

УДК 636.222/.27(477).033.082.2

**ПОКАЗАТЕЛИ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ АБЕРДИН-АНГУС X ЧЕРНО-ПЕСТРЫХ БЫКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПОВ ПО ГЕНАМ ТИРЕОГЛОБУЛИНА (TG5), КАЛЬПАИНА (CAPN1) И МИОСТАТИНА (MSTN)**

**Н. А. Сонич, О. А. Епишко, Л. А. Танана, В. В. Пешко, О. В. Вергинская**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

*Ключевые слова:* полиморфизм, ген, ПЦР, MSTN, TG5, CAPN1.

*Аннотация.* В качестве позиционных и функциональных генов-кандидатов, связанных с качеством мяса, в статье рассмотрены гены MSTN, TG5, CAPN1 у мясных пород крупного рогатого скота Беларуси. Изучен полиморфизм генов, который выявил различия в соотношении предпочтительных генотипов у животных абердин-ангусской породы. Изучены убойные показатели помесных быков (абердин-ангусская x черно-пестрая) в зависимости от генотипов по генам тиреоглобулина (TG5), кальпаина CAPN1 и миостатина (MSTN).

**INDICATORS OF MEAT EFFICIENCY ABERDEEN – ANGUS X BLACK AND MOTLEY BULLS DEPENDING ON GENOTYPES ON TIREOGLOBULIN (TG5) OF KALPAIN (CAPN1) AND MIOSTATIN'S (MSTN) GENES**

**N. A. Sonich, O. A. Epishko, L. A. Tanana, V. V. Peshko, O. V. Vertinskaya**

El «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

*Key words:* polymorphism, gene, PCR, MSTN, TG5, CAPN1.

*Summary.* Polymorphism of genes, which revealed distinctions in the ratio of preferable genotypes at animals Aberdeen – Angus breed, is studied. Study lethal indicators Aberdeen Angus x black and motley bulls depending on genotypes of genes of a tireoglobulin (TG5), kalpain (CAPN1) and a miostatin (MSTN).

*(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)*

**Введение.** В настоящее время разведением мясного скота в Республике Беларусь занимаются 263 сельскохозяйственные организации, в 231 скот содержится на отдельных фермах.

Ускоренное развитие мясного скотоводства сегодня следует рассматривать как проблему государственного значения, решение которой позволит в интересах всего населения в перспективе удовлетворить платежеспособный спрос на говядину за счет отечественного производства. Объемы реализации крупного рогатого скота на убой сокращаются, и перспектив их роста в ближайшее время без применения кардинальных мер не ожидается. Основным источником поступления говядины в стране остается молочное животноводство [1], поэтому сегодня в стране ведется большая работа по наращиванию мясного поголовья. Однако развитие мясного скотоводства предусматривает не только увеличение объемов производства мяса, но и улучшение его качества.

На эффективность производства продукции животноводства оказывают влияние множество факторов, одним из наиболее значительных является генетический потенциал животных, используемых в племенной работе [2, 3], и определенные условия кормления. Генетическое усовершенствование существующих пород животных – длительный и трудоемкий процесс, т. к. большинство экономически значимых показателей имеют полигенную природу, то есть определяются многими генами. Маркерная селекция в качестве дополнительного метода может стать мощным инструментом селекционного отбора животных, характеризующихся желательными показателями продуктивности. Применение маркерной селекции возможно с целью сокращения временного интервала на выявление животных-носителей желательных аллелей по контролируемым или улучшаемым признакам. Использование информативных ДНК-маркеров позволяет вести отбор в раннем возрасте по признакам, сцепленным с полом или проявляющимся в зрелом возрасте, а также характеризующимся полигенной природой наследования [4].

Миостатин – белок, подавляющий избыточный рост мышечной ткани, он образуется в мышцах животных, затем выделяется в кровь, оказывая свое действие на мышцы за счет связывания с рецепторами ACVR2B (activin type II receptor). Миостатин активен в мышцах, используемых для движения (скелетные мышцы) до и после рождения. Это обычно ограничивает рост мышц, гарантируя, что мышцы не становятся слишком большими.

Известна мутация гена миостатина (MSTN) — nt821(del11), которая приводит к усиленному формированию мышечной массы (феномен

«двойной мускулатуры»). Мутации, которые уменьшают производство миостатина, приводят к чрезмерно быстрому росту мышечной ткани (фенотип двойной мускулатуры). Однако развитие двойной мускулатуры связано с такими негативными последствиями, как снижение рождаемости и затруднениями при отеле.

В качестве позиционного и функционального гена-кандидата, связанного с качеством мяса, рассматривается ген тиреоглобулина (TG5), находящийся в области центромеры хромосомы 14 крупного рогатого скота. TG5 – гликопротеин и предшественник тиреоидных гормонов трийодтиронина и тетраiodтеранина, которые участвуют в образовании жировых клеток и мраморности. Точный механизм влияния полиморфизма гена TG5 на формирование качественных признаков мясной продуктивности еще неизвестен, но установлена связь его вариантов с мраморностью, в частности, с содержанием внутримышечного жира в длиннейшей мышце спины [5]. Исследования, проведенные на группах скота ангусской породы, в коммерческих линиях скота, а также в группах скота породы Вагю, показали, что скот, гомозиготный или гетерозиготный по аллелю Т (генотипы ТТ или СТ), отличается более высокой мраморностью по сравнению с животными, несущими генотип гомозиготный по аллелю С (генотип СС). В группах скота породы Вагю различия в степени мраморности между гомозиготными генотипами достигала 14-20% [1, 6].

Еще одним потенциальным геном мясной продуктивности рассматривают ген кальпастин (CAPN1) – белок-ингибитор активности кальпаина, который участвует в процессе регуляции протеолиза при созревании мяса, специфично угнетая протеолитическую активность кальпаинов. Кальпастин не только ингибирует активность кальпаина и его связываемость с мембранами. Мутация гена кальпаина, картированного на 29 хромосоме крупного рогатого скота, представлена полиморфизмом 2 нуклеотидов, обуславливающим аминокислотную замену (глицин/аланин) и приводящим к более высокой нежности мяса по сравнению с глициновым аллелем (>30%) [7].

Использование генов-маркеров позволяет изучать, контролировать и прогнозировать важные параметры у животных. Установлено влияние генотипов генов MSTN, TG5, CAPN1 на физико-химические показатели нежности мяса при созревании. Отмечается, что гены миостатина, кальпаина и тиреоглобулина ответственны за формирование нежности мяса.

**Цель работы** – изучить влияние генов MSTN, TG5, CAPN1 на показатели мясной продуктивности абердин-ангусс х черно-пестрых быков.

**Материал и методика исследований.** Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В качестве объекта исследований использовали абердин-ангус х черно-пестрых быков (n=74), содержащихся в РСУП «Олекшицы» Берестовицкого района Гродненской области.

Для изучения полиморфизма генов MSTN, TG5, CAPN1 провели генотипирование животных по разработанной методике ПЦР-ПДРФ-анализа с некоторыми модификациями температурных и временных режимов.

В качестве биопроб для проведения ДНК-тестирования использовали биологический материал в виде ткани (ушной выщип). В процессе взятия каждую пробу подписывали индивидуальным номером. С целью длительного хранения и использования для ряда анализов, ДНК выделяли перхлоратным методом.

Для диагностики точечной мутации MSTN использовали праймеры:

MSTN – 1: 5' GGG GGG GAG AGA TTT TGG GCT TGA TTG TGA – 3'

MSTN – 2: 5' GGG GGG GTG CAA TAA TCC AAT CCC ATC CAA- 3'.

Для диагностики точечной мутации TG5 использовали праймеры:

TG5 – 1: 5' GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG – 3'

TG5 – 2: 5' GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA- 3'.

Для диагностики точечной мутации CAPN1 использовали праймеры:

CAPN1 – 1: 5' TCT TCT CAG AGA AGA GCG-CAG – 3'

CAPN1 – 2: 5' CTG-CGC-CAT-TAC-TAT-AGA-TC- 3'.

ПЦР-анализ выполняли согласно протоколу, представленному в таблице 1.

Таблица 1 – Компоненты и концентрации реакционных смесей генов MSTN, TG5 и CAPN1

Реагенты	Концентрация на 1 пробу		
	MSTN	TG5	CAPN1
dH <sub>2</sub> O	До 20 мкл	До 25 мкл	До 10 мкл
dNTP	2,0 мМ	2,0 мМ	0,8 мкл
MgCl <sub>2</sub>	1.5 мМ	1.25 мМ	1 мкл
Буфер	1x	1x	1x
Taq полимераза	1 е. а.	1 е. а.	1 е. а.
MSTN – 1	15-25 пМ	15-25 пМ	15-25 пМ
MSTN – 2	15-25 пМ	15-25 пМ	15-25 пМ
Проба ДНК	100-200 нг	100-200 нг	100-200 нг

Режим амплификации гена MSTN:

x1: 94<sup>0</sup>C – 4 мин;

x40: 94<sup>0</sup>C – 30 с, 68<sup>0</sup>C – 30 с, 72<sup>0</sup>C – 30 с;

x1: 72<sup>0</sup>C – 5 мин.

ПЦР-продукт:

Генотип AA = 119 bp,

Генотип BB = 108 bp,

Генотип AB = 119/108 bp (рисунок 1).

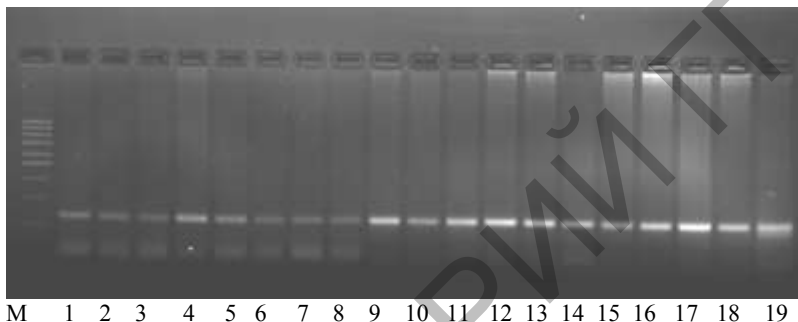


Рисунок 1 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа идентификации мутации гена MSTN, ассоциированной с мясной продуктивностью крупного рогатого скота, на основе ПЦР-анализа

*Примечание – М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь); 1-18 – генотип AA; 19 – генотип AB*

Детекцию результатов ПЦР-анализа MSTN осуществляли методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия.

Режим амплификации гена TG:

x1: 94<sup>0</sup>C – 4 мин;

x31: 94<sup>0</sup>C – 1 мин, 57<sup>0</sup>C – 1 мин, 72<sup>0</sup>C – 1 мин;

x1: 72<sup>0</sup>C – 4 мин.

На этапе ПДРФ применялась эндонуклеаза рестрикции – PvuI, с генерацией генотип специфических фрагментов: ТТ (норма) = 473/75 bp; СС (способствует накоплению внутримышечного жира) = 295/178/75 bp; СТ (предрасположен к накоплению внутримышечного жира) = 473/295/178/75 bp (рисунок 2).

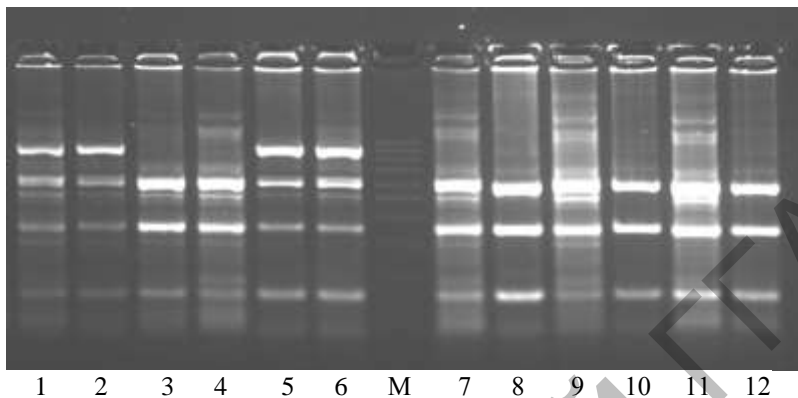


Рисунок 2 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа определения гена тиреоглобулина (TG5) у крупного рогатого скота мясного направления продуктивности

*Примечание – М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь); 1, 2, 5, 6 – генотип СТ; 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12 – генотип СС*

Режим амплификации CAPN1:

x1: 93<sup>0</sup>С – 5 мин, 93<sup>0</sup>С – 1 мин, 59<sup>0</sup>С – 1 мин;

x1: 72<sup>0</sup>С – 1 мин;

x35, 72<sup>0</sup>С – 5 мин;

12<sup>0</sup>С – удержание.

На этапе ПДРФ применялась эндонуклеаза рестрикции – Pvu I (Tth1111) с генерацией генотип специфических фрагментов: AA – 341 bp, GA – 341/195/146 bp, GG – 195/146 bp (рисунок 3).

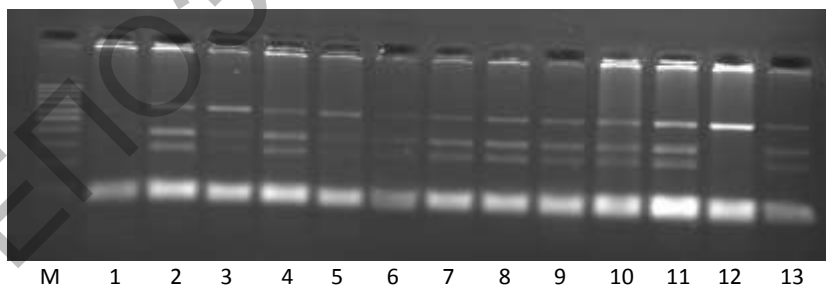


Рисунок 3 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа идентификации мутации гена CAPN1, ассоциированного с мясной продуктивностью крупного рогатого скота, на основе ПЦР-анализа

Примечание – М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь); 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 – генотип GA; 12 – генотип AA

При проведении контрольного убоя быков учитывали предубойную живую массу (кг); массу парной и охлажденной туши (кг); убойный выход и выход туши (%); массу внутреннего жира (кг); морфологический состав туш путем проведения обвалки левых полутуш после 24-часового охлаждения ( $0^0$ - $4^0$ C). Каждую полутушу расчленили на 5 естественно-анатомических частей: шейную – по последнему шейному позвонку, плечелопаточную – по контуру лопатки, спинно-реберную – по последнему грудному позвонку, поясничную с пашиной – по последнему поясничному позвонку и тазобедренную с последующим взвешиванием костей, сухожилий и мякоти.

Основной цифровой материал был обработан методом биометрической статистики по П. Ф. Рокицкому [5]. Из статистических показателей рассчитывали среднее значение (M), ошибку средней арифметической (m), уровень значимости (P). В работе приняты следующие обозначения уровня значимости: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ .

**Результаты исследований и их обсуждение.** В результате проведенных исследований выявлен полиморфизм по всем изучаемым генам: миостатину (MSTN), тиреоглобулину (TG) и кальпаину (CAPN1). В изучаемой популяции быков частота генотипов гена MSTN<sup>BB</sup> составила 18%, генотипа MSTN<sup>AB</sup> – 36% и генотипа MSTN<sup>AA</sup> – 46%.

Анализ абердин-ангус x черно-пестрых быков по гену CAPN1 выявил наличие генотипов: CAPN1<sup>AA</sup> – 20%, CAPN1<sup>GA</sup> – 65%; CAPN1<sup>GG</sup> – 15%. Среди исследованных животных по гену TG распределение генотипов было следующим: TG<sup>CC</sup> – 44,5%, TG<sup>CT</sup> – 52,8% и всего 2,7% животных были с генотипом TG<sup>TT</sup>.

После проведения генотипирования и изучения генетической структуры популяции для оценки убойных показателей были сформированы 3 группы животных по 6 голов в каждой с комплексными генотипами по генам MSTN, CAPN1 и TG. В первую группу вошли животные с генотипом MSTN<sup>AA</sup> CAPN1<sup>AA</sup> TG<sup>CC</sup>, во вторую – MSTN<sup>AB</sup> CAPN1<sup>GA</sup> TG<sup>CT</sup>, в третью – MSTN<sup>BB</sup> CAPN1<sup>GG</sup> TG<sup>TT</sup>.

Изучение мясной продуктивности было произведено зависимости от генотипов по генам MSTN, CAPN1 и TG по результатам контрольного убоя подопытных быков в возрасте 16 на ОАО «Волковыцкий мясокомбинат» по методике ВНИИМС. Данные контрольного убоя представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Убойные показатели абердин-ангус х черно-пестрых быков, разводимых в РСУП «Олекшицы» Берестовицкого района Гродненской области ( $M \pm m$ )

Показатель	генотип MSTN <sup>AA</sup> CAPN1 <sup>AA</sup> TG <sup>CC</sup> (n=6)	MSTN <sup>AB</sup> CAPN1 <sup>GA</sup> TG <sup>CT</sup> (n=6)	MSTN <sup>BB</sup> CAPN1 <sup>GG</sup> TG <sup>TT</sup> (n=6)
Предубойная масса, кг	528,7±5,73	581,7±7,49***	611,7±10,46***
Масса парной туши, кг	305,6±8,43	344,0±4,75**	362,2±5,73***
Выход туши, %	57,8±1,45	59,1±0,23	59,5±0,13
Масса внутреннего жира, кг	12,4±0,85	12,2±0,58	12,3±0,75
Выход внутреннего жира, %	2,4±0,18	2,1±0,08	2,0±0,11
Убойная масса, кг	317,9±8,48	356,2±5,25**	376,7±6,21***
Убойный выход, %	60,2±1,50	61,2±0,26	61,6±0,29

Из данных таблицы 2 видно, что быки с генотипом MSTN<sup>BB</sup> CAPN1<sup>GG</sup> TG<sup>TT</sup> превосходили по убойным показателям животных с альтернативными генотипами. Так, преимущество по предубойной массе у быков с генотипом MSTN<sup>BB</sup> CAPN1<sup>GG</sup> TG<sup>TT</sup>, по сравнению с животными первой группы, составило 83 кг, или 15,7% ( $P < 0,001$ ), по массе парной туши – 56 кг, или 18,5% ( $P < 0,001$ ), по выходу туши – 1,7 п. п. ( $P < 0,05$ ), по убойной массе – 58,8 кг, или 18,5% ( $P < 0,001$ ), по убойному выходу – 1,4 п. п.

Быки с генотипом MSTN<sup>AB</sup> CAPN1<sup>GA</sup> TG<sup>CT</sup> также превосходили животных с генотипами MSTN<sup>AA</sup> CAPN1<sup>AA</sup> TG<sup>CC</sup>: по предубойной массе на 53 кг, или 10,0% ( $P < 0,001$ ), массе парной туши на 38,45 кг, или 12,6% ( $P < 0,01$ ), по выходу туши на 1,3 п. п., по убойной массе на 38,3 кг, или 12,0% ( $P < 0,001$ ), по убойному выходу на 1,0 п. п. Разница по убойным показателям между животными третьей и второй групп составила по предубойной живой массе 30 кг, или 5,2% ( $P < 0,05$ ), по убойной массе 20,5 кг, или 5,8%, по убойному выходу 0,36 п. п.

По выходу внутреннего жира различия между группами были незначительными и составили 0,3-0,4 п. п.

Морфологический состав является важным качественным показателем мясной продуктивности. Содержание наиболее ценных в пищевом отношении тканей (мышцы и жир) определяют ценность мяса как продукта питания. Нами также был изучен морфологический состав полутуш подопытных быков с разными генотипами генов MSTN, CAPN1 и TG, результаты которого представлены в таблице 3.



Таблица 3 – Морфологический состав полутуш подопытных быков разных генотипов (M±m)

Показатель	генотип		
	MSTN <sup>AA</sup> CAPN1 <sup>AA</sup> TG <sup>CC</sup> (n = 6)	MSTN <sup>AB</sup> CAPN1 <sup>GA</sup> TG <sup>CT</sup> (n = 6)	MSTN <sup>BB</sup> CAPN1 <sup>GG</sup> TG <sup>TT</sup> (n = 6)
Масса охлажденной полутуши, кг	149,3±2,91	164,5±2,23***	174,7±1,60***
в т. ч. мякоти, кг	125,3±2,78	138,5 ±0,87***	147,8±1,35***
костей и сухожилий, кг	24,0±0,52	26,0±0,45*	26,9±0,54**
Содержалось в полутуше, %:			
мякоти	83,9	84,2	84,6
костей и сухожилий	16,1	15,8	15,4
Коэффициент мясности	5,2	5,33	5,50

Анализ морфологического состава полутуш подопытных животных показал, что при убое в 16-месячном возрасте от быков с генотипом MSTN<sup>BB</sup> CAPN1<sup>GG</sup> TG<sup>TT</sup> получены туши с более высоким выходом мяса по сравнению со сверстниками первой и второй групп. Так, в полутушах быков с генотипом MSTN<sup>BB</sup> CAPN1<sup>GG</sup> TG<sup>TT</sup> содержание мяса было больше на 22,5 кг, или 18,0% (P<0,001), в полутушах животных с генотипом генов MSTN<sup>AB</sup> CAPN1<sup>GA</sup> TG<sup>CT</sup> – на 13,2 кг, или 10,5% (P>0,05), чем у сверстников первой группы.

По коэффициенту мясности быки с генотипом MSTN<sup>BB</sup> CAPN1<sup>GG</sup> TG<sup>TT</sup> превосходили своих сверстников с генотипом MSTN<sup>AA</sup> CAPN1<sup>AA</sup> TG<sup>CC</sup> и MSTN<sup>AB</sup> CAPN1<sup>GA</sup> TG<sup>CT</sup> на 5,8 и 3,2% соответственно.

Известно, что питательная ценность, вкусовые качества и кулинарные свойства отдельных анатомических частей туши неодинаковы. Наиболее ценными считаются поясничная и тазобедренная части. Результаты изучения соотношения естественно-анатомических частей в полутушах подопытных быков представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Соотношение естественно-анатомических частей в полутушах подопытных быков (M±m)

Анатомические части	MSTN <sup>AA</sup> CAPN1 <sup>AA</sup> TG <sup>CC</sup> (n = 6)		MSTN <sup>AB</sup> CAPN1 <sup>GA</sup> TG <sup>CT</sup> (n = 6)		MSTN <sup>BB</sup> CAPN1 <sup>GG</sup> TG <sup>TT</sup> (n = 6)	
	кг	%	кг	%	кг	%
полутуша	149,3±2,9	100	164,47± 2,23***	100	174,7± 1,6***	100
шейная	14,9±1,0	10,0	16,1±0,93	9,8	17,3±0,24	9,9
плечелопаточная	25,4±0,96	17,0	26,5±0,26	16,1	27,8±0,74*	15,9
спиннореберная	43,4±1,62	29,1	45,9±0,3	27,9	47,0±0,9*	26,9
поясничная	14,6±0,53	9,8	16,5±0,54*	10,0	17,6± 0,54**	10,1
тазобедренная	51,0±0,72	34,1	59,5±1,11***	36,2	65,0±0,79***	37,2

Анализ полученных данных свидетельствует о различиях между животными изучаемых генотипов по абсолютной массе естественно-анатомических частей их полутуш. По выходу поясничного и тазобедренного отрубов преимущество было у быков с генотипами  $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$ . Они превосходили по данному показателю сверстников с генотипом  $MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC}$  на 0,3 и 3,1 п. п. соответственно. Разница по выходу поясничного и тазобедренного отрубов между животными с генотипами  $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$  и  $MSTN^{AB} CAPN1^{GA} TG^{CT}$  составила 0,1 и 1,0 п. п. соответственно.

**Заключение.** Изучение показателей мясной продуктивности абердин-ангус х черно-пестрых быков в 16-месячном возрасте свидетельствует о том, что быки с генотипами  $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$  превосходили животных с генотипами  $MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC}$  по предубойной массе на 83 кг, или 15,7% ( $P < 0,001$ ), по массе парной туши – 56 кг, или 18,5% ( $P < 0,001$ ), по выходу туши – 1,7 п. п. ( $P < 0,05$ ), по убойной массе на 58,8 кг или 18,5% ( $P < 0,001$ ), по убойному выходу на 1,4 п. п. Изучение морфологического состава и естественно анатомических частей абердин-ангус х черно-пестрых быков показало, что более мясные туши были получены от животных с генотипами  $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$ : в их полутушах содержание мякоти было также больше, чем у сверстников с альтернативными генотипами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амерханов, Х. Производство говядины и пути его увеличения в России / Х. Амерханов // Молоч. и мясн. скотоводство, 2003. – № 6. – С. 3-10.
2. Зелепухин, А. Племенные ресурсы мясного скотоводства России / А. Зелепухин, Ф. Каюмов // Молоч. и мясн. скотоводство, 2003. – № 6. – С. 24-35.
3. Эрнст, Л. К. Перспективы селекции сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст // Науч. тр. ВИЖа. – 2005. – В. 63. – Т. 1. – С. 41.
4. Prediction of empty body composition of double-muscled beef cows / L. O. Fiems [et. al.] // Livest. Prod. Sci., 2005. – 92. – P. 249-259.
5. Spelman, R. J. Genetic and economic responses for within-family markers-assisted selection in dairy cattle breeding schemes / R. J. Spelman, D. J. Garrick // J. Dairy Sci. 1998. – Vol. 81. – P. 2942-2950.
6. Primer-directed enzymatic amplification of with a thermostable DNA polymerase / R. K. Saici [et. al.] // Science. – 1988. – P. 487-491.
7. Wiesner, I. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns / I. Wiesner, D. Wiesnerova // Cell Mol. Biol. Letters. – 2003. – Vol. 8. – P. 743-748.