

УДК 631.523:633.854.78

**ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ  
МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ЦМС-RF СИСТЕМЫ  
В РОДИТЕЛЬСКИХ ЛИНИЯХ  
ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА**

**Т.А. Челюстникова,**

ст. научный сотрудник

**С.З. Гучетль,**

кандидат биологических наук

**Т.С. Антонова,**

доктор биологических наук

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-86-53

E-mail: vniimk@vniimk.ru

*Для цитирования:* Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Применение молекулярных маркеров для идентификации ЦМС-Rf системы в родительских линиях гибридов подсолнечника // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2017. – Вып. 4 (172). – С. 3–9.

**Ключевые слова:** подсолнечник, цитоплазматическая мужская стерильность, ген *Rf*, молекулярные маркеры.

Представлены результаты тестирования молекулярных маркеров ЦМС-Rf системы в образцах коллекции линий подсолнечника ВНИИМК. Работа проведена с целью определения набора ДНК маркеров для идентификации ядерного гена восстановления фертильности пыльцы *Rf<sub>1</sub>* и митохондриального гена цитоплазматической мужской стерильности *orfH522* в линейном и селекционном материале. Использованы 16 инбредных линий различного назначения: материнские, закрепители стерильности и отцовские. Протестировано 6 пар праймеров, разработанных для амплификации маркерных фрагментов ДНК к генам *Rf<sub>1</sub>* и *orfH522*. В результате проведенной работы определен набор из трех пар праймеров для идентификации генов *orfH522* и *Rf<sub>1</sub>*. Рекомендовано его использование в селекционной и семеноводческой практике.

**Usage of molecular markers for identification of  
CMS-Rf system in parental lines of sunflower hybrids.**

**Chelyustnikova T.A.**, senior researcher

**Guchetl S.Z.**, PhD in biology

**Antonova T.S.**, doctor of biology

All-Russia Research Institute of Oil Crops by

Pustovoit V.S. (VNIIMK)

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-86-53

E-mail: vniimk@vniimk.ru

**Key words:** sunflower, cytoplasmic male sterility, gen *Rf*, molecular markers.

The testing results of molecular markers of CMS-Rf system in samples from the sunflower lines collection of the All-Russia Research institute of oil crops are presented. The purpose of the work was to determine a set of DNA-markers for identification of nucleus gen-restorer of pollen fertility *Rf<sub>1</sub>* and mitochondrial gen of cytoplasmic male sterility *orfH522* in lines and inbreds. There were used 16 inbred lines of the different usage direction: maternal, paternal and maintainers of sterility. Six pairs of primers were tested, they were created for amplification of marker fragments of DNA for genes *Rf<sub>1</sub>* and *orfH522*. A set from three pair of primers for identification of genes *Rf<sub>1</sub>* and *orfH522* was determined as a result of the conducted work. Its use in breeding and seed growing practices is recommended.

**Введение.** Подсолнечник – основной источник растительного масла в России. Значительную часть высеваемых семян составляют семена гибридов. Переход от сортовой селекции подсолнечника к гибридной сделал культуру коммерчески более выгодной для оригинаторов и более технологичной и урожайной для производителей семян.

При производстве гибридных семян принципиальное значение имеет использование системы ЦМС-Rf, которая обеспечивает проведение контролируемого опыления материнских стерильных линий пыльцой отцовской формы без использования ручной кастрации [1]. Большинство современных промышленных гибридов подсолнечника создано на основе одного

источника цитоплазматической мужской стерильности ЦМС–РЕТ, полученного Леклерком из межвидового гибрида *H. petiolaris* Nutt. × *H. annuus* [2]. В селекции гибридного подсолнечника используется линейный материал: материнские линии с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), отцовские линии-восстановители фертильности, несущие ядерные гены *Rf*, и линии-закрепители стерильности пыльцы, необходимые для размножения материнских форм с нормальной цитоплазмой без гена *Rf*. Линии, используемые в создании и размножении гибридов, должны быть максимально генетически выровнены. В течение двух десятилетий в лаборатории иммунитета и молекулярного маркирования ВНИИМК проводится идентификация и оценка генетической чистоты линий и гибридов F<sub>1</sub> подсолнечника с использованием изоферментов [3] и полиморфных SSR-локусов ДНК [4]. Но используемые маркеры не сцеплены с признаками цитоплазматическая мужская стерильность и восстановительная способность пыльцы подсолнечника.

Одной из насущных проблем при выращивании семян гибридного подсолнечника является засорение посевов фертильной материнской формой на участках гибридизации [5]. Обязательные требования по стерильности материнских форм гибридов подсолнечника (95–98 % в зависимости от категории семян) указаны в ГОСТ Р 52325-2005 «Семена сельскохозяйственных растений. Сортные и посевные качества» [6]. Проверка материнских форм гибридов подсолнечника по показателю «закрепление стерильности» является обязательным требованием при сертификации семян. Проведение грунтоконтроля в полевых условиях до начала реализации семян осложнено климатическими условиями. По этой причине оценка проводится в осенне-зимний период в теплицах [7]. Эта работа продолжительна по времени и требует дополнительных затрат на со-

блюдение режима искусственного освещения и обогрева.

Определение состояния генов *Rf* в селекционном материале проводят методом гибридологического анализа. Процесс длителен и трудоемок, он включает проведение скрещиваний и оценку фертильности пыльцы растений F<sub>1</sub> на стадии цветения.

Современные разработки в области молекулярной биологии предлагают новые подходы к решению проблем гибридной селекции и семеноводства.

Определена нуклеотидная последовательность митохондриального гена *orfH522*, ответственного за развитие цитоплазматической мужской стерильности РЕТ1 у подсолнечника [8]. Эти данные дали возможность исследовать митохондриальный геном на наличие маркерных последовательностей к признаку ЦМС. Используя последовательность *orfH522* в качестве специфического праймера, Дука с соавторами амплифицировали маркерный фрагмент ДНК у линии с цитоплазматической мужской стерильностью и у гибридов [9]. Усатов с группой исследователей разработали высокоспецифичные олигонуклеотиды, маркирующие митохондриальный ген *orfH522* подсолнечника, для проведения ПЦР в режиме Real Time [10].

К настоящему времени собраны обширные данные по картированию гена-восстановителя фертильности пыльцы *Rf*<sub>1</sub> [11; 12]. В сконструированной на базе SSR-маркеров генетической карте [13] ген *Rf*<sub>1</sub> локализован в LG13 на расстоянии 3,7 сМ от локуса ORS511 [14].

Проведены исследования, направленные на поиск маркеров гена *Rf*<sub>1</sub>, контролирующего восстановление фертильности. Генетический анализ двух искусственно созданных популяций подсолнечника дал возможность авторам дополнить область, приближенную к гену *Rf*<sub>1</sub>, тремя SSR-маркерами и двумя TRAP-маркерами. Один из TRAP-маркеров преобразован в STS-маркер, расположенный

от гена  $Rf_1$  на расстоянии 0,4 сМ и рекомендованный для использования в селекционных программах [14]. В работе Хорн идентифицированы RAPD-маркеры ОРК13\_454 и ОРУ10\_740, сцепленные с геном  $Rf_1$  восстановления фертильности на расстоянии 0,8 и 2,0 сМ соответственно. Эти маркеры успешно конвертированы в SCAR-маркеры HRG01 и HRG02, которые признаны перспективными для поиска носителей гена  $Rf_1$  [11]. Используя молекулярные маркеры, Анисимова с соавторами провели работу, направленную на идентификацию генов, контролирующих восстановление фертильности пыльцы подсолнечника в образцах коллекции ВИР. Проведено тестирование 61 образца различного генетического происхождения. Авторами показаны возможности использования молекулярных маркеров для идентификации в образцах коллекции ВИР гена  $Rf_1$  [15].

Маркиным с группой исследователей выявлены доноры восстановления фертильности пыльцы в линиях ЦМС из коллекции ВИР с использованием SCAR-маркеров. С применением праймера ОРК-13, фланкирующего локус HRG01, иницирована амплификация двух кодоминантных маркеров гена  $Rf_1$ , идентифицирующих не только его наличие или отсутствие, но и аллельное состояние [16; 17].

Несмотря на обширные исследования ЦМС-Rf системы у подсолнечника, особенности характера генетического контроля восстановления мужской фертильности не полностью выяснены, поскольку гены, контролирующие данный признак, ведут себя неодинаково в различном генетическом окружении [15; 18].

В связи с этим целью нашей работы является тестирование молекулярных маркеров ЦМС-Rf системы в коллекции линий подсолнечника селекции ВНИИМК, подбор оптимальных условий амплификации и определение ДНК

маркеров для ЦМС и гена  $Rf_1$  у линий подсолнечника селекции ВНИИМК.

**Материалы и методы.** Материалом для работы служили инбредные линии подсолнечника селекции ВНИИМК: материнские формы с генами цитоплазматической мужской стерильности (Л 3844 А, ВК 680 А, ВК 678 А), линии-закрепители стерильности (Л 3844 Б, ВК 653 Б, ВК 680 Б, ВК 678 Б), отцовские линии-восстановители фертильности (ВК 101, ВК 302, ВК 930, ВК 301, Л 1983, ВК 581-2, ВК 580, ВК 551, Л 1789). По 10 семян каждой линии проращивали во влажных рулонах фильтровальной бумаги в темноте в течение 7 дней. Из семядольных листьев полученных этиолированных проростков выделяли общую ДНК модифицированным методом Sanghai-Marooof [19] с использованием СТАВ буфера. Гомогенизацию растительных тканей проводили на аппарате Speed Mill plus (Analyticjena, Германия).

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Tween 20; 0,2 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидфосфатов; 10 пМ праймера; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Москва). Амплификация проходила в термоциклере S1000™ (BioRad, США) при следующих условиях: начальная денатурация при 95 °С в течение 2 мин, затем 30–35 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг ( $T_{от}$ ) при 58–60 °С в течение 40 с, элонгация – 1 мин при 72 °С, денатурация при 94 °С – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Варьирование температуры отжига и количества циклов зависело от нуклеотидной последовательности праймеров.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле, приготовленном на 1x ТАЕ или 1x SB буфере, с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE.2, ДНК-технология, Россия). Окрашивание осу-

щественности бромистым этидием. Визуализировали и документировали результаты электрофореза при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Праймеры для амплификации маркерных фрагментов ДНК синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва) на основе нуклеотидных последовательностей из опубликованных работ (табл. 1).

Таблица 1

**Праймеры, использованные для амплификации маркерных фрагментов ДНК**

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Источник
K-13	F tat gca taa tta gtt ata ccc	Horn, 2003
	R aca taa gga tta tgt acg gg	
Y10	F aaa cgt ggg aga gag gfg g	Yue, 2008
	R aaa cgt ggg ctg aag aac ta	
STS -115	F cga act aat cat cat aca acc a	Duca, 2008
	R tcg gct ctt atg tat gtt cac	
orfH522	F ggc gca ctc tct ttt tct gt	Маркин, 2014
	R ctt gaa tgg cag tgg tga tg	
Rf	F ggc atg atc aag tac ata agc aca	Маркин, 2014
	R tat gta agg gaa tga gct ccg gtt	
Orf	F agt agc ccg ttc cgt gtt tat gga	Маркин, 2014
	R ctt tct att tgg gtc atc gcc gga	

**Результаты и обсуждение.** Для идентификации гена  $Rf_1$  в линиях подсолнечника проведены реакции амплификации с праймерами K13, Y10, STS-115 и Rf (табл. 1).

Праймер Y10 стабильно инициировал амплификацию фрагментов ДНК при температуре отжига 65 °С в объеме реакционной смеси 10 мкл. Анализ результатов ПЦР с этим праймером показал, что на ДНК, выделенной из линий-восстановителей фертильности, амплифицируется маркерный фрагмент размером около 750 п.н., при этом он отсутствует в образцах стерильных материнских линий (рис. 1). Протестировано 54 образца ДНК, выделенной из проростков, в генотипах которых присутствует ген восстановления фертильности  $Rf_1$ , маркерная фракция выявлена у 50 образцов. Праймер Y10 разработан для амплификации маркерного фрагмента HRG02, который расположен на расстоянии 2 см

от гена  $Rf_1$  [11]. Сцепление неполное, что не исключает рекомбинационную изменчивость, которая может являться причиной отсутствия маркерного фрагмента у части образцов. Образцы линии ВК 301 оказались неоднородными по наличию фрагмента 750 п.н. Следует отметить, что при проведении биохимической паспортизации эта линия была также нестабильна по спектру эстеразы. Это указывает на генетическую неоднородность анализируемой линии.

На рисунке 1 представлена фореграмма продуктов амплификации ДНК линий Л 1789-1, ВК 930, ВК 301, которые являются восстановителями фертильности и линий ВК 101 и Л 3844, не обладающих геном  $Rf_1$ .

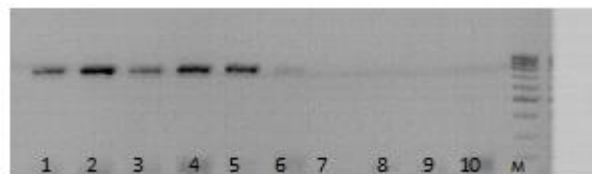


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации фрагментов ДНК подсолнечника с праймером Y10.

Дорожки: 1, 2 – Л 1789; 3, 4 – ВК 930; 5, 6 – ВК 301; 7, 8 – ВК 101; 9, 10 – Л 3844; м – маркер молекулярного веса 100b

С праймером K13 не удалось получить стабильной амплификации маркерного фрагмента HRG01.

Информативным для идентификации ядерного гена  $Rf_1$  оказался праймер Rf. Последовательность праймера специально разработана Маркиным с соавторами (2014) на основе секвенированной последовательности SCAR-маркера OP-K13\_454 для проведения мультиплексной ПЦР [20]. Стабильную амплификацию и удовлетворительное качество визуализации продукта реакции получали при температуре отжига 60 °С. Для выявления возможности использования данного праймера в диагностике восстановительной способности фертильности проведе-

ны реакции с линиями контрастными по наличию гена восстановителя фертильности (рис. 2).

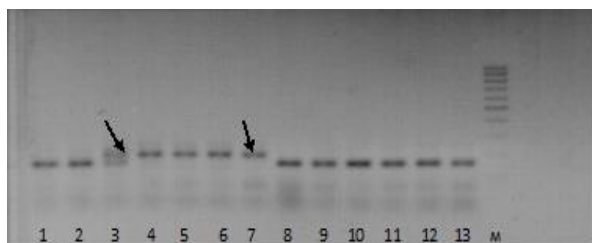


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации фрагментов ДНК подсолнечника с праймером Rf.

Дорожки: 1, 2 – ВК 101 А; 3, 4 – ВК 302 Rf; 5, 6 – ВК 930 Rf; 7 – ВК 301 Rf; 8, 9, 10 – ВК 680 А; 11, 12, 13 – ВК 680 Б;

м – маркер молекулярного веса 1 кб.

Стрелкой обозначен маркерный фрагмент

На ДНК, выделенной из линий ВК 302, ВК 930 и ВК 301, амплифицирован фрагмент размером около 200 п.н. На ДНК линий ВК101, ВК680 А и ВК680 Б амплифицирован фрагмент несколько меньшего размера – около 180 п.н. Линии-восстановители фертильности ВК 302, ВК 930 и ВК 301 гомозиготны по доминантному гену *Rf<sub>1</sub>*. Полученный ампликон по размеру соответствует фрагменту ДНК, заявленному в качестве маркера гена *Rf<sub>1</sub>* [20]. Двойная фракция, амплифицированная в образце линии ВК 302 (дорожка 3) может быть результатом генетического загрязнения образца.

С праймером Rf проведены реакции на ДНК 35 образцов, в генотипе которых присутствует ген восстановления фертильности *Rf<sub>1</sub>*, маркерная фракция выявлена у 34 образцов.

Для идентификации митохондриального гена *orfH522*, контролирующего проявление ЦМС типа РЕТ1 у подсолнечника, проведены реакции амплификации с праймерами *orfH522* и Orf. Использовали ДНК, выделенную из проростков подсолнечника материнской линии ВК680 А, обладающей стерильной

цитоплазмой, и линии-закрепителя стерильности ВК 680 Б с нормальной цитоплазмой. Оба праймера инициировали синтез маркерных фрагментов в образцах линии ВК 680 А. При амплификации с праймером Orf, маркерный фрагмент размером около 340 п.н. отличался четкостью визуализации продукта реакции и стабильностью проявления (рис. 3).

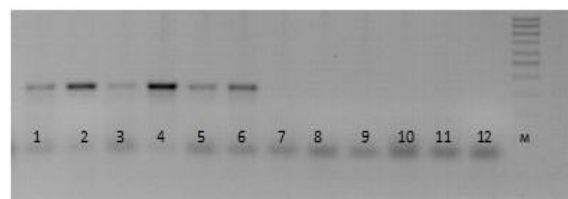


Рисунок 3 – Электрофоретические спектры амплификации фрагментов ДНК подсолнечника с праймером Orf.

Дорожки: 1 – 6 ВК 680 А, 7–12 ВК 680 Б, м – маркер молекулярного веса 1кб

**Заключение.** Проведено тестирование шести пар праймеров для амплификации молекулярных маркеров ЦМС-Rf системы в образцах линий селекции ВНИИМК. Праймеры Y10 и Rf стабильно инициировали амплификацию маркерных фрагментов ДНК для гена *Rf<sub>1</sub>*. Праймер Orf был оптимальным для амплификации маркерного фрагмента ДНК по отношению к митохондриальному гену *orfH522*. Таким образом, определен набор из трёх пар праймеров для идентификации этих генов в селекционном и линейном материале ВНИИМК. Их использование в селекционной практике ускорит идентификацию носителей генов *Rf<sub>1</sub>* и *orfH522* в популяциях подсолнечника и тестирование отцовских линий по признаку восстановления фертильности пыльцы, которое в полевых условиях проводится в два этапа: тест-скрещивание с ЦМС-линиями и последующий анализ F<sub>1</sub>. Также применение этих молекулярных маркеров для анализа партий семян материнских линий гибридов даст возможность определять уровень их засоренности семенами фертильных форм.

## Список литературы

1. Eckardt N.A. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration // *The Plant Cell*. – 2006. – Vol. 18. – P. 515–517.
2. Leclercq P. Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol // *Ann. Amélior. Plant.* – 1969. – Vol. 19. – No 3. – P. 99–106.
3. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Некоторые особенности определения генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника методом изоферментного анализа // *Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2015. – Вып. 4 (164). – С. 14–19.
4. Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Рамазанова Т.С., Антонова Т.С. SSR-анализ молекулярно-генетического полиморфизма линий и гибридов подсолнечника // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук.* – 2006. – № 1. – С. 46–48.
5. Гриднев А.К. Влияние уровня генетической чистоты семян на урожайность и технологические свойства гибридов // *Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2008. – Вып. 2 (139). – С. 7–10.
6. ГОСТ Р 52325-2005. Семена сельскохозяйственных растений. Сортовые и посевные качества. Общие технические условия. – М.: Стандартинформ, 2005. – 24 с.
7. Бочковой А.Д., Антонова Т.С., Камардин В.А., Арасланова Н.М., Ветер И.И., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Эффективность различных методов определения генетической чистоты партий семян самоопыленных линий и гибридов первого поколения подсолнечника // *Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2014. – Вып. 1 (157–158). – С. 3–7.
8. Kohler R., Horn R., Lossl A., Zetsche K. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene // *Mol. Gen. Gen.* – 1991. – Vol. 227. – P. 369–376.
9. Duca M., Port A., Orozco-Cardenas M., Lovatt C. Transcript analyses for mitochondrial sterile type rearrangement in sunflower // *Roumanian Biotechnol. Letters.* – 2008. – Vol. 13 (3). – P. 3701–3706.
10. Усатов А.В., Маркин Н.В., Устенко А.А., Лотник В.С., Панич А.Е. Синтез новых ДНК-боисенсеров для определения митохондриального гена стерильности пыльцы подсолнечника. Электронный научный журнал «Инженерный Вестник Дона». – 2011. – № 4.
11. Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prüfe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rf<sub>1</sub>* gene restoring fertility in PET1-based F<sub>1</sub> hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P. 599–606.
12. Kusterer B., Friedt W., Lazarescu E., Prüfe M., Özdemir N., Tzigos S., Horn R. Map-based cloning strategy for isolating the restorer gene *Rf<sub>1</sub>* of the PET1cytoplasm in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Helia.* – 2004. – No 40. – P. 1–14.
13. Tang, S., J.K. Yu, M.B. Slabaugh, D.K. Shintani, S.J. Knapp. Simple sequence repeat map of the sunflower genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – 105. – P. 1124–1136.
14. Yue B., Vick B.A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rf<sub>1</sub>* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers // *Plant Breeding* 129, 24–28 (2010) doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01661
15. Анисимова И.Н., Гаврилова В.А., Рожкова В.Т., Тимофеева Г.И., Тихонова М.А. Молекулярные маркеры в идентификации генов восстановления фертильности пыльцы у подсолнечника // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* – 2009. – № 6. – С. 7–9.
16. Маркин Н.В., Тихонова М.А., Анисимова И.Н., Рожкова В.Т., Гаврилова В.А., Усатов А.В. SCAR-маркеры гена *Rf<sub>1</sub>* подсолнечника у линий-восстановителей фертильности пыльцы растений с различными типами ЦМС // *Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2009. – Вып. 2 (141). – С. 3–6.
17. Маркин Н.В., Горбаченко О.Ф., Тихонова М.А., Усатов А.В. Кодоминантные маркеры гена *Rf<sub>1</sub>* культурного подсолнечника // *Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК.* – 2010. – Вып. 1 (142–143). – С. 3–7.
18. Port A., Nechifor V., Midoni A., Duca M. Usefulness of the diagnostic markers for the restorer gene *Rf<sub>1</sub>* in inheritance studies at sunflower // *Analele Științifice ale Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară.* – 2013. – Vol. 14. – P. 11–17.
19. Saghai-Marooof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics PNAS USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 8014–8018.
20. Патент РФ 2524135. Способ идентификации стерильности/фертильности подсолнечника / Маркин Н.В., Горбаченко О.Ф., Усатов А.В., Лотник В.С., Тихобаева В.Е. – Заявл. 21.05.12, опуб. 27.07.14; Бюл. 21. – 2014. – С. 1–23.

## References

1. Eckardt N.A. *Metod metodom izofermentnogo analiza // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2015. – Vyp. 4 (164). – S. 14–19.*
4. Chelyustnikova T.A., Guchetl' S.Z., Ramazanova T.S., Antonova T.S. *SSR-analiz molekulyarno-geneticheskogo polimorfizma liniy i gibridov podsolnechnika // Vestnik Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk. – 2006. – № 1. – S. 46–48.*
5. Gridnev A.K. *Vliyanie urovnya geneticheskoy chistoty semyan na urozhaynost' i tekhnologicheskie svoystva gibridov // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2008. – Vyp. 2 (139). – S. 7–10.*
6. GOST R 52325-2005. *Semena sel'skokhozyaystvennykh rasteniy. Sortovye i posevnye kachestva. Obshchie tekhnicheskie usloviya. – M.: Standartinform, 2005. – 24 s.*
7. Bochkovoy A.D., Antonova T.S., Kamardin V.A., Araslanova N.M., Veter I.I., Guchetl' S.Z., Chelyustnikova T.A. *Effektivnost' razlichnykh metodov opredeleniya geneticheskoy chistoty partiy semyan samoopylennykh liniy i gibridov pervogo pokoleniya podsolnechnika // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2014. – Vyp. 1 (157–158). – S. 3–7.*
8. Kohler R., Horn R., Lossl A., Zetsche K. *Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the atpA gene // Mol. Gen. Gen. – 1991. – Vol. 227. – P. 369–376.*
9. Duca M., Port A., Orozco-Cardenas M., Lovatt C. *Transcript analyses for mitochondrial steril type rearrangement in sunflower // Roumanian Biotechnol. Letters. – 2008. – Vol. 13 (3). – P. 3701–3706.*
10. Usatov A.V., Markin N.V., Ustenko A.A., Lotnik V.S., Panich A.E. *Sintez novykh DNK-boisenserov dlya opredeleniya mitokhondrial'nogo gena steril'nosti pyl'tsy podsolnechnika. Elektronnyy nauchnyy zhurnal «Inzhenernyy Vestnik Dona». – 2011. – № 4.*
11. Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prufe M., Friedt W. *Molecular mapping of the Rf1 gene restoring fertility in PETI-based F1 hybrids in sunflower (Helianthus annuus L.) // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 599–606.*
12. Kusterer B., Friedt W., Lazarescu E., Prufe M., Özdemir N., Tzigos S., Horn R. *Map-based cloning strategy for isolating the restorer gene Rf1 of the PET1cytoplasm in sunflower (Helianthus annuus L.) // Helia. – 2004. – No 40. – P. 1–14.*
13. Tang, S., J.K. Yu, M.B. Slabaugh, D.K. Shintani, S.J. Knapp. *Simple sequence repeat map of the sunflower genome // Theor. Appl. Genet. – 2002. – 105. – P. 1124–1136.*
14. Yue B., Vick B.A., Cai X., Hu J. *Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (Helianthus annuus L.) by SSR and TRAP markers // Plant Breeding 129, 24–28 (2010) doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01661.*
15. Anisimova I.N., Gavrilova V.A., Rozhkova V.T., Timofeeva G.I., Tikhonova M.A. *Molekulyarnye markery v identifikatsii genov vosstanovleniya fertil'nosti pyl'tsy u podsolnechnika // Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk. – 2009. – № 6. – C. 7–9.*
16. Markin N.V., Tikhonova M.A., Anisimova I.N., Rozhkova V.T., Gavrilova V.A., Usatov A.V. *SCAR-markery gena Rf1 podsolnechnika u liniy-vosstanoviteley fertil'nosti pyl'tsy rasteniy s razlichnymi tipami TsMS // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2009. – Vyp. 2 (141). – S. 3–6.*
17. Markin N.V., Gorbachenko O.F., Tikhonova M.A., Usatov A.V. *Kodominantnye markery gena Rf1 kul'turnogo podsolnechnika // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2010. – Vyp. 1 (142–143). – S. 3–7.*
18. Port A., Nechifor V., Midoni A., Duca M. *Usefulness of the diagnostic markers for the restorer gene Rf1 in inheritance studies at sunflower // Analele Ştiinţifice ale Universităţii “Alexandru Ioan Cuza”, Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară. – 2013. – Vol. 14. – R. 11–17.*
19. Saghai-Marroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. *Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics PNAS USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 8014–8018.*
20. Patent RF 2524135. *Sposob identifikatsii steril'nosti/fertil'nosti podsolnechnika / Markin N.V., Gorbachenko O.F., Usatov A.V., Lotnik V.S., Tikhobaeva V.E. – Zayavl. 21.05.12, opub. 27.07.14; Byul. 21. – 2014. – S. 1–23.*