (1950) ввел термин «Сх-значение» – количество ДНК в гаплоидных геномах. Таким образом, термин «моноплоидный размер генома» (1Сх) связан с содержанием ядерной ДНК в базовом наборе хромосом (х) соматических клеток (Greilhuber et al., 2005), и, следовательно, значение 2Сх относится ко всему размеру генома соматической клетки. Известно, что мягкие пшеницы являются гексаплоидами (2n=6x=42; AABBDD; 1Сх =

Таблица 2

Характеристики олигонуклеотидных праймеров для амплификации Tyl/copia и 5.8S

Участок	Название	Последовательность 5'-3'	Конц. в ПЦР-смеси, мкМ
Tyl/copia	TT-F(L)-fam	BHQ1-ATCATAAGAAGAGTTGTATATGAT(dT-FAM)GCAA	0,256
	TT-R	AACTCCGAGAGGCTTGCACCAG	0,144
5.8S	5.8-F(L)-vic	BHQ2-AGAGCCAACGGATATCTCGGCTCT(dT-VIC)C	0,24
	5.8-R	CTTGCGTTCAAAGACTCGAT	0,12

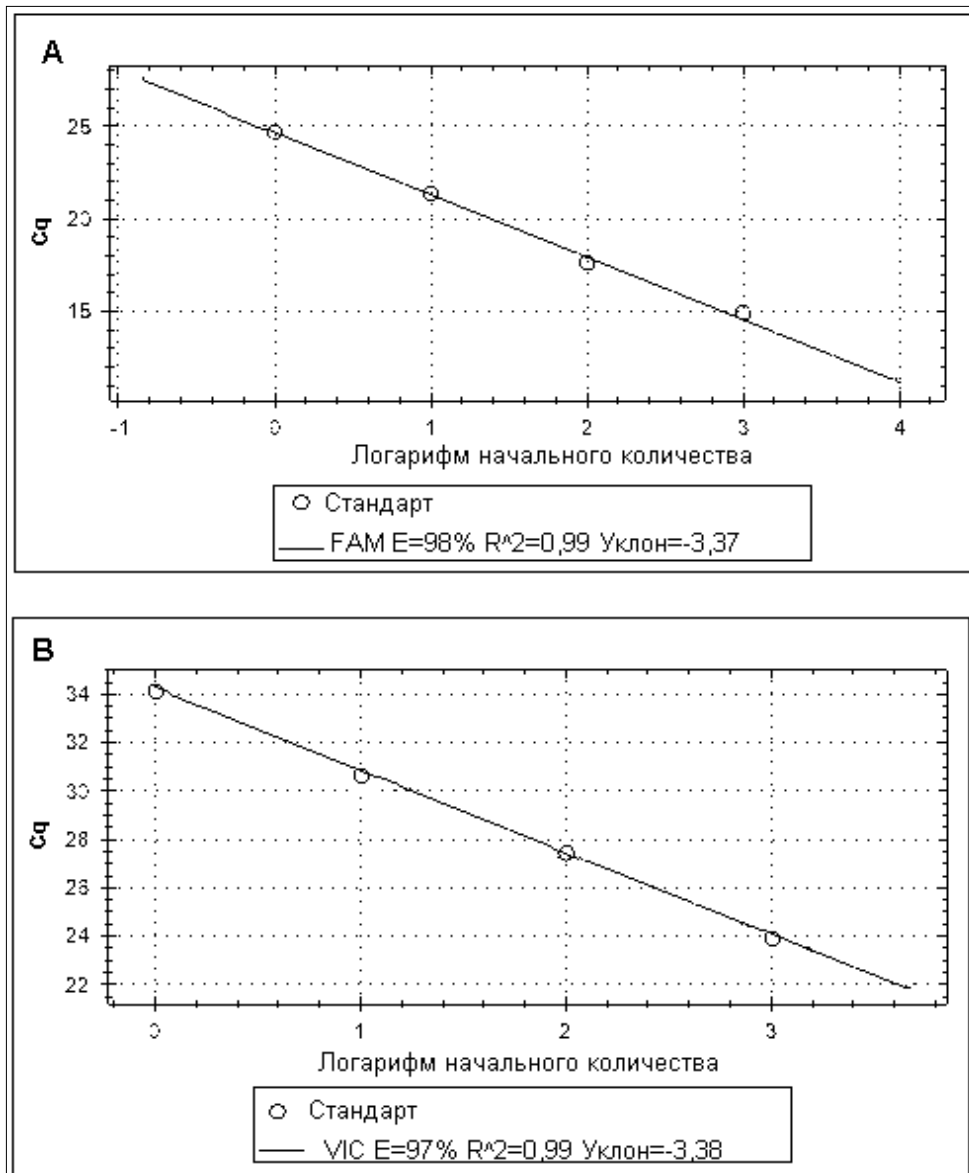


Рис. 1. Калибровочные прямые количественной ПЦР участков Tu1/соріа (А) и 5.8S (В) на примере сорта «Жемчужина Сибири».

17,33 пг), а твердые – тетраплоидами ($2n=4x=28$; ААВВ; $1Cx=12,66$ пг) (Bennett, Smith, 1976; Boyko et al., 1984). Следовало бы ожидать, что увеличение размера генома мягких пшениц произошло за счет простой полиплоидизации и пропорционального увеличения всех элементов генома. Однако сравнение 2,9 Mbp случайных последовательностей из D-генома *Aegilops tauschii* дало возможность предположить, что больший размер В-генома связан с более высоким содержанием в нем повторяющихся элементов (Rauch et al., 2006). Это также подтверждается и результатами наших исследований. Твердые сорта пшениц достоверно отличаются по относительному содержанию ретротранспозонов Tu1/соріа и кодирующей рибосомальную РНК ядерной ДНК от мягких сортов. Для сортов №№ 1–5 (мягкие пшеницы) относительное содержа-

ние ретротранспозонов Tu1/соріа по результатам ПЦР значительно выше, чем у сортов №№ 6–9 (твердые сорта), а разница $1Cx$ для двух групп сортов связана именно с различным содержанием мобильных элементов в геномах. Следует отметить, что показатель $CqVIC-CqFAM$ имеет меньшее среднее значение среди мягких пшениц для старого сорта «Тюменская 80». Это, по-видимому, связано с увеличением количества мобильных элементов в ходе длительного возделывания сорта. Таким образом, увеличение размера геномов пшениц в ходе селекции шло за счет увеличения в основном количества мобильных и других элементов, а не кодирующих генов.

Разница относительного содержания ретротранспозонов в пределах сорта зависит главным образом от сортовой чистоты и генетической гомогенности материала, а не от погрешности ме-

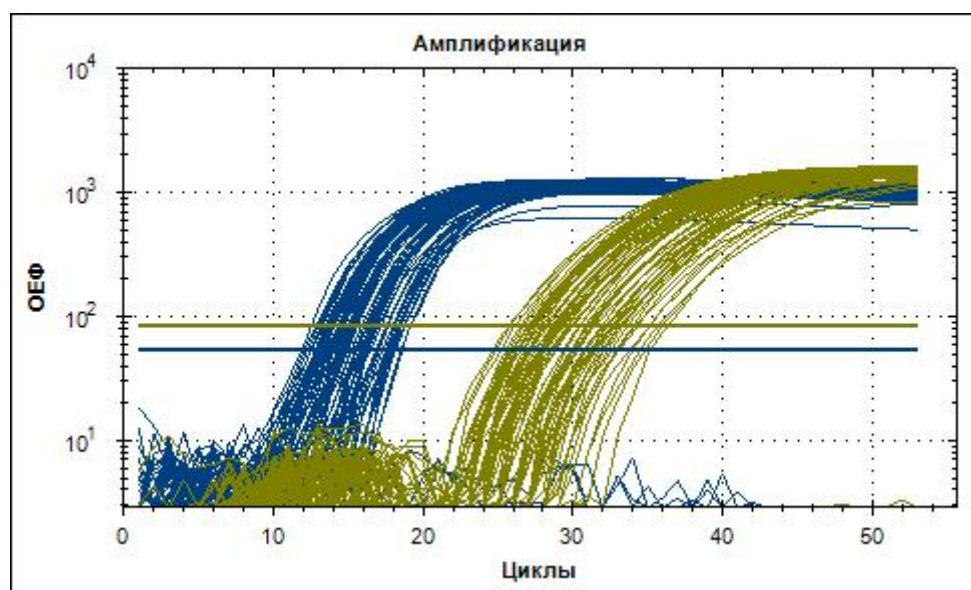


Рис. 2. Результаты мультиплексной ПЦР всех образцов пшеницы.

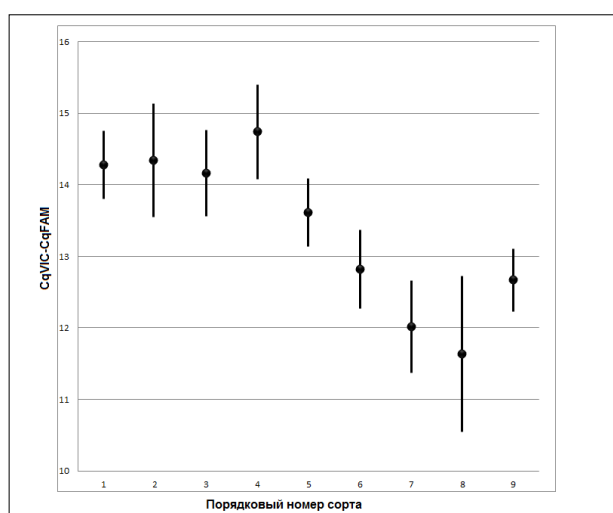


Рис. 3. Разница пороговых циклов амплификации 5.8S (VIC) и Tu1/соріа (FAM) пшениц: среднее значение и стандартное отклонение (нумерация сортов в соответствии с табл. 1).

тодики, т. к. в эксперименте по количественной ПЦР отдельного образца пшениц в нескольких повторностях разброс значения CqVIC-CqFAM не превышал 0,2.

По нормам, сортовая чистота высеваемых семян должна быть не менее: на общих посевах

семеноводческих хозяйств – 99,5%; на семенных участках сельхозпроизводителей – 98,0%; на общих площадях сельхозпроизводителей – 95,0%; сортовая чистота семян элиты – 99,8%. Засорение сортовых семян может произойти и после полевой апробации и возделывании в течение длительного периода. Определение сортовой чистоты в основном проводится по морфометрическим показателям, детерминированным не только генетически, но и условиями возделывания. Точность определения сортовой чистоты также зачастую зависит от квалификации эксперта. Поэтому большое значение имеет определение подлинности семян лабораторными методами. Таким образом, метод выявления относительного содержания ретротранспозонов с помощью количественной ПЦР можно использовать при проведении селекционных мероприятий и оценке качества семян пшениц.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Государственный контракт № 14.740.11.1038 от 23 мая 2011 г.).

ЛИТЕРАТУРА

- Гончаров Н.П.** Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 252 с.
- Митрофанова О.П.** Генетические ресурсы пшеницы в России: состояние и предселекционное изучение // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012. – Т. 16, № 1. – С. 10–20.
- Кудрявцев А.М.** Создание системы генетических маркеров твердой пшеницы (*T. durum* Desf.) и ее применение в научных исследованиях и практических разработках: Дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 2007. – 305 с.
- Куцев М.Г., Холодкова М.А., Смирнов С.В., Фризен Н.В.** Сравнительный анализ распределения ретротранспозона Tu1-соріа в сортах пшеницы // Turczaninowia, 2012. – Т. 15, № 4. – С. 95–97.

- Abd El-Twab M.H.** Physical mapping of the 45S rDNA on the chromosomes of *Triticum turgidum* and *T. aestivum* using fluorescence in situ hybridization for chromosome ancestors // Arab Journal of Biotechnology, 2007. – Vol. 10, № 1. – P. 69–80.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D.** Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology, 1990. – Vol. 215, № 3. – P. 403–410.
- Bennett M.D., Smith J.B.** Nuclear DNA amounts in angiosperms // Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences, 1976. – Vol. 274. – P. 227–274.
- Boyko E.V., Badaev N.S., Maximov N.G., Zelenin A.V.** Does DNA content change in the course of *Triticale* breeding // Cereal Research Communications, 1984. – № 12. – P. 99–100.
- Carvalho A., Guedes-Pinto H., Lima-Brito J.** Intergenic spacer length variants in Old Portuguese bread wheat cultivars // Journal of Genetics, 2011. – Vol. 90, № 2. – P. 203–208.
- Crockett A.O., Wittwer C.T.** Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time pcr: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides // Anal. Biochem., 2001. – Vol. 290. – P. 89–97.
- Dubouzet J.G., Shinoda K.** ITS DNA sequence relationships between *Lilium concolor* Salisb., *L. dauricum* Ker-Gawl. and their putative hybrid, *L. maculatum* Thunb // Theoretical and Applied Genetics, 1999. – Vol. 98, № 2. – P. 213–218.
- Dvorak J., Tetizi P., Zhang H.B., Resta P.** The evolution of polyploid wheats: identification of the a genome donor species // Genome, 1993. – Vol. 36, № 1. – P. 21–31.
- Flavell R.B., O'Dell M.** The genetic control of nucleolus formation in wheat // Chromosoma, 1979. – Vol. 71. – P. 135–152.
- Flavell R.B., Smith D.B.** Variation in nucleolar organiser rRNA gene multiplicity in wheat and rye // Chromosoma, 1974. – Vol. 47. – P. 327–334.
- Goncharov N.P., Golovnina K.A., Kilian B., Glushkov S., Blinov A., Shumny V.K.** Evolutionary history of wheats – the main cereal of mankind // Biosphere origin and evolution / Eds. N. Dobretsov et al. – Springer, 2008. – P. 407–419.
- Greilhuber J., Dolezel J., Lysak M.A., Bennett M.D.** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “Genome Size” and “C-Value” to describe nuclear DNA contents // Annals of Botany, 2005. – Vol. 95. – P. 255–260.
- Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R.** CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // Comput. Appl. Biosci., 1992. – Vol. 8. – P. 189–191.
- Higgins D.G., Sharp P.M.** CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer // Gene, 1988. – Vol. 73. – P. 237–244.
- Higgins D.G., Sharp P.M.** Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer // Comput. Appl. Biosci., 1989. – Vol. 5. – P. 151–153.
- Li W., Zhang P., Fellers J.P., Friebe B., Gill B.S.** Sequence composition, organization, and evolution of the core *Triticeae* genome // Plant Journal, 2004. – Vol. 40, № 4. – P. 500–511.
- Liu K., Somerville S.** Cloning and characterization of a highly repeated DNA sequence in *Hordeum vulgare* L. // Genome, 1996, Dec. – Vol. 39, № 6. – P. 1159–1168.
- Luo M.-C., Yang Z.-L., Dvorak J.** Position effects of ribosomal RNA multigene loci on meiotic recombination in wheat // Genetics, 1998. – Vol. 149. – P. 1105–1113.
- Matsuoka Y., Tsunewaki K.** Evolutionary dynamics of Ty1-copia group retrotransposons in grass shown by reverse transcriptase domain analysis // Molecular Biology and Evolution, 1999. – Vol. 16, № 2. – P. 208–217.
- Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A.** Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes // Nucleic Acids Research, 2002. – Vol. 30. – P. 2089–2195.
- Nazarenko I.A., Bhatnager S.K., Hohman R.J.** A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer // Nucleic Acids Research, 1997. – Vol. 25. – P. 2516–2521.
- Paux E., Roger D., Badaeva E., Gay G., Bernard M., Sourdille P., Feuillet C.** Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B // Plant Journal, 2006. – Vol. 48, № 3. – P. 463–474.
- Rozen S., Skaletsky H.J.** Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers / Eds. S. Krawetz, S. Misener. – Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. – Totowa: Humana Press, 2000. – P. 365–386.
- Swift H.** The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei // Proceedings of the National Academy of Sciences, 1950. – Vol. 36. – P. 643–654.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Molecular Biology and Evolution, 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.