

Научная статья

УДК 635.33:575.22:575.857

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-2-08



## Изучение генетического разнообразия образцов *Brassica rapa* L. коллекции ВИР на основе анализа полиморфизма ДНК в микросателлитных локусах

**Ф. А. Беренсен**

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

**Автор, ответственный за переписку:** Федор Алексеевич Беренсен, f.berensen@vir.nw.ru

Вид *Brassica rapa* L. включает в себя листовые и корнеплодные культуры, выращиваемые во многих странах мира. Уточнение генетических взаимосвязей и структуры популяции позволяет точнее подбирать формы для дальнейшей селекции с использованием генетически отличимых форм. Коллекция *B. rapa* собранная в ВИР, состоит из 1750 образцов, представляющих различные подвиды и страны происхождения, и является хорошим инструментом для изучения многообразия культурных форм с использованием молекулярно-генетических методов. Целью исследования было провести оценку генетического разнообразия образцов коллекции *B. rapa* и уточнить внутривидовые взаимоотношения при помощи молекулярных маркеров. Молекулярный скрининг 80 образцов с использованием 16 микросателлитных маркеров выявил аллели размером от 85 до 460 пн при среднем 7,8 числе аллелей на локус. Средний показатель индекса информационного полиморфизма (PIC) составил 0,278, а показатель ожидаемой гетерозиготности (H) в среднем составил 0,35. Идентифицированы редкие и уникальные аллели для образцов пекинской капусты (к-63 и к-108), образцов японских листовых овощей (к-217 и к-335) и репы (к-738). Выявлены аллели локусов BRMS-007 (123 пн) и BRMS-034 (136 пн) характерные только для образцов репы, сурепицы и сарсонов. Проведён анализ *in silico* пар праймеров для уточнения размеров ожидаемых фрагментов согласно референсному геному *CAAS\_Brap\_v3.01* линии пекинской капусты Chiifu-401-42. Филогенетический анализ проводили с использованием программы STRUCTURE, что привело к распределению образцов на четыре кластера, согласно ботанической классификации: пекинская капуста; китайская и розеточная капуста; японские листовые овощи, ноздреватая, пурпурная, японская капуста и гибридные формы; образцы репы и сурепицы.

**Ключевые слова:** филогенетический анализ, SSR-маркеры, капуста, репа, сурепица**Благодарности:** Работа выполнена при частичной поддержке государственного задания по темам № FGEM-2022-0003 и № FGEM-2022-0008.**Для цитирования:** Беренсен Ф.А. Изучение генетического разнообразия образцов *Brassica rapa* L. коллекции ВИР на основе анализа полиморфизма ДНК в микросателлитных локусах. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(2):53-66. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-2-08

Прозрачность финансовой деятельности: Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, автору и его месту работы.

© Беренсен Ф.А., 2024

## Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-2-o8

# A study of genetic diversity of *Brassica rapa* L. accessions from the VIR collection by analyzing DNA polymorphism in microsatellite loci

Fedor A. Berensen

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

**Corresponding author:** Fedor A. Berensen, f.berensen@vir.nw.ru

The species *Brassica rapa* L. includes leafy and root crops grown in many countries of the world. Clarification of genetic relationships and population structure allows for a more accurate parental line selection for further breeding using genetically distinct forms. The *B. rapa* collection maintained at VIR contains 1750 accessions representing different subspecies and countries of origin, and it is a good tool for studying the diversity of cultivated forms using molecular genetic methods. The aim of the study was to investigate the genetic diversity and clarify the relationships within the *B. rapa* species using molecular markers. Molecular screening of 80 accessions using 16 microsatellite markers revealed alleles ranging in size from 85 to 460 bp with an average of 7.8 alleles per locus. The average polymorphic index content (PIC) was 0.278, and the expected heterozygosity (H) averaged was 0.35. Rare and unique alleles were identified for Beijing cabbage (k-63 and k-108), Japanese leafy vegetables (k-217 and k-335) and turnip (k-738) samples. Alleles of SSR loci BRMS-007 (123 bp) and BRMS-034 (136 bp) were identified, which are characteristic only of accessions of turnips, rapeseed and sarsons. *In silico* analysis of primer pairs was performed to clarify the sizes of expected fragments relative to the reference genome CAAS\_Brap\_v3.01 of Chinese cabbage line Chiifu-401-42. Phylogenetic analysis was performed using the STRUCTURE program and resulted in the distribution of accessions into four clusters according to botanical classification: Chinese cabbage; pakchoi, tatsoi; Japanese leafy vegetables, wutacai, tsoisum, mizuna and mibuna (kyona) and hybrid forms; turnip and rape accessions.

**Keywords:** phylogenetic analysis, SSR markers, cabbage, turnip, rape

**Acknowledgments:** The work was carried out with partial support from the state assignment on topics No. FGEM-2022-0003 and No. FGEM-2022-0008.

**For citation:** Berensen F.A. A study of genetic diversity of *Brassica rapa* L. accessions from the VIR collection by analyzing DNA polymorphism in microsatellite loci. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(2):53-66. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-2-o8

Financial transparency: The author has no financial interest in the presented materials or methods. The author thanks the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his employers.

© Berensen F.A., 2024

## Введение

*Brassica rapa* L. (2n=20, геном AA) – первый domesticiрованный вид рода *Brassica*, произошедший от *Brassica oleracea* L. (2n=18, геном CC) (Gomez-Campo, Prakash, 1999). В него входят различные экономически важные культуры. Особой ценностью вида является его скороспелость, продуктивность и ценный биохимический состав. Вид *B. rapa* включает в себя различные по цели выращивания культуры: овощные, масличные, кормовые, пряно-вкусовые и декоративные, которые подразделяют на листовые и корнеплодные формы.

Первоначально центром происхождения вида *B. rapa* постулировали Средиземноморье, откуда вид распространился на север и восток – в Германию и центральную Европу и, в конечном счёте, в Азию. Попутно, при возделывании, развились различные местные формы. Капуста попала в Китай через Монголию, а в Японию была завезена либо через Китай, либо через Сибирь (Dixon, Wells, 2024). Листовые формы с древних времён традиционно возделывают на территории Китая, Японии и Кореи, где они до сих пор имеют лидирующие позиции среди овощных культур.

Подвиды листовых культур восточноазиатских капуст *B. rapa* включают в себя китайскую капусту или пак-чой (*ssp. chinensis* (L.) Hanelt), пекинскую (*ssp. pekinensis* (Lour.) Hanelt), ноздреватую (*var. narinosa* (Bailey) Hanelt), пурпурную (*var. purpuraria* (Bailey) Bailey), розеточную (*var. rosularis* (Tsen & Lee) Hanelt), японскую (*ssp. nipposinica* (Bailey) Hanelt), листовую репу комацуна (*ssp. rapa* L. f. komatsuna). Корнеплодные формы, репу и турнепс, относят к подвиду *ssp. rapa* L. Сурепицы (*ssp. oleifera* (DC.) Metzger) разделяют на яровые (f. *annua*) и озимые (f. *biennis*), а сарсоны подразделяют на коричневые (*ssp. dichotoma* (Roxb.) Hanelt) и жёлтые (*ssp. trilocularis* (Roxb.) Hanelt) (Qi et al., 2017).

Первые работы по изучению представителей видов *Brassica* с использованием молекулярных маркеров появились в конце XX века (Landry et al., 1992; Kresovich et al., 1995). Микросателлитные или SSR-маркеры, основаны на уникальных последовательностях ДНК, фланкирующих короткие, преимущественно ди- и тринуклеотидные повторы. Данный тип маркеров имеет наибольший потенциал для исследований в области эволюционной и популяционной генетики, а также для изучения генетических коллекций, за счёт их высокого уровня полиморфизма, экономичности, простоты постановки эксперимента и воспроизводимости результатов в различных лабораториях. Эффективность SSR-маркеров была показана в исследованиях на различных культурах, в частности, на различных видах рода *Brassica*. Первые SSR-маркеры для генетических исследований видов *Brassica* были разработаны в начале XXI века (Lowe et al., 2002; Suwabe et al., 2002; Plieske, Struss, 2001).

В 2002 году были выделены микросателлиты у *B. rapa* (Suwabe et al., 2002). Всего в работе были получены специ-

фические пары праймеров для 36 полиморфных микросателлитных локусов, названные семейством BRMS. Исследователями было идентифицировано 232 аллеля у 19 сортов *B. rapa* (Suwabe et al., 2002). В дальнейшем этой группой исследователей было продолжено изучение характеристик микросателлитов генома *B. rapa* в целях их использования для сравнительной геномики крестоцветных (Suwabe et al., 2004). В 2004 году проведено исследование по разработке микросателлитов для построения генетических карт и селекции с помощью маркеров в культурах рода *Brassica* (Lowe et al., 2004). Создан набор из 398 маркеров на основе простых микросателлитных последовательностей для использования в генетических исследованиях четырёх видов *Brassica* (*B. nigra*, *B. oleracea*, *B. rapa* и *B. napus*). SSR полиморфные маркеры в количестве 86 были разбиты на группы, префиксы которых соответствовали определённым видам: Ni – *B. nigra*, Ol – *B. oleracea*, Ra – *B. rapa*, и Na – *B. napus*. Однако авторы обращают внимание на то, что ряд маркеров был полиморфен более чем у одного изученного вида. В другом исследовании SSR-маркеры использовали для оценки взаимосвязей между экономически важными листовыми видами *Brassica* (Celucia et al., 2009). Используя 54 SSR-маркера и выборку из 94 образцов в результате скрининга и последующего филогенетического анализа была подтверждена тесная генетическая связь между подвидами *B. rapa ssp. chinensis* и *ssp. parachinensis*, а образцы *B. oleracea* сгруппировались в отдельный кластер. Микросателлитные маркеры успешно используют для классификации образцов *B. rapa*. В исследовании (Kubo et al., 2019a) была проведена филогенетическая классификация выборки из 50 образцов различных представителей вида *B. rapa*, а именно: броколетто, репа кочанная, листовая китайская капуста, японские образцы типа «nabana». Для этого в предыдущих исследованиях использовали восемь SSR-маркеров, разработанных для китайской капусты (Suwabe et al., 2002; 2006). По результатам микросателлитного скрининга было построено филогенетическое древо, которое разделило образцы на четыре группы по происхождению и по потребляемым в пищу органам. В целом, маркеры SSR и ISSR используются для изучения генетического разнообразия видов *Brassica* (Cui et al., 2008; Thakur et al., 2021), коллекционных и местных образцов *B. rapa* (Chen et al., 2017; 2020).

Для идентификации аллелей микросателлитных маркеров применяют капиллярный электрофорез, а также используют электрофорез в концентрированном агарозном геле для более точного разделения мелких фрагментов. Работы, проведённые на культурах *Triticum aestivum* L., *Brassica juncea* L. Czern. & Coss и *Vigna radiata* L. Wilczek подтверждают возможность идентификации ожидаемых фрагментов SSR-локусов и оценки полиморфизма аллельных вариантов при применении метода разделения ПЦП-продуктов в концентрированном 3,5% агарозном геле (Mekonnen et al., 2019; Singh et al., 2022; Saini et al., 2024). Данный метод был успешно

использован при проведении молекулярно-филогенетических исследований образцов рода *Brassica* – *B. juncea* и *B. oleracea* с применением SSR-маркеров семейств BRMS-, Na-, Ol-, KS- (Singh et al., 2017; Fateev, Artemyeva, 2020; Singh et al., 2022), использованных в данном исследовании.

Для уточнения филогенетических отношений используют не только микросателлитные, но и другие молекулярные маркеры, например маркеры амплифицированных областей с охарактеризованной нуклеотидной последовательностью (SCAR). Ранее 14 SCAR-маркеров были использованы для изучения 77 образцов шести культурных видов *Brassica*, и образцов семи диких видов *Brassica*, для проверки возможности амплификации этих маркеров у разных видов (Pankin, Khavkin, 2011). В работе показана возможность использования данного типа маркеров для идентификации видов, в частности видов с В-геномом и их природных гибридов.

Линия пекинской капусты Chiifu-401-42 была первым представителем диплоидного вида рода *Brassica*, для которого в 2011 году было проведено полное секвенирование генома (Wang et al., 2011). На данный момент актуальной является сборка референсного генома CAAS\_Brap\_v3.01, представленная в базе данных NCBI.

Мировая коллекция отдела генетических ресурсов растений овощных и бахчевых культур Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) на 2024 год содержит 1750 образцов *B. rapa* и 353 образца масличных культур различного селекционного статуса. Сформированная на основе мировой коллекции ВИР стержневая коллекция отражает широкое ботаническое разнообразие вида

*B. rapa*. Использование стержневой коллекции для изучения генетического разнообразия и выявления дешёвых, удобных маркерных систем с целью идентификации отдельных подвидов или сортоформ является перспективным направлением работы с коллекционным материалом, собранным в ВИР.

Основной целью данного исследования было изучение генетического разнообразия образцов *B. rapa* стержневой коллекции ВИР при помощи молекулярно-генетических маркеров. В задачи входило: выделение ДНК, подбор полиморфных молекулярных маркеров, проведение скрининга образцов коллекции, филогенетический анализ.

### Материалы и методы

Растительным материалом для проведения исследования послужили 73 образца стержневой коллекции вида *Brassica rapa* L. из мировой коллекции ВИР. Выборку дополнили пять образцов репы из Японии и Китая, образец пекинской капусты к-308 из Южной Кореи и образец китайской капусты к-116 Тайсай из Испании, ранее не входившими в стержневую коллекцию (табл. 1). В выборку вошли представители листовых культур из Китая, Канады, Кореи, России, Японии и стран Средней Азии. Корнеплодные репы представлены образцами селекции Дании, Нидерландов, России, Китая, Украины и Японии. Образцы сурепиц, яровой, озимой и лесной дикой, а также жёлтых и коричневых сарсонов, в данном исследовании происходят из Индии, Испании, Китая, Перу, Туниса и Швеции.

**Таблица 1. Список образцов коллекции вида *Brassica rapa* L. из мировой коллекции ВИР**  
**Table 1. List of accessions from the collection of *Brassica rapa* L. species in the VIR global collection**

| №  | Номер в каталоге<br>ВИР/<br>VIR catalogue<br>number | Название образца/<br>Accession name | Происхождение/<br>Origin | Сортоформ/ Cultivar<br>type | Подвид, разновидность/<br>Subspecies, variety        |
|----|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------|
| 1  | к-372                                               | ‘Bansei Mana’                       | Япония                   | Мана                        | Японские листовые овощи                              |
| 2  | к-98                                                | ‘Osaka Market’                      | Япония                   | Сирона                      |                                                      |
| 3  | к-217                                               | ‘Okute Osaka Shirona’               | Япония                   | Сирона                      |                                                      |
| 4  | к-100                                               | ‘Hikoshima spring’                  | Япония                   | Чиримен                     |                                                      |
| 5  | к-335                                               | ‘Hiroshimana’                       | Япония                   | Хирошимана                  |                                                      |
| 6  | к-238                                               | ‘Nagoya Market’                     | Япония                   | Нагасаки                    |                                                      |
| 7  | к-53                                                | ‘Местный’                           | Казахстан                | Сяо                         | ssp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt<br>(пекинская) |
| 8  | к-74                                                | ‘Сяобайкоу’                         | Китай                    | Сяо                         |                                                      |
| 9  | к-89                                                | ‘Доу-образная раннеспелая’          | Китай                    | Сяо                         |                                                      |
| 10 | к-58                                                | ‘Би-це’                             | Киргизия                 | Шантунг                     |                                                      |
| 11 | к-210                                               | ‘Kariba Cento’                      | Япония                   | Шантунг                     |                                                      |
| 12 | к-108                                               | ‘Местный’                           | Китай                    | Шантунг                     |                                                      |
| 13 | к-132                                               | ‘Kasin’                             | Япония                   | Касин                       |                                                      |
| 14 | к-247                                               | ‘Хасинбечу’                         | Ю.Корея                  | Касин                       |                                                      |

| №  | Номер в каталоге<br>ВИР/<br>VIR catalogue<br>number | Название образца/<br>Accession name | Происхождение/<br>Origin | Сортотип/ Cultivar<br>type   | Подвид, разновидность/<br>Subspecies, variety               |
|----|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 15 | к-122                                               | ‘Лен-син-дзон’                      | Китай                    | Чосен                        | ssp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt<br>(пекинская)        |
| 16 | к-207                                               | ‘Chosen’                            | Япония                   | Чосен                        |                                                             |
| 17 | к-63                                                | ‘Местный’                           | Китай                    | Аити                         |                                                             |
| 18 | к-131                                               | ‘Aichi’                             | Япония                   | Аити                         |                                                             |
| 19 | к-111                                               | ‘Nozaki Early’                      | Япония                   | Нозаки                       |                                                             |
| 20 | к-327                                               | ‘Nozaki Harumaki’                   | Япония                   | Нозаки                       |                                                             |
| 21 | к-103                                               | ‘Kaga’                              | Япония                   | Кага                         |                                                             |
| 22 | к-88                                                | ‘Цзюй-син-бао-тоу-бай-<br>цай’      | Китай                    | Кага                         |                                                             |
| 23 | к-127                                               | ‘Hotoren’                           | Япония                   | Хоторен                      |                                                             |
| 24 | к-110                                               | ‘Matsushima №2’                     | Япония                   | Чи-фу                        |                                                             |
| 25 | к-222                                               | ‘Kensin’                            | Япония                   | Кенсин                       |                                                             |
| 26 | к-164                                               | ‘Michihli’                          | Канада                   | Гранат                       |                                                             |
| 27 | к-71                                                | ‘Хэ-тоу-вень’                       | Китай                    | Гранат                       |                                                             |
| 28 | к-56                                                | ‘Да-цин-коу’                        | Китай                    | Да-цин-коу                   |                                                             |
| 29 | к-128                                               | ‘Цужита’                            | Япония                   | Да-цин-коу                   |                                                             |
| 30 | к-198                                               | ‘Местный’                           | Китай                    | Да-цин-коу                   |                                                             |
| 31 | к-139                                               | ‘Дунганская’                        | Казахстан                | Дунганская                   |                                                             |
| 32 | к-308                                               | Naesuhbaekno-baechu                 | Ю. Корея                 |                              |                                                             |
| 33 | к-96                                                | Шантай                              | Китай                    |                              | Стабильные гибриды между<br>подвидами                       |
| 34 | к-302                                               | Тохоку F1 Гуриин Дэ бюу             | Япония                   |                              |                                                             |
| 35 | к-331                                               | White Long Petiole                  | Япония                   |                              |                                                             |
| 36 | к-436                                               | Benri-Na (Benrina)                  | Япония                   |                              |                                                             |
| 37 | к-75                                                | ‘Пиорбай’                           | Китай                    | Пиорбай                      | ssp. <i>chinensis</i> (L.) Hanelt<br>(китайская)            |
| 38 | к-77                                                | ‘Сыюсман’                           | Китай                    | Сыюсман                      |                                                             |
| 39 | вр. к-930                                           | ‘Майская 8’                         | Китай                    | Сыюсман                      |                                                             |
| 40 | к-46                                                | ‘Тай-на’ (Салат японский)           | Россия                   | Тайсай                       |                                                             |
| 41 | к-106                                               | ‘Янцай’                             | Китай                    | Тайсай                       |                                                             |
| 42 | к-214                                               | ‘Nicanme Jukijiro Taisai’           | Япония                   | Тайсай                       |                                                             |
| 43 | к-195                                               | ‘Местный’                           | Китай                    | Ю-тсай (var. <i>Utilis</i> ) |                                                             |
| 44 | к-203                                               | ‘Ching Pamg Yu Tsai’                | Китай                    | Ю-тсай (var. <i>Utilis</i> ) |                                                             |
| 45 | к-116                                               | ‘Taisai’                            | Испания                  | Тайсай                       |                                                             |
| 46 | к-84                                                | ‘Хэе-ю-та-цай’                      | Китай                    | Та-гу-цай                    | var. <i>rosularis</i> (Tsen and Lee)<br>Hanelt (розеточная) |
| 47 | к-129                                               | ‘Та-гу-цай’                         | Китай                    | Та-гу-цай                    | var. <i>narinosa</i> (Bailey) Hanelt<br>(ноздреватая)       |
| 48 | к-154                                               | ‘Chrysanthemum heart’               | Китай                    | Хризантениум                 | var. <i>purpuraria</i> Bailey<br>(пурпурная)                |
| 49 | к-213                                               | ‘Bitamin Na’                        | Япония                   | Хризантениум                 | ssp. <i>nipposinica</i> (Bailey) Hanelt<br>(японская)       |
| 50 | к-391                                               | Xing Yang                           | Китай                    |                              | ssp. <i>rapa</i> L. f. <i>komatsuna</i><br>(листовая репа)  |
| 51 | к-115                                               | ‘Mibuna’                            | Япония                   | Мибуна                       | ssp. <i>rapa</i> L.<br>(репа)                               |
| 52 | к-159                                               | ‘Mizuna’                            | Япония                   | Мизуна                       |                                                             |
| 53 | к-241                                               | ‘Shiroguki Kyona’                   | Япония                   | Мизуна                       |                                                             |
| 54 | к-215                                               | ‘Uzuki Komatsuna’                   | Япония                   | Комацуна                     |                                                             |
| 55 | к-242                                               | ‘Goseki Late’                       | Япония                   | Комацуна                     |                                                             |
| 56 | к-264                                               | ‘Kuroha’                            | Япония                   | Куроха                       |                                                             |
| 57 | к-163                                               | ‘Местный’                           | Китай                    | Китайский                    |                                                             |
| 58 | к-307                                               | ‘Ostersundom’                       | Дания                    | Остерзундомский              |                                                             |
| 59 | к-385                                               | ‘Бортфельдский’                     | Россия                   | Бортфельдский                |                                                             |
| 60 | к-738                                               | ‘Карельская’                        | Россия                   | Карельская                   |                                                             |
| 61 | к-821                                               | ‘Гробовская’                        | Россия                   | Гробовская                   |                                                             |
| 62 | к-826                                               | ‘Миланская белая’                   | Россия                   | Миланская белая              |                                                             |
| 63 | к-830                                               | ‘Петровская Д-10’                   | Россия                   | Петровская                   |                                                             |

| №  | Номер в каталоге<br>ВИР/<br>VIR catalogue<br>number | Название образца/<br>Accession name | Происхождение/<br>Origin | Сортотип/ Cultivar<br>type | Подвид, разновидность/<br>Subspecies, variety                                |
|----|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 64 | к-984                                               | ‘Норфолькский<br>фиолетовоголовый’  | Нидерланды               | Норфолькский               | ssp. <i>rapa</i> L.<br>(репа)                                                |
| 65 | к-1050                                              | ‘Волынский’                         | Украина                  | Волынский                  |                                                                              |
| 66 | к-1283                                              | ‘Colden ball’                       | Нидерланды               | Золотой шар                |                                                                              |
| 67 | к-2192                                              | ‘Чумагу’                            | Китай                    | Западно-китайский          |                                                                              |
| 68 | к-2227                                              | ‘Hinona’                            | Япония                   | Японский                   |                                                                              |
| 69 | к-2228                                              | ‘Hida Beni’                         | Япония                   | Каида                      |                                                                              |
| 70 | вр. к-2241                                          | ‘Tennouji Kabura’                   | Япония                   | Японский                   |                                                                              |
| 71 | вр. к-2243                                          | ‘Tokyo Market’                      | Япония                   | Японский                   |                                                                              |
| 72 | к-68                                                | Местный                             | Китай                    |                            | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i><br>(сурепица яровая)   |
| 73 | к-106                                               | Lotni mustard                       | Индия                    |                            |                                                                              |
| 74 | к-108                                               | Arlo                                | Швеция                   |                            |                                                                              |
| 75 | к-248                                               | Local                               | Испания                  |                            |                                                                              |
| 76 | к-166                                               | Root mustard                        | Тунис                    |                            | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>biennis</i><br>(сурепица озимая) |
| 77 | к-218                                               | Nabo Silvestre                      | Перу                     |                            | ssp. <i>sylvestris</i> (Lam.) Janchen<br>(сурепица лесная дикая)             |
| 78 | к-131                                               | Type I                              | Индия                    |                            | ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.) Hanelt<br>(желтый сарсон)                   |
| 79 | к-188                                               | Palton sarson 66                    | Индия                    |                            |                                                                              |
| 80 | к-135                                               | Ds 17                               | Индия                    |                            | ssp. <i>dichotoma</i> (Roxb.) Hanelt<br>(коричневый сарсон)                  |

Выделение геномной ДНК проводили из молодых зелёных настоящих листьев 10-15 растений с получением объединённой (bulk-) пробы. Использовали два метода: SDS-экстракцию (Dorokhov, Kloke, 1997) и СТАВ-экстракцию (Antonova et al., 2020). Оценку качества и концентрации полученных ДНК-проб проводили методом спектрофотометрии с использованием наноспектрофотометра «NanoPhotometer N60» (Implen, Германия). Качественную оценку полученной ДНК проводили при помощи гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Молекулярно-генетический скрининг проведён с использованием 17 маркеров: 15 SSR-маркеров семейств BRMS, Ol, Na, Ra и KS, одного EST-SSR-маркера BoESSR089 и молекулярного маркера A03 (табл. 2). Информация о праймерах, местах локализации комплементарных им последовательностей ДНК в геноме, ожидаемых фрагментах в картирующих популяциях, мотивов ДНК-маркеров была взята из публикаций авторов и публичных баз данных – VegMarks, 2024; Brassica.info, 2024.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по методикам авторов маркеров (см. табл. 2). Однако в ряде случаев температура отжига праймеров ( $T^m$ ) была скорректирована в связи с использованием отличных от используемых авторами реактивов и оборудования. В настоящем исследовании состав реакционной смеси (20 мкл) включал: 4 мкл ДНК (10 нг/мкл), 2 мкл 10×буфера для ПЦР, 1 мкл  $MgCl_2$  (50 mM), 1,2 мкл dNTPs (10 mM каждого), 0,1 мкл прямого и обратного прайме-

ров (100 мкМ), 1 U BioTaq-полимеразы (Dialat, Россия) и 14,4 мкл воды. Разделение фрагментов ПЦР было проведено в 3,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для визуализации результатов электрофореза была использована система «Gel-Doc XR» (Bio-Rad, США). Размеры полученных аллелей были рассчитаны при помощи программы «Image Lab 6.0.1» (Bio-Rad, США). Результаты молекулярно-генетического скрининга были занесены в бинарную матрицу и проанализированы в программе STRUCTURE 2.3.4 (Stanford University, США), рекомендованной для исследования структуры популяции в случае содержания в генотипах полиморфных локусов. Полученные данные были дополнительно обработаны в программе «StructureSelector» (Institute of Oceanology, Китай) для определения максимального значения показателя наиболее достоверного варианта кластеризации ΔK (рис. 2).

Для уточнения места локализации молекулярных маркеров в геноме *B. rapa* и определения длины ожидаемых фрагментов амплифицированной ДНК проведён анализ *in silico* с использованием программ «BLAST» (NCBI, США) и «UniPro UGENE» (Унипро, Россия) (табл. 3). В качестве референса был использован геном китайской капусты Chiifu-401-42, CAAS\_Brap\_v3.01, опубликованный в базе данных NCBI (см. табл. 3).

Характеристика эффективности полиморфных микросателлитных локусов проводилась с применением статистической обработки в программе iMEC (Amiryousefi et al., 2018; Online Marker Efficiency Calculator, 2024).

Анализ полиморфизма отдельных молекулярных маркеров проводили по следующим параметрам: Н – ожидаемая гетерозиготность, PIC – величина информационного полиморфизма, EMR – эффективное мультиплексное отношение, MI – маркерный индекс, D – дискриминационная сила, и R – разрешающая способность маркера (табл. 4).

Таблица 2. Молекулярные маркеры, использованные в исследовании  
Table 2. Molecular markers used in the study

| Маркер/<br>Marker | Последовательность праймеров<br>(5'→ 3')/ Primer sequence (5'→ 3') | LG<br>Группа<br>сцепления/<br>Linkage<br>group | Мотив ДНК/<br>DNA motif                                                    | Ожидаемый<br>размер<br>фрагментов,<br>пн/<br>Expected<br>fragment<br>size, bp | Ссылка/<br>Reference      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| A03-F/<br>A03-R   | F: AGGTTTCGACCACCATGACTC<br>R: TGGGGTGTTTACACAAAGCTC               | A01                                            | -                                                                          | нет<br>информации                                                             | (Kim et al., 2011)        |
| BoESSR089         | F: ATGATCAGCGAAACCACTCC<br>R: TGATACATCCCGTTTGCTCA                 | C01                                            | (CTG) <sub>12</sub>                                                        | 259                                                                           | (Izzah et al., 2014)      |
| BRMS-008          | F:AGGACACCAGGCACCATATA<br>R: CATTGTTGTCTTGGGAGAGC                  | R3                                             | (TC) <sub>30</sub>                                                         | 215                                                                           | (Suwabe et al., 2006)     |
| BRMS-042          | F: GGATCAGTTATCTGCACCACAA<br>R: TCGGAATTGGATAAGAATTCAA             | R3                                             | (AAT) <sub>4</sub> (CT) <sub>4</sub><br>(T) <sub>2</sub> (CT) <sub>4</sub> | 122                                                                           | (Hatakeyama et al., 2010) |
| BRMS-043          | F: GCGATGTTTTTCTTCAGTGTC<br>R: TTAATCCCTACCCACAATTTCC              | R3                                             | (A) <sub>21</sub> (T) <sub>14</sub> (GT) <sub>6</sub>                      | 318                                                                           | (Suwabe et al., 2006)     |
| BRMS-050          | F: AACTTTGCTTCCACTGATTTTT<br>R: TTGCTTAACGCTAAATCCATAT             | R3                                             | (AAT) <sub>4</sub> (TC) <sub>19</sub> (TTC) <sub>3</sub>                   | 164                                                                           | (Hatakeyama et al., 2010) |
| Na12-E02          | F: TTGAAGTAGTTGGAGTAATTGGAGG<br>R: CAGCAGCCACAACCTTACG             | R3                                             | (TTG) <sub>13</sub>                                                        | 104, 132                                                                      | (Lowe et al., 2004)       |
| Na10-D09          | F: AAGAACGTCAAGATCCTCTGC<br>R: ACCACCACGGTAGTAGAGCG                | R4                                             | diGT/CA                                                                    | 273, 281, 366                                                                 | (Lowe et al., 2004)       |
| BRMS-007          | F: AAATTGTTTCTCTTCCCCAT<br>R: GTGTTAGGGAGCTGGAGAAT                 | R5                                             | (CT) <sub>24</sub>                                                         | 119,144,<br>151,157,159                                                       | (Suwabe et al., 2006)     |
| BRMS-034          | F: GATCAAATAACGAACGGAGAGA<br>R: GAGCCAAGAAAGGACCTAAGAT             | R5                                             | (GA) <sub>18</sub>                                                         | 124, 144                                                                      | (Suwabe et al., 2006)     |
| BRMS-014          | F: CCGTAAGGAATATTGAGGCA<br>R: TTCCCAATTCTCAAACGGTA                 | R6                                             | (TC) <sub>15</sub>                                                         | 263, 265, 272,<br>278, 285, 291,<br>293                                       | (Suwabe et al., 2006)     |
| Na14-G02          | F: TTCCCTTTATTGAGCAAGCTG<br>R: TCCCGGTCGCTAAGATATTG                | R8                                             | (GA/CT) <sub>17</sub>                                                      | нет<br>информации                                                             | (Lowe et al., 2004)       |
| Ol12-G04          | F: CGAACATCTTAGGCCGAATC<br>R: GGTTAACCTGCGGGATATTG                 | R8                                             | diGT/CA                                                                    | 145, 157, 178                                                                 | (Lowe et al., 2004)       |
| Ra2-E12           | F: TGTCAGTGTGTCCACTTCGC<br>R: AGAGAAACCCAATAAAGTAGAACC             | R8                                             | diGT/CA                                                                    | нет<br>информации                                                             | (Lowe et al., 2004)       |
| BRMS-051          | F: GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA<br>R: GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG             | R9                                             | (TC) <sub>15</sub>                                                         | 248, 249, 262                                                                 | (Suwabe et al., 2006)     |
| Ol10-D08          | F: TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC<br>R: GAGCTGTATGTCTCCCGTGC              | R9                                             | нет информации                                                             | 175, 247                                                                      | (Lowe et al., 2004)       |
| KS50200           | F: GAGTGGGATTCTCATCATGG                                            | нет<br>информации                              | нет информации                                                             | нет<br>информации                                                             | (MBGP)*                   |

\*MBGP (Multinational Brassica Genome Project) SSR-маркер, разработанный в рамках международного проекта по секвенированию генома рода *Brassica* (Brassica.info, 2024)  
\*MBGP (Multinational Brassica Genome Project) SSR marker developed as part of the international project to sequence the genome of the genus *Brassica* (Brassica.info, 2024)

Таблица 3. Результаты молекулярного скрининга и анализа *in silico*Table 3. Results of molecular screening and *in silico* analysis

| Группа сцепления/<br>Linkage group | Маркер/<br>Marker | Ожидаемый размер фрагмента по результатам BLAST анализа, пн/<br>Expected fragment size based on BLAST, bp | Число аллелей/<br>Number of alleles | Эмпирический размер фрагментов, пн/<br>Empirical fragment size, bp | Локус в геноме CAAS_Brap_v3.01/<br>Locus in CAAS_Brap_v3.01 genome | Ген/ Gene                                  |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| A01                                | A03-F/<br>A03-R   | 560                                                                                                       | 2                                   | 480-560                                                            | LOC103850050                                                       | <i>IPUT1</i>                               |
| A01                                | BoESSR089         | 268                                                                                                       | 8                                   | 195-304                                                            | LOC103834588                                                       | <i>TIC</i>                                 |
| A03                                | BRMS-008          | 217                                                                                                       | 11                                  | 146-350                                                            | LOC103856816                                                       | Локус не охарактеризован                   |
| A03                                | BRMS-042          | 136                                                                                                       | 3                                   | 110-136                                                            | LOC103860630                                                       | <i>PP2A10</i>                              |
| A03                                | BRMS-043          | 297                                                                                                       | 6                                   | 280-340                                                            | LOC103857484                                                       | Локус не охарактеризован                   |
| A03                                | BRMS-050          | 162                                                                                                       | 5                                   | 155-200                                                            | LOC103860630                                                       | <i>PP2A10</i>                              |
| A03                                | Na12-E02          | 103                                                                                                       | 7                                   | 85-140                                                             | LOC103857514                                                       | <i>WOX9</i>                                |
| A03                                | KS50200           | 295                                                                                                       | 6                                   | 280-320                                                            | LOC103855971                                                       | <i>procardsin-A</i>                        |
| A03 / A04**                        | Na14-G02          | 204/198**                                                                                                 | 6                                   | 184-226                                                            | LOC103861571/                                                      | <i>LAFL1</i> / Локус не охарактеризован ** |
|                                    |                   |                                                                                                           |                                     |                                                                    | LOC103861572**                                                     |                                            |
| A04                                | Na10-D09          | 272                                                                                                       | 7                                   | 266-390                                                            | LOC103862953                                                       | <i>F-box</i>                               |
| A05                                | BRMS-007          | 180                                                                                                       | 11                                  | 120-195                                                            | LOC103870797                                                       | Локус не охарактеризован                   |
| A05                                | BRMS-034          | 123                                                                                                       | 9                                   | 116-164                                                            | LOC103866745                                                       | <i>STADS_BRANA</i>                         |
| A06                                | BRMS-014          | 282                                                                                                       | 10                                  | 172-340                                                            | -                                                                  | -                                          |
| A08                                | O112-G04          | 171                                                                                                       | 18                                  | 114-460                                                            | LOC108869426                                                       | Локус не охарактеризован                   |
| A08                                | Ra2-E12           | 192                                                                                                       | 15                                  | 127-390                                                            | LOC103834552                                                       | <i>TIFY8</i>                               |
| A09                                | BRMS-051          | 265                                                                                                       | 2                                   | 248-265                                                            | LOC103841374                                                       | <i>AMP1</i>                                |
| -                                  | O110-D08          | -                                                                                                         | 7                                   | 175-270                                                            | -                                                                  | -                                          |
|                                    |                   | Всего аллелей                                                                                             | 133                                 |                                                                    |                                                                    |                                            |

\*\* Маркер Na14-G02 в результате BLAST анализа был идентифицирован в локусах двух хромосом с идентичной достоверностью/  
Na14-G02 marker was identified as a result of BLAST analysis in the loci of two chromosomes with identical reliability

### Результаты

Семнадцать молекулярных маркеров были изучены с использованием 80 образцов *B. rapa* мировой коллекции ВИР (рис. 1). В результате получены данные о размере фрагментов, соответствующих аллелям, характеризующим образцы выборки. В совокупности в проанализированных локусах было выявлено 133 аллеля или 7,8 аллеля в среднем на один исследованный локус (см. табл. 3). Размеры аллелей SSR-локусов варьировали от 85 пн (Na12-E02) до 460 пн (O112-G04). Молекулярный маркер A03-F/ A03-R, дополнительно взятый в исследование, позволил идентифицировать два аллеля, 480 и 560 пн. Все SSR-локусы оказались полиморфными, число аллелей варьировало от двух (BRMS-051) до 18 (O112-G04). Статистическая оценка результатов молеку-

лярного скрининга (табл. 4) была проведена в программе iMEC. Индекс величины информационного полиморфизма (PIC) был от 0,218 (BRMA-043) до 0,322 (O112-G04). Индекс PIC>0,3 отмечен также у локусов BRMS-007, BoESSR089, Ra2-E12, а среднее значение PIC составило 0,278. Наивысший показатель ожидаемой гетерозиготности (H) – 0,499 был у локуса BRMS-042, а наименьший – 0,207 у локуса O112-G04, при среднем 0,35. Индекс эффективного мультиплексного отношения (EMR) в среднем составил 1,733 и варьировал от 2,675 (Na12-E02) до 0,612 (A03F/A03R). Дискриминационная сила маркеров (D) составила 0,986 у O112-G04 и 0,351 у BRMS-051 со средним значением 0,895. Оценка разрешающей способности маркера, при среднем в 2,85, варьировала от 4,45 (O112-G04) до 0,775 (BRMS-051). Маркерный индекс имел пределы – 0,0003 (O112-G04) и 0,0022 (Na12-E02).

**Таблица 4. Результаты статистического анализа аллельного полиморфизма у образцов *Brassica rapa***  
**Table 4. Results of statistical analysis of allelic polymorphism of *Brassica rapa* accessions**

| Маркер/<br>Marker | H            | PIC          | EMR          | MI            | D            | R           |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|-------------|
| A03-F/A03-R       | 0,425        | 0,253        | 0,6125       | 0,0016        | 0,907        | 1,225       |
| BRMS-007          | 0,28         | 0,304        | 1,85         | 0,0006        | 0,972        | 3,7         |
| BRMS-008          | 0,32         | 0,292        | 2,2          | 0,0008        | 0,96         | 4,35        |
| BRMS-014          | 0,326        | 0,289        | 2,05         | 0,0008        | 0,958        | 3,8         |
| BRMS-034          | 0,301        | 0,298        | 1,6625       | 0,0007        | 0,966        | 3,325       |
| BRMS-042          | 0,499        | 0,218        | 1,55         | 0,003         | 0,734        | 0,95        |
| BRMS-043          | 0,397        | 0,264        | 1,6375       | 0,001         | 0,926        | 2,875       |
| BRMS-050          | 0,449        | 0,242        | 1,7          | 0,002         | 0,885        | 2,35        |
| BRMS-051          | 0,312        | 0,294        | 1,6125       | 0,003         | 0,351        | 0,775       |
| BoESSR089         | 0,272        | 0,306        | 1,3          | 0,0005        | 0,974        | 2,55        |
| Na10-D09          | 0,397        | 0,264        | 1,9125       | 0,0013        | 0,926        | 3,825       |
| Na12-E02          | 0,472        | 0,231        | 2,675        | 0,0022        | 0,854        | 3,7         |
| Na14-G02          | 0,33         | 0,289        | 1,25         | 0,0008        | 0,957        | 2,5         |
| Ol10-D08          | 0,328        | 0,289        | 1,45         | 0,0008        | 0,957        | 0,9         |
| Ol12-G04          | 0,207        | 0,322        | 2,225        | 0,0003        | 0,986        | 4,45        |
| Ra2-E12           | 0,238        | 0,315        | 2,075        | 0,0004        | 0,981        | 4,15        |
| KS50200           | 0,406        | 0,261        | 1,7          | 0,0014        | 0,92         | 3,1         |
| <b>Среднее</b>    | <b>0,351</b> | <b>0,278</b> | <b>1,733</b> | <b>0,0013</b> | <b>0,895</b> | <b>2,85</b> |

Примечание: H – ожидаемая гетерозиготность, PIC – величина информационного полиморфизма; EMR – эффективное мультиплексное отношение; MI – маркерный индекс; D – дискриминационная сила; R – разрешающая способность маркера/ Note: H – expected heterozygosity, PIC – polymorphism information content; EMR – effective multiplex ratio; MI – marker index; D – discriminating power; R – resolving power

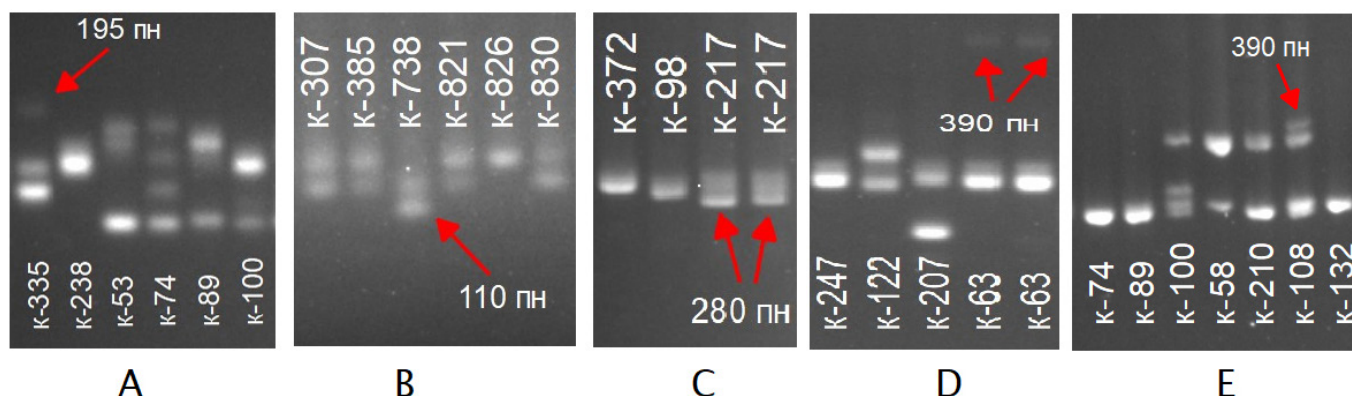
Среди изученных SSR-локусов отмечали встречаемость редких и уникальных аллелей. Аллели были отнесены к редким, если их частота идентификации в выборке не превышала 5%, в случае данного исследования не более трёх образцов. Уникальным был определен аллель, если он встречался только у одного образца выборки. Редкие аллели были найдены у локусов BRMS-007 (один аллель, 1), BRMS-008 (1), BRMS-014 (2), BRMS-034 (1), BRMS-042 (2), BRMS-043 (1), BoESSR089 (1), Na10-D09 (1), Ol10-D08 (1), Ol12G04 (5), Ra2-E12 (2). Уникальные аллели (рис. 1) были идентифицированы у образцов пекинской капусты к-63 (Ra2-E12, 390 пн) и к-108 (Na10-D09, 390 пн), японских листовых овощей к-335 (BRMS-007, 195 пн) и к-217 (BRMS-043, 280 пн), а также у образца репы к-738 (BRMS-042, 110 пн).

Аллель 123 пн маркера BRMS-007 присутствовала во всех образцах сарсонов и сурепиц, кроме к-68, во всех листовых репах, а также в 13 из 15 образцов корнеплодных реп. Данный аллель отсутствовал во всех образцах пекинской капусты, кроме двух образцов к-89 и к-122.

Другой аллель данного маркера – 139 пн был специфичен только для образцов сурепиц и сарсонов, взятых в выборке, и отсутствовал у 86% пекинской капусты и 75% реп.

Для маркера BRMS-034 характерен аллель 136 пн, который также был идентифицирован только у образцов реп и представителей сурепиц и сарсонов. Данный аллель встречался только у 16 образцов других подвидов (28% оставшейся выборки) при этом 11 из этих образцов относились к пекинской капусте, а два – к китайским.

Аллель 281 пн маркера Na10-D09 идентифицирован у всех сурепиц, сарсонов и образцов японских листовых овощей, тогда как у других образцов он был идентифицирован только у 18 образцов, 11 из которых были японского происхождения. Другие два аллеля данного маркера 263 пн и 273 пн отсутствовали у всех образцов китайской, розеточной и ноздреватой капусты. При этом аллель 263 пн присутствовал у 73% ДНК-проб репы, а 273 пн у 87% проб.



**Рис. 1. Уникальные аллели, идентифицированные у образцов *Brassica rapa***

A) BRMS-007, отмечен уникальный аллель 195 пн у представителя японских листовых овощей ‘Hiroshimana’ (к-335); B) BRMS-042, отмечен уникальный аллель 110 пн образца *ssp. rapa* L. ‘Карельская’ (к-738); C) BRMS-043, отмечен уникальный аллель 280 пн образца японских листовых овощей ‘Okute Osaka Shirona’ (к-217); D) Ra2-E12, отмечен уникальный аллель 390 пн местного образца *ssp. pekinensis* (к-63); E) Na10-D09, отмечен уникальный аллель 390 пн местного образца *ssp. pekinensis* (к-108)

**Fig. 1. Unique alleles identified in *Brassica rapa* accessions**

A) BRMS-007, a unique 195 bp allele in an accession of Japanese leafy vegetable ‘Hiroshimana’ (k-335); B) BRMS-042, a unique 110 bp allele of the *ssp. rapa* L. ‘Karel'skaya’ (k-738); C) BRMS-043, a unique 280 bp allele in an accession of Japanese leafy vegetable ‘Okute Osaka Shirona’ (k-217); D) Ra2-E12, a unique 390 bp allele in an accession of local *ssp. pekinensis* (k-63); E) Na10-D09, a unique 390 bp allele in an accession of *ssp. pekinensis* (k-108)

Для китайских капуст в данном исследовании не было обнаружено уникальных аллелей, позволявших отличать их от образцов пекинских капуст, однако аллель 261 пн маркера BoESSR089, идентифицированный у всех образцов китайской капусты, отсутствовал у всех образцов сурепиц кроме к-68, и у 68% образцов пекинских капуст.

Для образцов китайской селекции определены локусы, аллели которых найдены у более чем 85% таких образцов. Это маркеры BRMS-008 (200 пн), BRMS-042 (122 пн), BRMS-051 (248 пн), BRMS-051 (262 пн), Na12-E02 (100 пн), O110-D08 (175 пн). Аллель 175 пн локуса O110D08 идентифицирован во всех китайских образцах, а аллель 248 пн локуса BRMS-051 во всех образцах за исключением китайской капусты к-106.

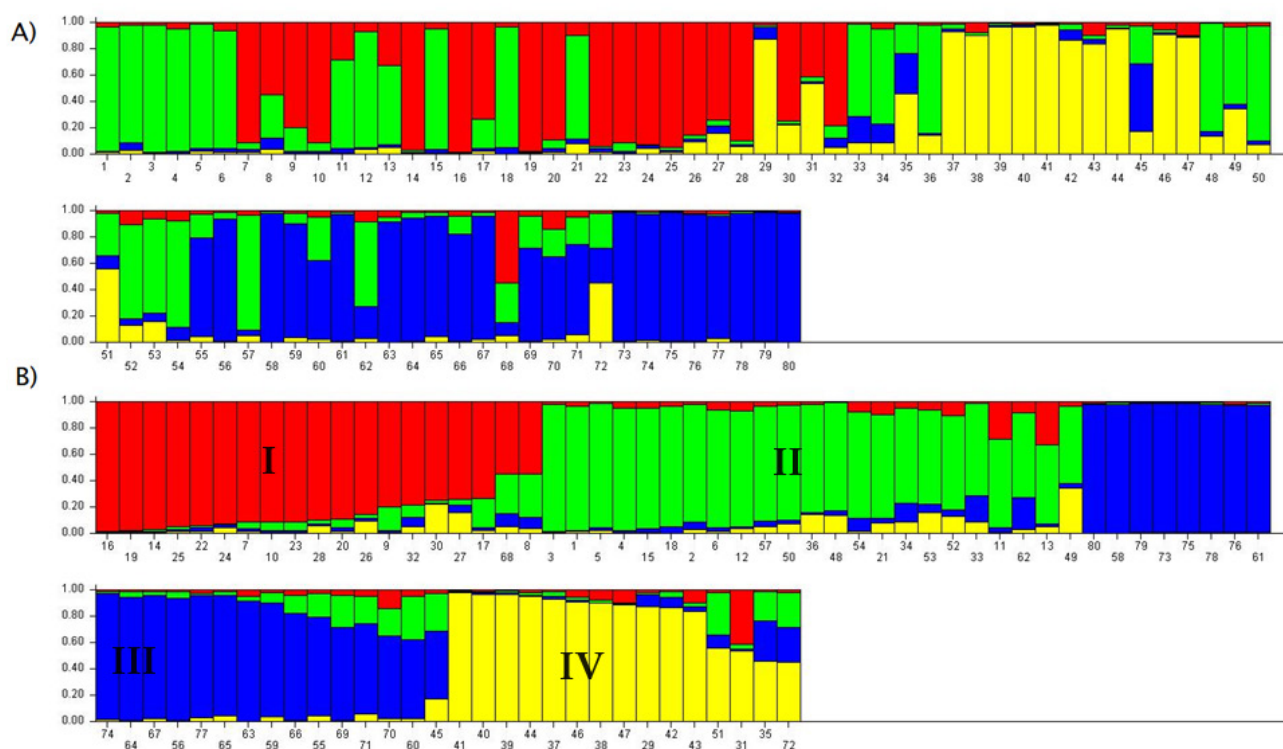
Образцы из Японии в более чем 80% выборки несли аллели маркеров BRMS-042 (136 пн), BRMS-051 (248 пн), BRMS-051 (262 пн), Na12-E02 (100 пн), O110-D08 (175 пн).

Дополнительно взятый в исследование молекулярный маркер A03-F/A03-R, проявлял слабый полиморфизм, однако он с достаточной точностью позволял отличать пекинские капусты совместно с японскими листовыми овощами от остальных образцов выборки – аллели маркера были обнаружены только у восьми образцов других подвидов. Аллель 480 пн был идентифицирован только у 26 образцов пекинских капуст, китайской капусты к-77 и образца капусты ноздреватой к-213.

Данные по наличию (1) или отсутствию (0) аллеля для каждого образца были занесены в бинарную матрицу. В дальнейшем эта матрица была проанализирована

в программе STRUCTURE. Чтобы уточнить достоверное количество групп (кластеров) из выходных данных STRUCTURE, применили метод «дельта К» ( $\Delta K$ ) используя программу «StructureSelector». Наибольшее значение  $\Delta K$  было при распределении образцов на четыре кластера ( $\Delta K=35,8$ ). Первый кластер (I) включал образцы пекинской капусты, второй кластер (II) японские листовые овощи, ноздреватую, пурпурную, японскую капусту и стабильные гибриды между подвидами *B. rapa*, в третий кластер (III) преимущественно вошли образцы репы, сурепицы и сарсонов, а в четвертый кластер (IV) китайские и розеточные капусты (рис. 2).

В результате анализа *in silico* (см. табл. 3) локализации посадки праймеров в актуальной сборке CAAS\_Brap\_v3.01 референсного генома линии Chiifu-401-42 подтвердилась ранее опубликованная в базе данных NCBI информация о локализации на хромосомах всех маркеров семейств BRMS-, Na-, OI- и Ra-, кроме маркера O110-D08. Для маркера O110-D08 в данной работе не удалось установить его местоположение в референсном геноме. Уточнено место посадки праймеров маркера BoESSR089 на хромосоме A01 в геноме *B. rapa*. Для маркера KS50200 в данном исследовании был определен локус на хромосоме A03. Последовательности, комплементарные паре праймеров для маркера Na14-G04, были найдены в двух местах в геноме – на хромосомах A03 и A04 с одинаковой достоверностью. Для всех маркеров, кроме O110-D08, уточнены данные ожидаемых фрагментов согласно референсному геному линии Chiifu-401-42.



**Рис. 2. Результаты кластеризации взятых в исследование образцов по результатам анализа в программе STRUCTURE**

Арабскими цифрами обозначены порядковые номера образцов согласно таблице 1. А) распределение вклада каждого кластера в образец выборки; В) состав образцов для каждого кластера; римскими цифрами отмечены четыре кластера

**Fig. 2. Results of the studied accessions clustering based on the results of analysis in the STRUCTURE program**

Accessions are numbered by Arabic numerals as in Table 1. A) distribution of the contribution of each cluster to an accession; B) composition of accessions for each cluster; four clusters are marked with Roman numerals

Пятнадцать пар праймеров были внутрилокусными, но только одиннадцать из этих локусов были связаны с генами. Функции генов связаны с защитными механизмами растений, с влиянием на метаболизм и биосинтез жирных кислот, с участием в сигнальных путях и с развитием гипокотилия и корневой системы. Локализация маркера Na14-G04 позволила установить, что пара праймеров комплементарна последовательностям в двух хромосомах A03 и A04, а размеры ожидаемых фрагментов достаточно близки – 204 пн и 198 пн, соответственно.

### Обсуждение

Непрерывная селекция культур *Brassica rapa* во многих регионах мира приводит к тому, что традиционная таксономия не всегда может отражать филогенетические отношения внутри подвидов (Pankin, Khavkin, 2011). Различные исследования, основанные на морфологическом описании и ограниченной выборке молекулярных маркеров, отражают высокую генотипическую изменчивость вида.

Использование различных маркерных систем и, в частности, микросателлитных маркеров для изучения коллекций является хорошим инструментом в руках исследователей для анализа отношений внутри вида и генотипирования образцов. Используемая в данной работе выборка охватывала образцы из стран, как основных современных регионов выращивания (Индию, Китай, Ю. Корея, Япония), так и из стран Европы, Северной и Южной Америки. Ранее в молекулярных исследованиях *B. rapa*, проводимых в ВИР, не присутствовали образцы репы из Японии (Berensen et al., 2016; Artemyeva et al., 2017). В предыдущих исследованиях были использованы в общей сложности 45 образцов *B. rapa* и девять микросателлитных маркеров. Расширение выборки образцов до 80 и молекулярных маркеров до 17 позволило более точно определить филогенетические отношения внутри вида и выявить аллели для идентификации ряда образцов.

Полученные результаты молекулярно-генетического скрининга 80 образцов коллекции ВИР с использованием 17 молекулярных маркеров показали высокий

уровень внутривидового полиморфизма. Размеры ожидаемых аллелей были идентифицированы *in silico* для всех микросателлитных маркеров. Были изучены 133 аллеля или в среднем 7,8 аллелей на локус, что несколько больше, чем в других исследованиях с использованием этих семейств маркеров. Например, полиморфизм при анализе образцов *B. rapa* в других исследованиях варьировал от 2,8 до 6,6 аллелей на один локус (Suwabe et al., 2002; Phukan et al., 2020). Невысокий уровень выявленного полиморфизма – 4,4 аллеля на локус – был связан с небольшим разнообразием образцов (Soengas et al., 2011), равно как и с небольшим общим числом изученных образцов – 19 образцов и 6,6 аллеля на локус (Suwabe et al., 2002). С другой стороны, в работах на других видах *Brassica* было получено 10,3 аллеля на один локус при исследовании 582 образцов рапса с использованием 30 SSR-маркеров (Chen et al., 2017).

Основными показателями, позволяющими оценить степень полиморфизма маркера в популяции, являются индекс информационного полиморфизма (PIC) и значение ожидаемой гетерозиготности (H). Данные показатели были рассчитаны в программе iMEC, которая была успешно использована при изучении другой культуры рода *Brassica* – *B. oleracea* (Fateev, Artemyeva, 2020). Показатель PIC составил 0,278 и был меньше, чем в исследованиях других авторов – 0,319-0,588 (Li et al., 2021; K    k et al., 2024), что можно объяснить отсутствием в настоящей работе покрытия маркерами всех хромосом вида. Средний показатель ожидаемой гетерозиготности использованных в данном исследовании SSR-локусов (H) – 0,331 был схож с результатами исследований, полученных с использованием других SSR-маркеров.

Характерно, что молекулярные маркеры позволили идентифицировать уникальные аллели (BRMS-007 123 пн; BRMS-034 136 пн) для образцов корнеплодных и масличных культур – репы, сурепиц и сарсонов. Ранее проведённые исследования по установлению филогенетических отношений внутри японских реп показали их отличную от листовых форм генотипическую структуру (Kubo, 2019a). В данном исследовании найдены аллели, которые в случае маркера Na10D09 отсутствовали у большинства реп (75%), а в случае маркера BRMS-007 у всех реп, кроме представителей японской селекции.

В связи с тем, что большинство аллелей было идентифицировано у образцов листовых форм *B. rapa* селекции Японии и Китая, можно отметить, что образцы из Японии наиболее полно характеризовал аллель 122 пн локуса BRMS-042, а для образцов из Китая только аллели 200 и 122 пн локусов BRMS-008 и BRMS-042, соответственно.

Филогенетический анализ с использованием программы STRUCTURE разделил образцы на четыре больших кластера. Кластер I содержал 74% образцов пекинских капуст. Оставшиеся шесть из семи образцов данного подвида были отнесены ко II группе – образцам японских листовых овощей, капусты японской, пурпурной

и ноздреватой, которые составили отдельный кластер. Совместная кластеризация образцов данных подвидов может указывать на их сложную селекционную природу.

Репа, совместно с представителями сурепиц и сарсонов, выделились в отдельный кластер III, что соотносится с результатами предыдущих исследований, в которых также показано расхождение данных образцов и образцов листовых капуст вида *B. rapa* (Kubo, 2019a; b). Двухлетний способ выращивания также может характеризовать совместную кластеризацию образцов репы и озимой сурепицы.

Китайские капусты выделились в отдельный кластер IV. Привлечение большего разнообразия образцов и новых микросателлитных маркеров позволило достаточно чётко отделить китайские капусты от представителей пекинской капусты, что не удалось сделать в предыдущем исследовании, проведённом с использованием 45 образцов коллекции ВИР и девяти маркеров (Bergensen et al., 2016), в котором китайские и пекинские капусты были объединены в один кластер и разделены друг от друга только внутри кластера.

По своему происхождению 55% образцов из Японии сгруппировались в кластер II и в целом представляли 66% образцов данного кластера. Образцы из Китая в основном были распределены между тремя кластерами: I (35% образцов, входящих в кластер), II (24%) и IV (56%). Вклад образцов китайской селекции ожидаемо был наиболее значимым в кластер IV, включающий образцы китайской капусты.

Образцы селекции Дании, Испании, Индии, Казахстана, Канады, Киргизии, Нидерландов, Перу, России, Туниса, Украины и Южной Кореи в целом входили в кластер III, за исключением китайской капусты к-116 (Испания) – единственной из китайских капуст отнесённой к кластеру II и репы к-826, также вошедшей в кластер II. Привлечённые в исследование японские репы вошли в кластер II, а репа ‘Hinona’ к-2227 – в кластер I.

## Заключение.

Проведённый молекулярно-генетический анализ образцов коллекции ВИР позволил выявить уникальные аллели для образцов пекинской капусты к-63 и к-108, образцов японских листовых овощей к-335 и к-217, репы к-738, что делает проще их идентификацию в последующих молекулярно-генетических исследованиях и/или селекционных программах. Кластерный анализ в программе STRUCTURE позволил эффективно разделить образцы выборки на четыре кластера согласно ботанической классификации вида *B. rapa*. Однако в данном исследовании были выявлены образцы коллекции ВИР со сложными филогенетическими отношениями. В дальнейшем планируется вовлечь в анализ большее количество микросателлитных локусов для покрытия всех хромосом вида, что позволит точнее охарактеризовать степень генетического сходства образцов коллекции ВИР.

## References/Литература

- Amiryousefi A., Hyvönen J., Poczar P. iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 2018;6(6):e1159. DOI: 10.1002/aps3.1159
- Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. SSR analysis of modern Russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. [In Russian] (Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А., Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(4):77-96). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-o2
- Artemyeva A.M., Solov'eva A.E., Berensen F.A., Kocherina N.V., Chesnokov Yu.V. Ecological and genetic evaluation of morphological and biochemical characters of quality in *Brassica rapa* L. accessions from VIR collection. *Agricultural Biology*. 2017;52(1):129-142. [In Russian] (Артемяева А.М., Соловьева А.Е., Беренсен Ф.А., Кочерина Н.В., Чесноков Ю.В. Эколого-генетическая оценка морфологических и биохимических признаков качества у образцов коллекции *Brassica rapa* L. ВИР. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(1):129-142). DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.129rus
- Berensen F.A., Artemyeva A.M., Chesnokov Yu.V. Molecular-phylogenetic analysis of accessions from the VIR core collection of *B. rapa* L. (Molekulyarno-filogeneticheskiy analiz obraztsov sterzhnevoy kolektsii *B. rapa* L. VIR). *Pomiculture and small fruits culture in Russia*. 2016;47:46-49. [In Russian] (Беренсен Ф.А., Артемяева А.М., Чесноков Ю.В. Молекулярно-филогенетический анализ образцов стержневой коллекции *B. rapa* L. ВИР. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2016;47:46-49).
- Brassica.info, 2024. Reference annotated genomes. © University of Western Australia Centre for Applied Bioinformatics. Available from: <http://www.brassica.info/genome/genomes.html> [accessed Apr. 10, 2024]
- Celucia S., De La Pena R., Villa N. Genetic Characterization of *Brassica rapa chinensis* L., *B. rapa parachinensis* (L.H. Bailey) Hanelt, and *B. oleracea alboglabra* (L.H. Bailey) Hanelt Using SSR Markers. *The Philippine Journal of Science*. 2009;138(2):141-152.
- Chen R., Hara T., Ohsawa R., Yoshioka Y. Analysis of genetic diversity of rapeseed genetic resources in Japan and core collection construction. *Breeding Science*. 2017;67(3):239-247. DOI: 10.1270/jsbbs.16192
- Chen R., Shimono A., Aono M., Nakajima N., Ohsawa R., Yoshioka Y. Genetic diversity and population structure of feral rapeseed (*Brassica napus* L.) in Japan. *PLoS One*. 2020;16(15):e0227990. DOI: 10.1371/journal.pone.0227990
- Cui X., Dong Y., Hou X., Cheng Y., Zhang J., Jin M. Development and characterization of microsatellite markers in *Brassica rapa* ssp. *chinensis* and transferability among related species. *Agricultural Sciences in China*. 2008;7(1):19-31. DOI: 10.1016/S1671-2927(08)60018-8
- Dixon G., Wells R. Vegetable Brassicas and related crucifers. 2<sup>nd</sup> ed. Boston, MA: CAB International; 2024. (Series: Crop Production Science in Horticulture). DOI: 10.1079/9781789249170.0000
- Dorokhov D.B., Kloke E. Fast and economical technology for RAPD analysis of plant genomes. *Russian Journal of Genetics*. 1997;33:358-365. [In Russian] (Дорохов Д.В., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов. *Генетика*. 1997;33:358-365).
- Fateev D.A., Artemyeva A.M. Molecular genetic characteristics of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) from the VIR collection. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. 2020;181(3):91-99. [In Russian] (Фатеев Д.А., Артемяева А.М. Молекулярно-генетическая характеристика образцов брокколи (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) коллекции ВИР. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020;181(3):91-99). DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-91-99
- Online Marker Efficiency Calculator. Available from: <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/aps3.1159> [accessed Apr. 10, 2024]
- Gomez-Campo C., Prakash S. 2 Origin and domestication. *Developments in Plant Genetics and Breeding*. 1999;4:33-58. DOI: 10.1016/S0168-7972(99)80003-6
- Hatakeyama K., Horisaki A., Niikura S., Narusaka Y., Abe H., Yoshiaki H., Ishida M., Fukuoka H., Matsumoto S. Mapping of quantitative trait loci for high level of self-incompatibility in *Brassica rapa* L. *Genome*. 2010;53(4):257-265. DOI: 10.1139/G10-001
- Izzah N.K., Lee J., Jayakodi M., Perumal S., Jin M., Park B.S., Ahn K., Yang T.J. Transcriptome sequencing of two parental lines of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) and construction of an EST-based genetic map. *BMC Genomics*. 2014;15(1):149. DOI: 10.1186/1471-2164-15-149
- Kim S., Song Y., Lee J., Choi S., Dhandapani V., Jang C., Lim Y., Han T. Identification of the *BrRHP1* locus that confers resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) and development of linked molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;123(7):1183-1192. DOI: 10.1007/s00122-011-1658-9
- Kresovich S., Szewc-McFadden A., Bliks S., McFerson J. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;91:206-211. DOI: 10.1007/BF00220879
- Kubo N., Onnazaka K., Mizuno S., Tsuji G. Classification of "nabana" (*Brassica rapa*) cultivars and landraces based on simple sequence repeat markers. *Breeding Science*. 2019a;69(1):179-185. DOI: 10.1270/jsbbs.18126
- Kubo N., Ueoka H., Satoh S. Genetic relationships of heirloom turnip (*Brassica rapa*) cultivars in Shiga Prefecture and other regions of Japan: *The Horticulture Journal*. 2019b;88(4):471-480. DOI: 10.2503/hortj.UTD-071
- Küçük R., Sevindik E., Çayır M., Murathan Z. Genetic variation among *Brassica rapa* subsp. *rapa* genotypes growing in Malatya/Türkiye. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2024. DOI: 10.1007/s10722-024-01943-2
- Landry B., Hubert N., Crete R., Chiang M., Lincoln S., Etoh T. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmiodiophora brassicae* (Woronin). *Genome*. 1992;35(3):409-420. DOI: 10.1139/g92-061
- Li P., Su T., Zhao X., Wang W., Zhang D., Yu Y., Bayer P., Edward D., Yu S., Zhang F. Assembly of the non-heading pak choi genome and comparison with the genomes of heading Chinese cabbage and the oilseed yellow sarson. *Plant Biotechnology Journal*. 2021;19(5):966-976. DOI: 10.1111/pbi.13522
- Lowe A., Jones A., Raybould A., Trick M., Moule C., Edwards K. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2:7-11. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00126.x
- Lowe A., Moul C., Trick M., Edwards K. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108(11):1103-1112. DOI: 10.1007/s00122-003-1522-7
- Mekonnen T., Haileselassie T., Kaul T., Sharma M., Geleta B., Tesfaye K. Molecular screening of *Zymoseptoria tritici* resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) using tightly linked simple sequence repeat markers. *European Journal of Plant Pathology*. 2019;155:593-614. DOI: 10.1007/s10658-019-01795-y
- Pankin A., Khavkin E. Genome-specific SCAR markers help solve taxonomy issues: a case study with *Sinapis arvensis* (Brassicaceae, Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 2011;98(3):54-57. DOI: 10.3732/ajb.1000422
- Phukan A., Barua P.K., Sarma R.N., Borah N. Inter and intra population diversity analysis in toria (*Brassica rapa* L.) using SSR marker. *Indian journal of genetics and plant breeding*. 2020;80(01):107-111.
- Plieske J., Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics*.

- 2001;102:689-694. DOI: 10.1007/s001220051698
- Qi X., An H., Ragsdale A., Hall T., Gutenkunst R., Pires J., Barker M. Genomic inferences of domestication events are corroborated by written records in *Brassica rapa*. *Molecular Ecology*. 2017;26(13):3373-3388.
- Saini P., Sirari A., Gnanesh B., Mandahal K., Ludhar N., Nagpal S., Patel S., Akhtar J., Saini P., Pratap A., Bains T., Yadav S. Assessment of simple sequence repeat (SSR) markers derived from whole-genome sequence (WGS) of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek): cross-species transferability and population genetic studies in *Vigna* species. *Horticulturae*. 2024;10(1):34. DOI: 10.3390/horticulturae10010034
- Singh L., Nanjundan J., Sharma D., Singh K., Parmar N., Jain R., Kumar A. Agro-morphological traits and SSR markers reveal genetic variations in germplasm accessions of Indian mustard – an industrially important oilseed crop. *Heliyon*. 2022;8(12):e12519. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12519
- Singh S., Singh V., Ambawat S., Dubey M., Singh D. Screening and estimation of allelic differentiation in Indian mustard using SSR markers for background selection. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017;6(9):2506-2516. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.609.308
- Soengas P., Carrea M., Francisco M., Lema M., Velasco P. Genetic structure and diversity of a collection of *Brassica rapa* subsp. *rapa* L. revealed by simple sequence repeat markers. *The Journal of Agricultural Science*. 2011;149(5):617-624. DOI: 10.1017/S002185961100013X
- Suwabe K., Iketani H., Nunome T., Kage T., Hirai M. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;104(6-7):1092-1098. DOI: 10.1007/s00122-002-0875-7
- Suwabe K., Iketani H., Nunome T., Ohya A., Hirai M., Fukuoka H. Characteristics of Microsatellites in *Brassica rapa* Genome and their Potential Utilization for Comparative Genomics in Cruciferae. *Breeding Science*. 2004;54(2):85-90. DOI: 10.1270/jsbbs.54.85
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Kondo M., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., Matsumoto S. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The genetic origin of clubroot resistance. *Genetics*. 2006;173(1):309-319. DOI: 10.1534/genetics.104.038968.
- Thakur A., Singh K., Parmar N., Sharma D., Mishra D., Singh L., Nanjundan J., Yadav S. Population structure and genetic diversity as revealed by SSR markers in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun): a potential edible and industrially important oilseed crop. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2021;68:321-333. DOI: 10.1007/s10722
- Wang X., Wang H., Wang J., Sun R., Wu J., Liu S., Bai Y., Mun J.-H., Bancroft I., Cheng F., Huang S., Li X., Hua W., Wang J., Wang X., Freeling M., Pires J.C., Paterson A.H., Chalhou B., Wang B., Hayward A., Sharpe A.G., Park B.-S., Weissshaar B., Liu B., Li B., Liu B., Tong C., Song C., Duran C., Peng C., Geng C., Koh C., Lin C., Edwards D., Mu D., Shen D., Soumpourou E., Li F., Fraser F., Conant G., Lassalle G., King G.J., Bonnema G., Tang H., Wang H., Belcram H., Zhou H., Hirakawa H., Abe H., Guo H., Wang H., Jin H., Parkin I.A.P., Batley J., Kim J.-S., Just J., Li J., Xu J., Deng J., Kim J.A., Li J., Yu J., Meng J., Wang J., Min J., Poulain J., Wang J., Hatakeyama K., Wu K., Wang L., Fang L., Trick M., Links M.G., Zhao M., Jin M., Ramchiary N., Drou N., Berkman P.J., Cai Q., Huang Q., Ruiqiang Li R., Tabata S., Cheng S., Zhang S., Zhang S., Huang S., Sato S., Sun S., Kwon S.-J., Choi S.-R., Lee T.-H., Fan W., Zhao X., Tan X., Xu X., Wang Y., Qiu Y., Yin Y., Li Y., Du Y., Liao Y., Lim Y., Narusaka Y., Wang Y., Wang Z., Li Z., Wang Z., Xiong Z., Zhang Z. The *Brassica rapa* Genome Sequencing Project Consortium. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*. 2011;43:1035-1039. DOI: 10.1038/ng.919
- VegMarks – a DNA marker database for vegetables © 2006-2020 Institute of Vegetable and Floriculture Science, NARO. Available from: <https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/> [accessed Apr. 10, 2024]

### Информация об авторах

**Федор Алексеевич Беренсен**, заведующий, лаборатория комплексной оценки генетических ресурсов растений, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, <https://orcid.org/0000-0002-0492-2024>

### Information about the authors

**Fedor A. Berensen**, Head, Laboratory of Complex Evaluation of Plant Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, [f.berensen@vir.nw.ru](mailto:f.berensen@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0492-2024>

**Вклад автора:** автор сделал самостоятельный вклад в подготовку публикации.

**Contribution of the author:** the author contributed solely to this article.

**Конфликт интересов:** автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests:** the author declares no conflict of interests.

Статья поступила в редакцию 20.04.2024; одобрена после рецензирования 20.05.2024; принята к публикации 20.06.2024.

The article was submitted on 20.04.2024; approved after reviewing on 20.05.2024; accepted for publication on 20.06.2024.