

УДК 633.18:577.2:57.088

UDC 633.18:577.2:57.088

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ДНК-МАРКЕРНОЙ СИСТЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ РИСА К ПИРИКУЛЯРИОЗУ *Pi -40* И *Pi-b*

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX DNA-MARKER SET FOR IDENTIFICATION OF RICE BLAST RESISTANCE GENES *Pi -40* AND *Pi-b*

Супрун Иван Иванович
к.б.н., с.н.с.

Suprun Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci. senior staff scientist

Ковалев Виктор Савельевич
д.с.-х.н. зам. директора института по научной работе

Kovalev Viktor Savelyevich
Dr.Sci.Agr., deputy director of science work

Шиловский Валентин Николаевич
д.с.-х.н. зав. отделом
Всероссийский научно-исследовательский институт риса, п. Белозерный, г. Краснодар, Россия
E-mail: vnirice@vnirice.ru

Shilovskiy Valentin Nikolaevich
Dr.Sci.Agr., head of the laboratory
All Russian Rice Research Institute, p. Belozerny, Krasnodar, Russia
E-mail: vnirice@vnirice.ru

В результате работы разработан мультиплексный набор для идентификации генов устойчивости к пирикуляриозу *Pi-40* и *Pi-b*. Оптимизированные комбинации праймеров и условий ПЦР позволяют безошибочно идентифицировать одновременно оба указанных гена, при постановке одной реакции.

Multiplex DNA-marker set for PCR identification for rice blast resistance genes *Pi-40* and *Pi-b* was developed in this study. Optimal primers combinations and PCR conditions allows to identify both abovementioned genes in the single PCR

Ключевые слова: ПИРИКУЛЯРИОЗ, ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ, *PIRYCULARIA ORYZA*, МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ, МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР.

Keywords: RICE BLAST, RESISTANCE GENES, *PIRYCULARIA ORYZA*, MARKER-ASSISTED BREEDING, MULTIPLEX PCR

Доминирующее положение, по степени вредоносности для риса, в Краснодарском крае занимает пирикуляриоз. Основными причинами распространения этого заболевания являются: применение повышенных доз азотных удобрений, неоправданное увеличение норм высева семян, нарушение приемов технологии возделывания риса [1].

В Краснодарском крае при благоприятных для патогена условиях отмечается эпифитотийное развитие болезни [2].

В системе интегрированной защиты растений от болезней наиболее эффективным элементом является селекция устойчивых сортов,

возделывание которых позволяет снизить объем применения пестицидов, загрязняющих окружающую среду, и получить стабильный высококачественный урожай зерна риса. При этом особого внимания, с точки зрения эффективности, заслуживает создание сортов, несущих несколько генов устойчивости к патогену. Помимо создания сортов с пирамидированными (объединенными в одном генотипе) расоспецифическими генами устойчивости, перспективным является селекция сортов, несущих гены широкого спектра устойчивости к пирикулярриозу [3, 4], а также комбинирование генов с разным типом устойчивости: расоспецифических, являющихся эффективными в конкретной зоне рисосеяния, и генов широкого спектра устойчивости.

Одна из наиболее современных селекционных технологий - ДНК-маркерная селекция, предполагает использование ДНК-маркеров для идентификации генов устойчивости в селекционном материале без проведения фитопатологического тестирования экспериментальных растений, что позволяет сохранить гибридные образцы и использовать максимальное их количество для выполнения возвратных скрещиваний, при необходимости. Использование ДНК-маркерного отбора дает возможность в максимально короткие сроки выполнять интрогрессию генов устойчивости из генетически отдаленной генплазмы путем выполнения серии возвратных скрещиваний, при постоянном контроле наличия целевых генов в гибридном потомстве с помощью ДНК-маркеров.

Ген широкого спектра устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-40* в соответствии с современными литературными данными, обеспечивает устойчивость к широкому спектру рас патогена [5]. По данным выполненного ранее нами фитопатологического тестирования, линии риса, несущие данный ген, проявили высокую степень устойчивости к

Краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза (от 4 до 13% ИРБ, при степени поражения сорта-стандарта Хазар 83%) [6].

Данный ген был интрогрессирован в геном культурного риса *Oryza sativa* из дикого вида *Oryza australensis*. В качестве реципиента при интрогрессии был использован корейский сорт подвида *japonica*. На начальном этапе была получена интрогрессивная линия IR65482-4-136-2-2, несущая данный ген. Эта линия в дальнейшем использовалась при создании гибридной популяции, при выполнении картирования данного гена. Кроме того, на ее основе корейскими учеными был создан ряд селекционных линий, несущих ген *Pi-40* [7].

Данный ген был картирован на коротком плече хромосомы 6. В настоящее время идентифицирована область генома с локализацией данного гена протяженностью 95 тыс. пар оснований.

Идентифицировано два фланкирующих микросателлитных локуса (RM527 и RM 3330), расположенных на дистанции 1,1 и 2,4 сантиморганид соответственно, и также представляют ценность, т.к. являются кодоминантными и могут выявлять гомо- и гетерозиготное состояние локуса данного гена. Это необходимо для идентификации гибридных растений, гомозиготных по доминантной аллели при получении самоопыленных потомств [7].

Ген устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b* впервые был открыт Shinoda в 1971 году в сортах риса подвида *indica*. В 1978 году были созданы близкоизогенные линии BL1-BL8 сортов подвида *japonica*, несущие перенесенные из устойчивых форм области хромосомы с геном *Pi-b* [8]. Изначально ген был определен на генетической карте риса с использованием RFLP-маркерной системы [9]. *Pi-b* расположен на дистальном конце длинного плеча хромосомы 2. В дальнейшем на молекулярном уровне было выполнено

тонкое картирование той области хромосомы, где *Pi-b* ген локализовали [10]. Это позволило в последующем клонировать ген и провести секвенирование [11]. Анализ аминокислотной последовательности продукта гена *Pi-b* выявил его принадлежность к классу генов устойчивости NBS-LRR, кодирующих белки, в структуру которых входит нуклеотид-связывающий домен – nucleotide binding site (NBS), а также область с повышенным содержанием аминокислоты лейцин – leucine reach repeat (LRR). Данный класс генов устойчивости кодирует цитоплазматические белки. [12]. Полный сиквенс гена *Pi-b* доступен в базе данных www.ncbi.nih.gov.

Ген *Pi-b* является эффективным геном устойчивости к пирикулярриозу в зоне рисосеяния Краснодарского края [13].

В лаборатории биотехнологии ВНИИ риса ранее была разработана внутригенная маркерная система для *Pi-b* гена [14]. С использованием ДНК - маркерного анализа был создан широкий перечень ценных селекционных форм с данным геном на генетической основе отечественных сортов Янтарь и Хазар [15]. Наличие сортообразцов, несущих ген *Pi-b* и обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков, близким по показателям к районированным в Краснодарском крае сортам риса, позволило нам приступить к выполнению программы по созданию на их основе линий риса с объединенными генами устойчивости *Pi-b* и *Pi-40*.

Перспективным является использование мультиплексной ПЦР для идентификации данных генов. Это позволит в два раза сэкономить расходы времени и химреактивов, т.к. даст возможность идентифицировать два гена одновременно, при постановке одной реакции.

В связи с этим, задачей наших исследований являлась разработка мультиплексной ДНК - маркерной системы, позволяющей одновременно идентифицировать гены устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-40* и *Pi-b*.

Материал и методы

Донором гена *Pi-40* послужили линии риса IR 83260-1-1-1-5-B, IR 83260-2-10-5-2-1-B. Линии риса, несущие ген устойчивости *Pi-40* были предоставлены ВНИИриса доктором К.К.Жена (IRRI) в рамках работы международного Консорциума TRRC. Донор гена *Pi-b* сорт BL1, а также линии с геном *Pi-b* Хазар/BL1 (BC3F5) созданные ранее во ВНИИриса с применением ДНК - маркерной селекции.

Сортами реципиентами при создании линий, несущих два указанных гена устойчивости послужили отечественные сорта риса Хазар и Новатор, которые использовались в качестве материнской формы. Кроме того, реципиентом послужили гибридные линии, несущие ген устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b*, созданные нами ранее на основе отечественных сортов риса Янтарь и Хазар, с применением ДНК - маркерной селекции [15].

Образцы ДНК выделяли из свежесрезанной части листовой пластинки гибридных растений на различных стадиях вегетационного развития. Экстракцию ДНК проводили буфером следующего состава: 20мл 1М Tris-HCl (pH 7.5), 5 мл 5М NaCl, 5 мл 0.5М EDTA (pH 8.0), 5 мл 10% SDS в общем объеме 100 мл. Часть листа (2-3см) растирали в 500 мкл экстрагирующего буфера в пластиковой пробирке объемом 1,5мл. Инкубировали образцы при 60°C в течение 3 часов. Отделяли супернатант центрифугированием при 12000 об/мин. К перенесенной в чистую пробирку верхней фазе добавляли 500 мкл изопропанола, оставляли для преципитации на 10-20 минут при комнатной температуре, предварительно перемешав. После этого образец центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин, полученный осадок промывали 300мкл 70% этанола, высушивали и растворяли в 200мкл 0,1*TE. В ПЦР смесь добавляли по 2,5 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом.

ПЦР проводили по стандартным методикам, с выполнением предварительной оптимизации экспериментальных параметров [16].

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР маркеров использовали 2% агарозный гель, а также не денатурирующий 8% акриламидный гель на основе Трис-боратного буфера. Полимеризацию акриламидного геля проводили при комнатной температуре в течение 30 минут. В качестве катализаторов полимеризации использовали ТЕМЕД и аммония персульфат, из расчета 40 мкл ТЕМЕДа (100% раствор) и 350 мкл аммония персульфата 10%-ного на 40 мл раствора геля.

Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле вели при 150 V в течение 40 минут. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили при напряжении 200V в течение 3 часов. После электрофореза гелевые пластины помещали на 10 минут в раствор бромистого этидия 5мкг/мл, и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

При подборе сочетаний ДНК-маркеров генов *Pi-b* и *Pi-40* учитывали такие параметры как температура отжига вносимых в реакционную смесь пар праймеров и размеры ПЦР-продуктов, синтезируемых в ходе амплификации с используемыми праймерными парами.

Была определена перспективность использования в мультиплексном наборе микросателлитных маркеров RM527 и RM3330, фланкирующих ген *Pi-40* в сочетании с праймерной парой 4+5, маркирующей доминантный аллель гена *Pi-b*. Для данных ДНК маркеров, в соответствии с общепринятой формулой расчета температуры отжига: $T_a = 2(A+T)+4(G+C)-5$,

перспективным определили использование температуры цикла отжига праймеров при ПЦР 60°C. Данная температура была апробирована на начальном этапе работы и была определена как наиболее оптимальная.

Кроме того, оптимизировали такие параметры как длительность циклов отжига праймеров и элонгации, а также общее количество циклов реакции. В результате оптимизации определили условия ПЦР, обеспечивающие высокую специфичность одновременного синтеза в одной реакционной смеси целевых амплифицированных фрагментов с последовательностей генов *Pi-b* и *Pi-40* наряду с минимальным количеством неспецифических продуктов реакции:

5 минут при 94С° - начальная денатурация;

следующих 32 цикла:

- 30 секунд денатурация при 94С°,

- 35 секунд отжиг праймеров при 60С°,

- 40 секунд синтез при 72С°;

последний цикл синтеза 5 минут при 72С°.

Помимо этого экспериментально определили оптимальную концентрацию дезоксинуклеотидтрифосфатов (0,1 мМ) и праймеров-0,3 мкМ. ДНК вносили в количестве 50-100 нг на реакцию. Оптимальные параметры реакции позволили четко идентифицировать целевые аллели обоих генов в одной ПЦР - пробе. На начальном этапе работы качество амплификации продуктов ПЦР оценивали методом электрофореза в 2% агарозном геле (Рис.1).

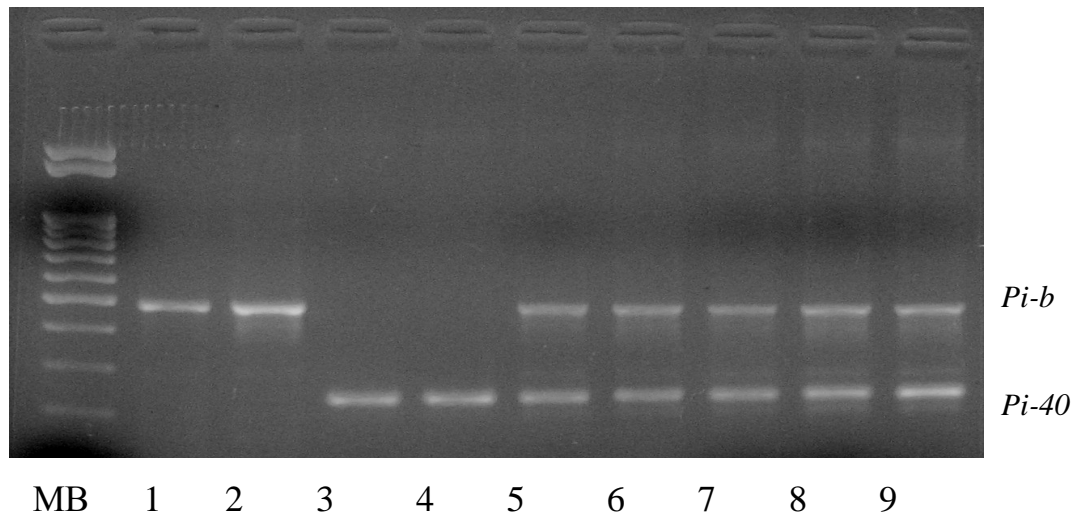


Рисунок 1 Апробация мультиплексной ПЦР для идентификации генов устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-b + Pi-40* - (маркеры *Pi-b* [4+5]+*Pi-40* RM527, 2% агарозный гель).

MB - маркер молекулярной массы ДНК; 1, 2 – в ПЦР смеси ДНК-маркер гена *Pi-b* (*Pi-b* 4+5) и ДНК образца с доминантной аллелью *Pi-b*; 3, 4 – в ПЦР смеси ДНК-маркер гена *Pi-40* (RM527) и ДНК образца с доминантной аллелью *Pi-40*; 5-9 – в ПЦР смеси ДНК-маркеры генов *Pi-b* и *Pi-40* и смесь ДНК образцов с доминантными аллелями данных генов в соотношении 1:1.

При апробации комбинаций праймерных пар, маркирующих сочетания генов *Pi-b + Pi-40* использовали ДНК маркеры с размерами ПЦР продуктов около 500 пар оснований для гена *Pi-b* и около 230 пар оснований для гена *Pi-40*. На рисунке целевые ПЦР – продукты мультиплексной идентификации генов *Pi-b* и *Pi-40* отмечены стрелкой. Видно, что разница в размерах продуктов амплификации позволяет избежать перекрывания фрагментов при электрофорезе.

Микросателлитные маркеры гена *Pi-40* - RM527 и RM3330 являются кодоминантными, т.е. позволяют идентифицировать как доминантный, так и

рецессивный аллель данного гена. Кроме того, специфика данных маркеров такова, что разница в размерах продуктов амплификации у доминантного и рецессивного аллелей не превышает 20 пар оснований, что затрудняет их идентификацию с помощью агарозного геля. Поэтому нами была выполнена апробация мультиплексных наборов *Pi-40+Pi-b* при внесении в ПЦР смесь ДНК образцов, несущих как доминантный, так и рецессивный аллель данного гена в сочетании с геном *Pi-b*, с последующим электрофорезом продуктов амплификации в 8% полиакриламидном геле (Рис. 2).

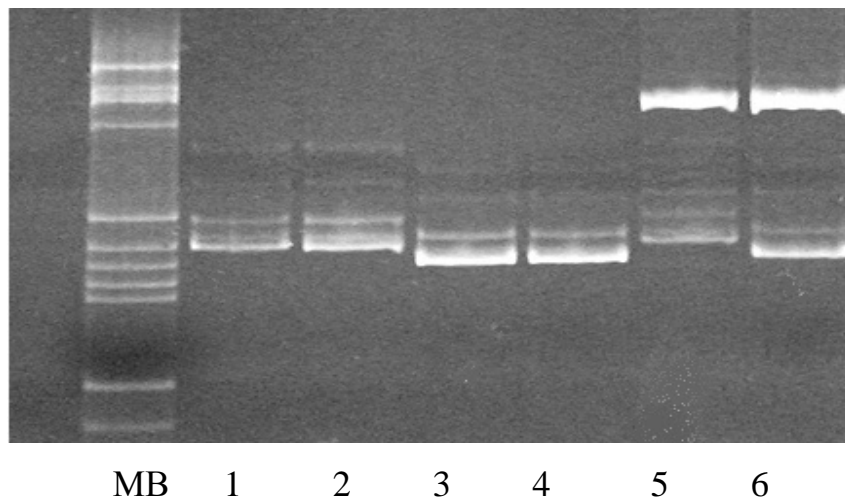


Рисунок 2 Апробация мультиплексной ПЦР для идентификации генов устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-b + Pi-40* - (маркеры *Pi-b* [4+5]+*Pi-40* RM527, 8% полиакриламидный гель).

MB - маркер молекулярной массы ДНК; 1, 2 – в ПЦР смеси сочетание ДНК-маркеров гена *Pi-b* и *Pi-40*, ДНК образца с доминантным аллелем *Pi-40* и рецессивным аллелем *Pi-b*; 3, 4 – в ПЦР смеси сочетание ДНК-маркеров гена *Pi-b* и *Pi-40*; ДНК образца с рецессивными аллелями генов *Pi-40* и *Pi-b*; 5 – в ПЦР смеси ДНК-маркеры генов *Pi-b* и *Pi-40*, ДНК образцов с доминантными аллелями данных генов; 6 – в ПЦР смеси ДНК-маркеры генов *Pi-b* и *Pi-40*, ДНК образца с доминантным аллелем *Pi-b* и рецессивным аллелем *Pi-40*.

Как видно из результатов электрофореза, применение данного мультиплексного набора позволяет одновременно идентифицировать наличие как доминантного, так и рецессивного аллелей гена *Pi-40* в сочетании с доминантным аллелем гена *Pi-b*.

Таким образом, в ходе выполненной работы, были разработаны методические основы мультиплексной идентификации генов устойчивости *Pi-40* и *Pi-b*. За счет использования оптимальной комбинации праймеров и условий ПЦР возможна их достоверная идентификация при одновременном наличии у анализируемых образцов доминантных аллелей.

Применение данной мультиплексной системы идентификации дает возможность выявлять одновременное присутствие данных генов в гибридных образцах, при постановке одной реакции, что снизит финансовые затраты на выполнение ДНК-анализа и сократит время, необходимое для его выполнения. Это позволит повысить экономическую эффективность выполнения программы по ДНК - маркерной селекции, направленной на получение селекционных форм риса, несущих данные гены.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 13-04-96598 p_юг_a.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Система рисоводства Краснодарского края: Рекомендации / Под общ. ред. Е.М.Харитоновна.- Краснодар: ВНИИ риса, 2005.- 340 с.
- 2 Зеленский Г.Л. Селекция сортов риса, устойчивых к пирикулярриозу, рисовой листовой нематоды и бактериальному ожогу в условиях Российской Федерации: Автореф. дис....д-ра с.-х. наук.- Краснодар.- 1993.-48 с.
3. Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур // Сельскохозяйственная биология.- 2003.- №3.- С.26-41.
- 4 Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding // Korean J. Breed.- 2003.- V.35.- P. 133-140
- 5 Suh J. P., Roh J. H., Cho Y. C., Han S. S., Kim Y. G., and Jena K. K. The Pi40 Gene for Durable Resistance to Rice Blast and Molecular Analysis of Pi40-Advanced Backcross Breeding Lines // Phytopathology. 2009. №3. V. 99
- 6 Супрун И. И. Оценка линий риса с генами Pi-b, Pi-z и Pi-40 на устойчивость к Краснодарской популяции возбудителя пирикулярриоза (*Pyricularia oryza*) / Супрун И.И., Харченко Е. С.; Серая Л. И.; Ковалев В. С. // Электронный политематический научный журнал КубГАУ.- № 76(02).-2012. – режим доступа онлайн: <http://ej.kubagro.ru/2012/02/pdf/57.pdf>, шифр информрегистра: 0421200012\0105.
- 7 J. U. Jeung, B. R. Kim, Y. C. Cho et al. A novel gene, Pi-40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice // Theoretical and Applied Genetics 2007. V. 115. P. 1163–1177.
- 8 Yokoo M., Kikushi F., Fujimaki H., Nagai K. Breeding of blast resistance lines (BL1 to 7) from indica-japonica crosses of rice // Japan. J. Breed.- 1978.- V.28.- P. 359-385.
- 9 Miyamoto M., Ando I., Rybka K., Kodama O., Kawasaki S. High resolution mapping of the indica-derived genes. I. Pi-b // Mol. Plant-Microbe Interact.- 1996.- V.9.- P. 6-13.
- 10 Monna L., Miyao A., Zhong H.S., Yano M. et al. Saturation mapping with subclones of YACs: DNA marker production targeting the rice blast disease resistance gene, Pi-b // Theor. Appl. Genet.- 1997.- V.94.- P. 170-176.
- 11 Tsunoda Y., Jwa N.S., Akiyama K., Nakamura S., Motomura T., et al. Cloning of the rice blast resistance gene Pi-B // Advanced in rice blast research.- 2000.-V.1.- P. 9-16.
12. Wang Z. X., Yano M., Yamanouchi U. et al. The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes // The Plant Journal.- 1999.- V.19.- P. 55-64.
- 13 Коломиец Т.М. Отбор исходного материала риса для селекции на иммунитет к пирикулярриозу: Автореф. дис....канд. биол. наук.- Голицино.- 1990.- 21 с.
- 14 Супрун И.И., Ильницкая Е.Т., Мухина Ж.М. Создание внутригенного ДНК-маркера гена устойчивости к пирикулярриозу риса Pi-b и его использование в практической селекции // Сельскохозяйственная биология. 2007. - № 5.- С. 63-66.
- 15 Супрун И. И., Шиловский В.Н., Рубан В.Я. Селекционные и молекулярно-генетические методы в создании устойчивых к пирикулярриозу линий риса // Вестник РАСХН. - 2012.-№1.- С. 60-62.
- 16 Шибата Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // Молекулярная клиническая диагностика.- М.: Мир, 1999.- С. 395-427.

REFERENCES

- 1 Sistema risovodstva Krasnodarskogo kraja: Rekomendacii / Pod obshh. red. E.M.Haritonova.- Krasnodar: VNII risa, 2005.- 340 s.
- 2 Zelenskij G.L. Selekcija sortov risa, ustojchivyh k pirikuljariozu, risovoj listovoj nematode i bakterial'nomu ozhogu v uslovijah Rossijskoj Federacii: Avtoref. dis....d-ra s.-h. nauk.- Krasnodar.- 1993.-48 s.
- 3 Havkin Je.E. Molekuljarnaja selekcija rastenij: DNK-tehnologii sozdaniya novyh sortov sel'skohozjajstvennyh kul'tur // Sel'skohozjajstvennaja biologija.- 2003.- №3.- S.26-41
- 4 Jena K.K., Moon H.P., Mackill D.J. Marker assisted selection- a new paradigm in plant breeding // Korean J. Breed.- 2003.- V.35.- P. 133-140
- 5 Suh J. P., Roh J. H., Cho Y. C., Han S. S., Kim Y. G., and Jena K. K. The Pi40 Gene for Durable Resistance to Rice Blast and Molecular Analysis of Pi40-Advanced Backcross Breeding Lines // Phytopathology. 2009. №3. V. 99
- 6 Suprun I. I. Ocenka linij risa s genami Pi-b, Pi-z i Pi-40 na ustojchivost' k Krasnodarskoj populjacii vzbuditelja pirikuljarioza (*Piricularia oryza*) / Suprun I.I., Harchenko E. S.; Seraja L. I.; Kovalev V. S. // Jelektronnyj politematicheskij nauchnyj zhurnal KubGAU.- № 76(02).-2012. – rezhim dostupa onlajn: <http://ej.kubagro.ru/2012/02/pdf/57.pdf>, shifr informregistra: 0421200012\0105
- 7 J. U. Jeung, B. R. Kim, Y. C. Cho et al. A novel gene, Pi-40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice // Theoretical and Applied Genetics 2007. V. 115. P. 1163–1177.
- 8 Yokoo M., Kikushi F., Fujimaki H., Nagai K. Breeding of blast resistance lines (BL1 to 7) from indica-japonica crosses of rice // Japan. J. Breed.- 1978.- V.28.- P. 359-385.
- 9 Miyamoto M., Ando I., Rybka K., Kodama O., Kawasaki S. High resolution mapping of the indica-derived genes. I. Pi-b // Mol. Plant-Microbe Interact.- 1996.- V.9.- P. 6-13.
- 10 Monna L., Miyao A., Zhong H.S., Yano M. et al. Saturation mapping with subclones of YACs: DNA marker production targeting the rice blast disease resistance gene, Pi-b // Theor. Appl. Genet.- 1997.- V.94.- P. 170-176.
- 11 Tsunoda Y., Jwa N.S., Akiyama K., Nakamura S., Motomura T., et al. Cloning of the rice blast resistance gene Pi-B // Advanced in rice blast research.- 2000.-V.1.- P. 9-16.
12. Wang Z. X., Yano M., Yamanouchi U. et al. The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes // The Plant Journal.- 1999.- V.19.- P. 55-64.
- 13 Kolomic T.M. Otor ishodnogo materiala risa dlja selekcii na immunitet k pirikuljariozu: Avtoref. dis....kand. biol. nauk.- Golicino.- 1990.- 21 s.
- 14 Suprun I.I., Il'nickaja E.T., Muhina Zh.M. Sozdanie vnutrigennogo DNK-markera gena ustojchivosti k pirikuljariozu risa Pi-b i ego ispol'zovanie v prakticheskoj selekcii // Sel'skohozjajstvennaja biologija. 2007. - № 5.- S. 63-66
- 15 Suprun I. I., Shilovskij V.N., Ruban V.Ja. Selekcionnye i molekuljarno-geneticheskie metody v sozdanii ustojchivyh k pirikuljariozu linij risa // Vestnik RASHN. - 2012.-№1.- S. 60-62
- 16 Shibata D.K. Polimeraznaja cepnaja reakcija i molekuljarno-geneticheskij analiz bioplatov // Molekuljarnaja klinicheskaja diagnostika.- M.: Mir, 1999.- S. 395-427