

ДНК-ФИНГЕРПРИНТИНГ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *BETA VULGARIS* L.

Татьяна Петровна Федулова¹
Дмитрий Николаевич Федорин¹
Михаил Алексеевич Богомолов¹
Галина Геннадьевна Голева²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова

²Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Представлены результаты экспериментальных исследований по анализу полиморфизма микросателлитных локусов в генетических ресурсах свеклы рода *Beta*. На основе полученной генетической информации создана пополняемая база данных SSR- и RAPD-фингерпринтов изученных генотипов сахарной, кормовой белой, кормовой красной свеклы и гибридов на их основе. Данная база включает информацию об идентифицированных аллелях SSR- и RAPD-локусов. Цель исследований – изучение генетического разнообразия *Beta vulgaris* L. на основе различных типов ДНК-маркеров. В качестве материалов для исследований были использованы проростки разновидностей корнеплодной кормовой красной и белой свеклы (*convar. crassa* Alef.), МС-линий сахарной свеклы (*convar. saccharifera* Alef.), а также гибридов, полученных с их участием. В работе были использованы праймеры к микросателлитным локусам Sb11, Sb13, Sb15 и RAPD-праймеры (OPAR-16, OPAX-10, OPP-14). Выявлены специфические ПЦР-продукты длиной 1000 п.н. для МС-линии 2113 по локусу Sb13, что отличает ее от других генотипов и может служить генетическим маркером для идентификации. Установлено, что максимальная гетерогенность селекционных материалов сахарной, кормовой красной и кормовой белой свеклы обнаруживается с помощью праймера OPAX-10. RAPD-праймер OPP-14 может использоваться для идентификации образца № 12 (МС 2093), так как только с ним была обнаружена отличительная особенность, проявляющаяся в формировании ампликона длиной 900 п.н. Обнаружено наличие специфического ампликона для кормовой свеклы длиной 700 п.н. по локусу Sb11, что может являться одним из маркерных признаков при ее паспортизации. Результаты представленных молекулярно-генетических исследований имеют теоретическое и практическое значение в селекционном процессе сахарной свеклы.
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: свекла сахарная, кормовая свекла, генетическое разнообразие, SSR- и RAPD-локусы, ДНК-фингерпринтинг.

DNA FINGERPRINTING IN STUDYING THE GENETIC DIVERSITY OF *BETA VULGARIS* L.

Tatiana P. Fedulova¹
Dmitriy N. Fedorin¹
Mikhail A. Bogomolov¹
Galina G. Goleva²

¹A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

²Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

The authors present the results of experimental studies on the analysis of microsatellite loci polymorphism in genetic resources of the genus *Beta*. On the basis of the obtained genetic information the authors have created an appendable database of SSR and RAPD fingerprints of the studied genotypes of sugar, fodder white, and fodder red beet and hybrids derived from them. This database includes the information on identified alleles of SSR and RAPD loci. The objective of research was to study the genetic diversity of *Beta vulgaris* L. on the basis of different types of DNA markers. Study materials included germs of the following types of rhizocarpous beet: fodder red and white beet (*convar. crassa* Alef.), sugar beet MS lines (*convar. saccharifera* Alef.), and hybrids derived from them. The following primers for microsatellite loci were also used for research: Sb11, Sb13, Sb15 and RAPD primers (OPAR-16, OPAX-10, and OPP-14). Specific PCR products of 1 000 b.p. in length for the MS line 2113 have been revealed by Sb13 locus. This distinguishes this line from other genotypes and can serve as a genetic marker for identification. It is established that the maximum heterogeneity of breeding materials of sugar, fodder red and fodder white beet was revealed using the OPAX-10 primer. The OPP-14 RAPD primer can be used for identification of sample No. 12 (MS 2093), since it was the only primer that could reveal the specific feature manifesting itself in the formation of amplicon of 900 b.p. The authors also revealed the presence of a specific amplicon for fodder beet of 700 b.p. for Sb11 locus, which may be one of marker characteristics for its certification. The results of the presented molecular-genetic studies are of theoretical and practical importance in sugar beet breeding process.

KEYWORDS: sugar beet, fodder beet, genetic diversity, SSR and RAPD loci, DNA fingerprinting.

Введение
 Эффективная идентификация видов растений, отслеживание их филогенетических отношений вызывали и продолжают вызывать интерес на всех этапах развития биологической науки. Возможность отличать представителей близких видов друг от друга может быть осложнена высоким полиморфизмом внутри каждого из видов или, напротив, межвидовым морфологическим сходством [1].

В последнее время развитие молекулярных методов дало возможность применять молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетических исследований. Данные методы, конечно, не могут полностью заменить классические подходы, но способны эффективно их дополнить. Основой молекулярных подходов является закономерность корреляции степени генетического родства между живыми организмами с уровнем сходства в гомологичных последовательностях нуклеиновых кислот и белков.

Знание генетического разнообразия сельскохозяйственных культур и наследуемости признаков может привести к соответствующим схемам отбора в селекционных программах, работающих с растениями [9]. Известно, что общее генетическое разнообразие видов *Beta*, включая сахарную свеклу, другие свекловичные культуры и их диких родственников, сравнительно высоко [15]. У сахарной свеклы временами оказывается, что отбор уменьшил генетическую изменчивость у улучшенных сортов [12]. Так, было применено множество методов, использующих морфологические и молекулярные маркеры, чтобы проанализировать разнообразие и способствовать управлению генетическими ресурсами. Молекулярные маркеры обычно используются, чтобы охарактеризовать наследственную изменчивость в пределах и между популяциями и обеспечить эффективные средства, чтобы связать фенотипические и генотипические изменения. Несмотря на преимущества и недостатки обоих типов маркеров, рекомендуется их комбинированное использование для усиления разрешающей способности генетического разнообразия [8].

Для сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) были разработаны и использованы различные типы биохимических и молекулярных маркеров. Для картирования и составления «фингерпринтов» (fingerprint – определение профиля фрагментов ДНК) также использовались AFLPs (полиморфизмы длины усиленного фрагмента) [2]. Вне зависимости от методики результатом эксперимента будет набор фрагментов ДНК, число которых и электрофоретическая подвижность различаются между генотипами. Чем больше совпадающих фрагментов в полученных профилях, тем более родственными считаются изучаемые генотипы.

Среди целого ряда молекулярных маркеров SSR-локусы получили широко распространенное применение в генетике и селекции растений благодаря многим желательным свойствам, включая сверхизменчивость, мультиаллельную природу, кодоминантное наследование, воспроизводимость, относительное изобилие, расширенный охват генома и специфическое расположение на хромосоме [10, 11]. Кодоминантная природа SSR-маркеров позволяет оценить аллельные взаимосвязи среди генотипов – свойство, которое делает этот технический прием особенно подходящим для применения на сахарной свекле как самонесовместимой и перекрестно-опыляемой культуры [6]. Для сахарной свеклы созданы несколько сотен SSR-маркеров, и открыто доступны генетические карты, основанные на данных маркерах [3, 5].

В связи с этим использование различных типов ДНК-маркеров для изучения генетического разнообразия *Beta vulgaris* L. является актуальным.

Материалы и методы

Материалами для исследований служили проростки разновидностей корнеплодной кормовой красной и кормовой белой свеклы (*convar. crassa* Alef.), МС-линий сахарной свеклы (*convar. saccharifera* Alef.), гибридов, полученных с их участием.

Геномную ДНК выделяли из растительной ткани фенол-хлороформным методом [4, 14]. Качество выделенной ДНК определяли методом электрофореза в присутствии бро-

мистого этидия. Полученную ДНК растворяли в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, и использовали для ПЦР-анализа.

Полимеразно-цепная реакция проводилась на амплификаторе «Genues» (Великобритания). В работе были использованы праймеры к микросателлитным локусам генома Sb11, Sb13, Sb15 [13], а также RAPD-праймеры OPAR-16, OPAX-10, OPP-14 [7]. Нуклеотидные последовательности и характеристики данных праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика используемых праймеров

Название	Нуклеотидные последовательности
Sb11	Forward: 5'-CGA GGG GTA AAA CCA GAC AA-3' Reverse: 5'-GGT TCT GAA ATT TGG GGG TT-3'
Sb13	Forward: 5'-ACA GCA AGA TCA GAG CCG TT-3' Reverse: 5'-TGG ACC CAC CAT TTA CAT CA-3'
Sb15	Forward: 5'-CAC CCA GCC TAT CTC TCG AC-3' Reverse: 5'-GTG GTG GGC AGT TTT AGG AA-3'
OPAR-16	5'-CCTTGCGCCT-3'
OPAX-10	5'-CCAGGCTGAC-3'
OPP-14	5'-CCAGCCGAAC-3'

Параметры амплификации были следующие:

- предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин.;
- затем 35 циклов при 95°C – 30 с, 54–56°C – 30 с, 72°C – 30 с;
- финальный этап элонгации цепи при 72°C – 1 мин.

Результаты и их обсуждение

Результаты ПЦР-анализа с RAPD-праймерами OPAX-10 геномной ДНК образцов сахарной, кормовой свеклы и гибридов с их участием, полученные лабораторией исходного материала, показали их невысокий генетический полиморфизм (рис. 1, табл. 2).

На всех представленных рисунках и в таблицах использованы следующие обозначения:

- № 20 (Б) – кормовая красная свекла;
- № 3-1 – МС 94 × кормовая красная свекла;
- № 19 – кормовая белая свекла;
- № 4 – МС 94;
- № 10 – МС 2113;
- № 2-4 – Триумф;
- № 12 – МС 2093;

М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (Thermo Scientific, США): снизу вверх – 500, 600, 700, 800, 900, 1000 п.н.

№ 20 (Б) № 3-1 № 19 № 4 № 10 № 2-4 № 12 М



Рис. 1. Амплификация геномной ДНК образцов с праймером OPAX-10

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

Таблица 2. Полиморфизм исследуемых образцов свеклы лабораторного исходного материала на основе амплификации с праймером OPAХ-10

Ампликон, п.н.	Образцы						
	№ 20 (Б)	№ 3-1	№ 19	№ 4	№ 10	№ 2-4	№ 12
500	1	1	1	0	0	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
1500	0	0	1	1	1	1	1
P, %	66	66	100	66	66	100	100

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, уровень полиморфизма по данному локусу варьировал от 66 до 100%. В результате амплификации геномных ДНК растений свеклы установлено, что гибриды № 3-1 (F₁МС 94 × кормовая красная) и Триумф имеют однородный генетический материал. Оба продукта ПЦР-амплификации с длинами 500 и 1500 п.н. характерны для родительской формы № 20 ОП-кормовая белая. Гибрид № 3-1 также имеет сходный признак со второй родительской формой – МС 94 с длиной 500 п.н.

Анализ результатов ПЦР с праймерами ОРР-14 свидетельствует об отсутствии ампликонов со всеми используемыми для генетического анализа ДНК, кроме образца № 12 (МС 2093), что может являться селективным признаком данного генотипа свеклы (табл. 3).

Таблица 3. Полиморфизм исследуемых образцов свеклы на основе амплификации с праймером ОРР-14

Ампликон, п.н.	Образцы						
	№ 20 (Б)	№ 3-1	№ 19	№ 4	№ 10	№ 2-4	№ 12
900	-	-	-	-	-	-	+
P, %	0	0	0	0	0	0	100

По RAPD-локусу OPAР-16 характерна однородность продуктов амплификации как для родительских форм, так и для гибридов. Во всех образцах ДНК обнаружено 3 ПЦР-продукта с длинами 800, 900 и 1000 п.н. (табл. 4).

Таблица 4. Матрица наличия/отсутствия ДНК-фрагментов и полиморфизм образцов свеклы по локусу OPAР-16

Ампликон, п.н.	Образцы						
	№ 20 (Б)	№ 3-1	№ 19	№ 4	№ 10	№ 2-4	№ 12
800	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1
100	1	1	1	1	1	1	1
P, %	100	100	100	100	100	100	100

Анализ результатов ПЦР-образцов с SSR-праймерами Sb11 свидетельствует о наличии специфического ампликона для кормовой свеклы с длиной 700 п.н. У гибридов данный признак отсутствует (рис. 2, табл. 5). Для всех исследуемых образцов был установлен сходный признак, проявляющийся в амплификации продукта с длиной 500 п.н.

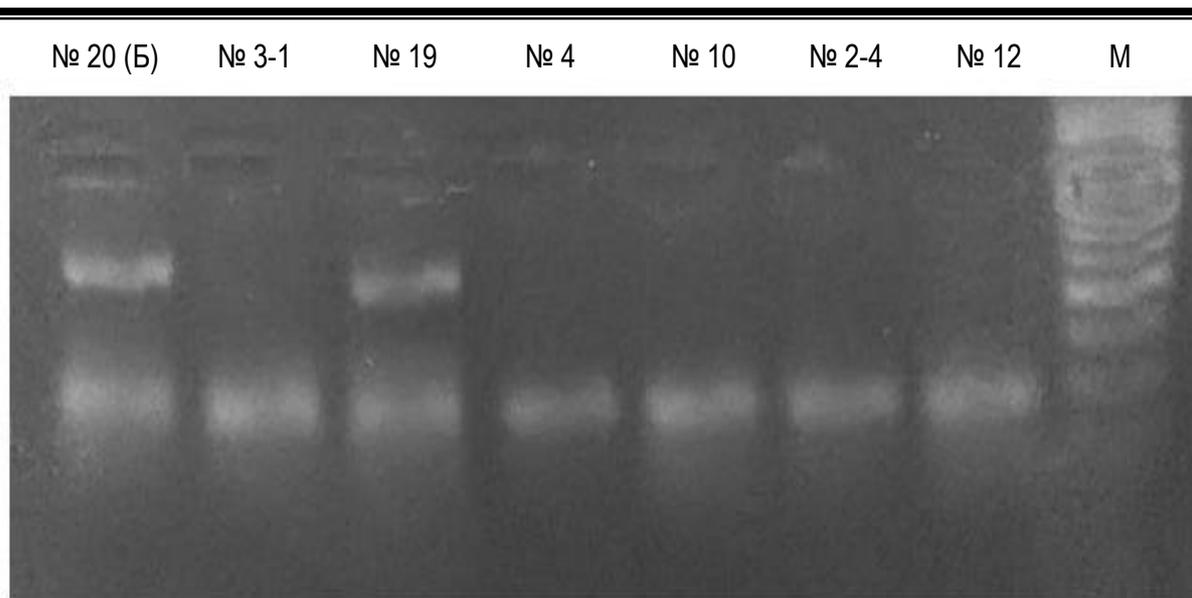


Рис. 2. Амплификация геномной ДНК образцов с праймером Sb11

Таблица 5. Матрица наличия/отсутствия ДНК-фрагментов и полиморфизм образцов свеклы по локусу Sb11

Ампликон, п.н.	Образцы						
	№ 20 (Б)	№ 3-1	№ 19	№ 4	№ 10	№ 2-4	№ 12
500	1	1	1	1	1	1	1
700	1	0	1	0	0	0	0
P, %	100	50	100	50	50	50	50

По микросателлитному локусу Sb13 выявлено наличие специфического ампликона для образца № 10 (МС 2113) с длиной 1000 п.н. Для остальных генотипов свеклы как родительских форм, так и их гибридов характерен идентичный набор ампликонов с длинами 500 и 800 п.н. (рис. 3, табл. 6).

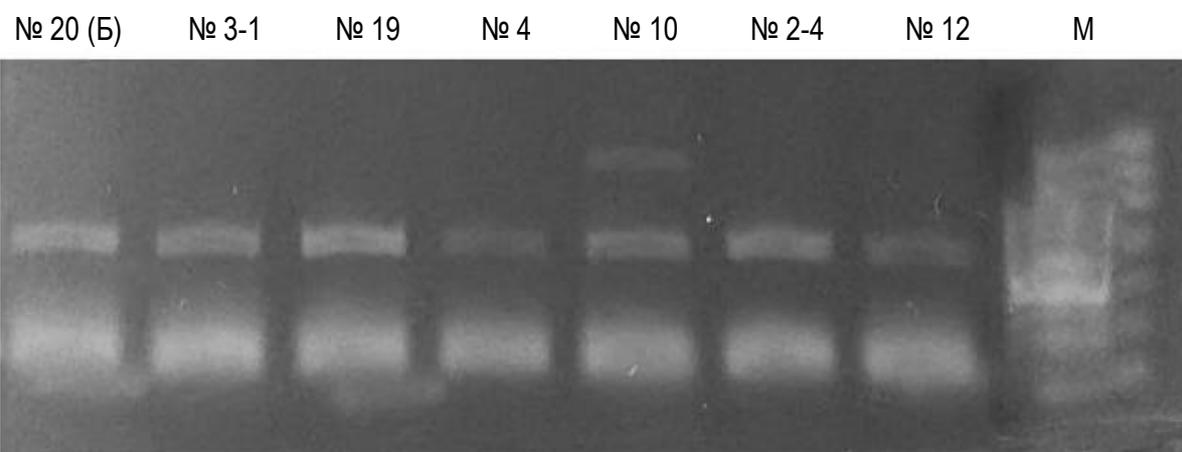


Рис. 3. Амплификация геномной ДНК образцов с праймером Sb13

Таблица 6. Матрица наличия/отсутствия ДНК-фрагментов и полиморфизм образцов свеклы по локусу Sb13

Ампликон, п.н.	Образцы						
	№ 20 (Б)	№ 3-1	№ 19	№ 4	№ 10	№ 2-4	№ 12
500	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	0	1	0	0
P, %	66	66	66	66	100	66	66

По SSR-локусу Sb15 установлена однородность генетического материала всех исследуемых образцов, что проявляется в обнаружении единственного ампликона с длиной 500 п.н. (рис. 4, табл. 7).

№ 20 (Б) № 3-1 № 19 № 4 № 10 № 2-4 № 12 М



Рис. 4. Амплификация геномной ДНК образцов с праймером Sb15

Таблица 7. Полиморфизм исследуемых образцов свеклы по локусу Sb15

Ампликон, п.н.	Образцы						
	№ 20 (Б)	№ 3-1	№ 19	№ 4	№ 10	№ 2-4	№ 12
500	1	1	1	1	1	1	1
P, %	100	100	100	100	100	100	100

На основании результатов проведенного молекулярно-генетического анализа показано, что максимальная гетерогенность селекционных материалов сахарной, кормовой красной и кормовой белой свеклы обнаруживается при использовании праймера OPAX-10. RAPD-праймер OPP-14 может использоваться для идентификации образца № 12 (МС 2093), так как только с ним была обнаружена отличительная особенность, проявляющаяся в формировании ампликона длиной 900 п.н.

Заключение

Результаты проведенных исследований позволили сделать следующие выводы.

1. Определена молекулярно-генетическая структура родительских форм МС-растений сахарной, кормовой свеклы и гибридного потомства F₁ от их скрещивания по микросателлитным локусам Sb11, Sb13, Sb15 и RAPD-локусам OPAR-16, OPAX-10, OPP-14, позволившая провести их идентификацию.

2. Выявлены специфические ПЦР-продукты длиной 1000 п.н. для МС-линии 2113 по локусу Sb13, что отличает ее от других генотипов и может служить генетическим маркером для идентификации.

3. Установлено, что максимальная гетерогенность селекционных материалов сахарной, кормовой красной и кормовой белой свеклы обнаруживается с помощью праймеров ОРАХ-10.

4. RAPD-праймеры ОРР-14 могут использоваться для идентификации образца № 12 (МС 2093), так как только с ним была обнаружена отличительная особенность, проявляющаяся в формировании ампликона с длиной 900 п.н.

5. Обнаружено наличие специфического ампликона для кормовой свеклы длиной 700 п.н. по локусу Sb11, что может являться одним из маркерных признаков при ее паспортизации.

Библиографический список

1. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз, А.Е. Демкович, Л.А. Лутова // Экологическая генетика. – 2011. – Т. IX, № 1. – С. 32–43.
2. An Extended Map of the Sugar Beet Genome Containing RFLP and RAPD Loci / E. Barzen, W. Mechelke, E. Ritter, E. Schulte-Kappert, F. Salamini // Theoretical and Applied Genetics. – 1995. – Vol. 90. – Pp. 189–193.
3. An Open-Source First-Generation Molecular Genetic Map from a Sugar Beet × Table Beet Cross and its Extension to Physical Mapping / J.M. McGrath, D. Trebbi, A. Fenwick, L. Panella, B. Schulz, V. Laurent, S. Barnes, S.C. Murray // The Plant Genome [A Supplement to Crop Science]. – 2007. – January, No. 1. – Pp. 27–44.
4. Chomczynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analytical Biochemistry. – 1987. – Vol. 162, No. 1. – Pp. 156–159.
5. Comparative Effectiveness of Sugar Beet Microsatellite Markers Isolated from Genomic Libraries and GenBank ESTs to Map the Sugar Beet Genome / V. Laurent, P. Devaux, T. Thiel, F. Viard, P. Mielordt, P. Touzet, M.C. Quillet // Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – Vol. 115, No. 6. – Pp. 793–805. DOI: 10.1007/s00122-007-0609-y.
6. Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp.) / S.J. Rae, C. Aldam, I. Dominguez, M. Hoebrechts, S.R. Barnes, K.J. Edwards // Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – Vol. 100, No. 8. – Pp. 1240–1248.
7. Genetic Distance Estimated by RAPD Markers and its Relationship with Hybrid Performance in Maize / D.C. Bruel, V. Carpentieri-Pipolo, A.C. Gerage, N.S. Fonseca Junior, C.E.C. Prete, C.F. Ruas, P.M. Ruas, S.G.H. de Souza, D.D. Garbuglio // Pesq. agropec. bras., Brasilia. – 2006. – Vol. 41, No. 10. – Pp. 1491–1498.

8. Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: II. Marker-based Analysis of Morphological and Agronomic Traits / S.P. Singh, J. A. Gutierrez, A. Molina, C. Urrea, P. Gepts // *Crop Science*. – 1991. – Vol. 31. – Pp. 23–29.
9. Heritability Estimates of Agronomic Traits and Essential Oil Content in Iranian Fennels / A. Izadi-Darbandi, K. Bahmani, H.A. Ramshini, N. Moradi // *Journal of Agricultural Science and Technology*. – 2013. – Vol. 15, No. 6. – Pp. 1275–1283.
10. Informative Genomic Microsatellite Markers for Efficient Genotyping Applications in Sugarcane / S.K. Parida, K.K. Sanjay, K. Sunita, V. Dalal, G. Hemaprabha, A. Selvi, A. Pandit, A. Singh, K. Gaikwad, T.R. Sharma, P.S. Srivastava, N.K. Singh, T. Mohapatra // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2009. – Vol. 118, No. 2. – Pp. 327–338. DOI: 10.1007/s00122-008-0902-4.
11. Kandemir N. Determining the Levels of Genetic Variation Using SSR Markers in Three Turkish Barley Materials Known as Tokak / N. Kandemir, A. Yildirim, R. Gündüz // *Turkish Journal Agriculture and Forestry*. – 2010. – Vol. 34, No. 1. – Pp. 17–23.
12. McGrath J. M. Genetic Diversity in Selected, Historical US Sugar Beet Germplasm and *Beta vulgaris* ssp. *maritima* / J.M. McGrath, C.A. Derrico, Y. Yu // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1999. – Vol. 98, No. 6–7. – Pp. 968–976.
13. Polymorphic Microsatellite Markers for Inferring Diversity in Wild and Domesticated Sugar Beet (*Beta vulgaris*) / C.M. Richards, M. Brownson, S.E. Mitchell, S. Kresovich, L. Panella // *Molecular Ecology Notes*. – 2004. – Vol. 4. – Pp. 243–245. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00630.
14. Rogers S.O. Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh, Herbarium and Mummified Plant Tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // *Plant Molecular Biology*. – 1985. – Vol. 5, No. 2. – Pp. 67–76.
15. Spatial Analysis of Nuclear and Cytoplasmic DNA Diversity in Wild Sea Beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) Populations: Do Marine Currents Shape the Genetic Structure? / V. Fievet, P. Touzet, J.F. Arnaud, J. Cuguen // *Molecular Ecology*. – 2007. – Vol. 16, No. 9. – Pp. 1847–1864. DOI:10.1111/j.1365-294X.2006.03208.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Татьяна Петровна Федулова – доктор биологических наук, зав. лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Дмитрий Николаевич Федорин – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Михаил Алексеевич Богомолов – доктор сельскохозяйственных наук, зав. лабораторией исходного материала ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Галина Геннадьевна Голева – доктор сельскохозяйственных наук, доцент кафедры селекции, семеноводства и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-76-93 (доб. 1269), e-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Дата поступления в редакцию 09.08.2018

Дата принятия к печати 03.09.2018

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Tatiana P. Fedulova – Doctor of Biological Sciences, Head of Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, pos. VNIIS, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Dmitriy N. Fedorin – Candidate of Biological Sciences, Scientific Researcher, Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, pos. VNIIS, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Mikhail A. Bogomolov – Doctor of Agricultural Sciences, Head of the Starting Material Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky Raion, pos. VNIIS, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Galina G. Goleva – Doctor of Agricultural Sciences, Docent, the Dept. of Plant Breeding, Seed Production and Biotechnology, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-71-81, e-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Received August 09, 2018

Accepted September 03, 2018