


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Изучение генетического полиморфизма российских сортов рапса и сурепицы с использованием SSR- и SRAP-маркеров

И.А. Клименко , В.Т. Воловик, А.А. Антонов, В.А. Душкин, А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов

Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, г. Лобня, Московская область, Россия  
 [iaklimenko@mail.ru](mailto:iaklimenko@mail.ru)

**Аннотация.** Рапс (*Brassica napus* L.) и сурепица (*B. rapa* L. subsp. *campestris* (L.)) – важные сельскохозяйственные культуры, широко используются для продовольственных, кормовых и технических целей, а также в качестве сидератов. За последние десятилетия создано большое количество перспективных сортов, культивируемых практически во всех регионах России. Для повышения эффективности селекционного процесса и успешного развития семеноводства необходимо внедрять современные молекулярно-генетические методы оценки видового и сортового разнообразия. Цель настоящей работы заключалась в изучении ДНК-полиморфизма сортов рапса и сурепицы селекции Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса и выявлении информативных маркеров для сортовой идентификации и генетической паспортизации. Для генотипирования 18 образцов геномной ДНК использовали 42 и 25 комбинаций SSR- и SRAP-праймеров соответственно. Результаты показали, что маркеры SRAP более эффективны для анализа полиморфизма изучаемого материала: 36 % от общего числа испытанных маркеров демонстрировали генетический полиморфизм, тогда как для микросателлитных локусов этот показатель равнялся 16.7 %. Определены молекулярные маркеры для выявления различий на межвидовом и межсортовом уровнях. Информативными для исследуемой выборки сортов оказались микросателлитные локусы Na12A02, Ni2C12, Ni02-D08a, Ra02-E01, Ni03H07a и комбинации SRAP-маркеров F13-R9, Me4-R7, F11-Em2, F10-R7, F9-Em2 и F9-R8. Анализ сортового материала по двум системам маркирования показал более высокий уровень ДНК-полиморфизма у образцов растений разного типа развития (яровой/озимый) в сравнении с различиями между сортами в пределах вида или группы. Согласно индексам генетического разнообразия Нея, в кластере сортов озимого рапса наибольшей генетической удаленностью выделялись ВИК 2 и Горизонт, среди яровых – Новосёл и Велес. Высокий уровень сходства обнаружен между яровыми сортами рапса Викрос и Бизон. Полученная информация имеет практическое значение для контроля сортовой принадлежности и генетической паспортизации семенного материала сортов рапса и сурепицы. **Ключевые слова:** кормовые культуры; *Brassica napus* L.; *B. rapa* L. *campestris*; «балк-образцы», генетический полиморфизм; SSR-маркеры; SRAP-маркеры.

**Для цитирования:** Клименко И.А., Воловик В.Т., Антонов А.А., Душкин В.А., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Изучение генетического полиморфизма российских сортов рапса и сурепицы с использованием SSR- и SRAP-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):349-358. DOI 10.18699/VJGB-22-42

## Investigation of genetic polymorphism of Russian rape and turnip rape varieties using SSR and SRAP markers

I.A. Klimenko , V.T. Volovik, A.A. Antonov, V.A. Dushkin, A.O. Shamustakimova, Yu.M. Mavlyutov

Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Lobnya, Moscow region, Russia  
 [iaklimenko@mail.ru](mailto:iaklimenko@mail.ru)

**Abstract.** Rapeseed (*Brassica napus* L.) and turnip rape (*B. rapa* L. subsp. *campestris* (L.)) are important agricultural plants widely used for food, fodder and technical purposes and as green manure. Over the past decades, a large number of perspective varieties that are being currently cultivated in every region of Russia have been developed. To increase the breeding efficiency and facilitate the seed production, modern molecular-genetic techniques should be introduced as means to estimate species and varietal diversity. The objective of the presented research study was to investigate DNA polymorphism of the rapeseed and turnip rape varieties developed at Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology and detect informative markers for varietal identification and genetic certification. To genotype 18 gDNA samples, 42 and 25 combinations of respective SSR and SRAP primers were used. The results obtained demonstrate that SRAP markers were more effective for polymorphism analysis: 36 % of the tested markers revealed genetic polymorphism compared with only 16.7 % of microsatellite loci. Molecular markers to detect differences at interspecific and intervarietal levels have also been found. For the investigated set, such microsatellite loci as Na12A02, Ni2C12, Ni02-D08a, Ra02-E01, Ni03H07a and SRAP-marker combinations as F13-R9, Me4-R7, F11-Em2, F10-R7, F9-Em2 and F9-R8 proved to be informative. Application of the two marker techniques made it possible to detect a higher level of DNA polymorphism in plants of different types (spring and winter varieties) if compared against

the intervarietal differences within a species or a group. According to Nei's genetic diversity index, in the cluster of winter rapeseed, VIK 2 and Horizont varieties had the longest genetic distance, and in the spring cluster, these were Novosel and Veles. A high level of similarity was found between Vikros and Bizon winter rapeseed varieties. The results obtained have a high practical value for varietal specification of seed material and genetic certification of rapeseed and turnip rape varieties.

Key words: forage crops; *Brassica napus* L.; *B. rapa* L. *campestris*; bulk samples; genetic polymorphism; SSR markers; SRAP markers.

**For citation:** Klimenko I.A., Volovik V.T., Antonov A.A., Dushkin V.A., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Investigation of genetic polymorphism of Russian rape and turnip rape varieties using SSR and SRAP markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):349-358. DOI 10.18699/VJGB-22-42

## Введение

Капустные масличные культуры, и прежде всего рапс (*Brassica napus* L.) и сурепица (*B. rapa* L.), возделываются практически во всех регионах России и в ближайшей перспективе являются основным резервом увеличения производства растительного масла и кормового белка. Используются для продовольственных, кормовых и технических целей, а также в качестве сидератов, повышают плодородие почв за счет поступления корневых остатков, содержащих до 6 т/га органического вещества, 80 кг азота, 60 кг фосфора и 90 кг калия. По пищевым и кормовым достоинствам рапс и сурепица превосходят многие сельскохозяйственные культуры, так как в биохимическом составе семян обнаружено 40–48 % жира и 21–33 % белка с высоким содержанием незаменимых аминокислот (Воловик, 2015). Посевы рапса могут обеспечить животных зелеными кормами с ранней весны до поздней осени благодаря высокой холодостойкости и хорошему отращиванию после скашивания; служат сырьем для приготовления силоса, а из семян и отходов их переработки получают жмых и шрот. За последние годы с появлением сортов рапса и сурепицы, не содержащих эруковую кислоту или с низким содержанием, производство семян этих культур увеличилось более чем в 7 раз и по объемам занимает третье место в мире после сои и хлопчатника. В России планируется в кратчайшие сроки увеличение площади посевов рапса до 2.5 млн га.

Ведущими отечественными научными учреждениями, где проводится интенсивная работа по селекции масличных культур семейства Крестоцветные, являются ВНИИ рапса, ВНИИ масличных культур и ВНИИ кормов. Селекционерами созданы перспективные сорта рапса, сурепицы, горчицы белой и редьки масличной, рекомендованные для получения маслосемян, использования в рационах животных и птицы в качестве зеленого корма, в составе комбикормов, жмыха и шротов. По состоянию на 2021 г. в «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию», зарегистрировано 13 сортов рапса и 3 сорта сурепицы – разработки Федерального центра кормопроизводства и агроэкологии (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») (Косолапов и др., 2019; Государственный реестр..., 2021).

Для сохранения и рационального использования имеющихся и создаваемых ресурсов, повышения интенсивности селекционного процесса и защиты авторских прав необходимы современные и эффективные методы оценки видового и сортового разнообразия на генетическом уровне. С этой целью в последние годы успешно применяются

молекулярные ДНК-маркеры. В сравнении с традиционными морфологическими признаками они имеют ряд преимуществ: высокий уровень полиморфизма, равномерное распределение по геному, надежность, возможность автоматизации процесса анализа, результаты которого не зависят от условий окружающей среды и фазы развития растения (Agarwal et al., 2008; Хлесткина, 2011; Чесноков, 2018). При условии выбора наиболее информативных и удобных ДНК-маркеров их возможности для оценки генетического разнообразия селекционного материала неограниченны.

В лаборатории молекулярно-генетических исследований ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» разрабатывается система ДНК-идентификации и генетической паспортизации сортов кормовых культур отечественной селекции. В настоящее время методы определения сортовой принадлежности адаптированы для многолетних бобовых трав – клевера лугового и разных видов люцерны (Клименко и др., 2020а, б). Анализ проводят с использованием образцов суммарной ДНК, выделенной модифицированным способом из случайной выборки проростков каждого сорта, и молекулярных маркеров двух типов: SSR (simple sequence repeats), выявляющих вариативность микросателлитных последовательностей генома, и SRAP (sequence related amplified polymorphism), основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с парой праймеров для амплификации интрон-экзонных участков генов или открытых рамок считывания. Эти методы прошли апробацию на разных видах кормовых культур, оптимизацию условий амплификации, детекции и анализа полученных результатов.

Проблема надежной сортовой идентификации представляется особенно актуальной для селекционного материала рапса вследствие ограниченной генетической изменчивости, обусловленной интенсивной селекцией на признаки, определяющие качество семян и получаемого из них масла. Известно множество исследовательских работ по использованию разных типов ДНК-маркеров в изучении рапса: это оценка генетического разнообразия сортов и гибридов (Plieske, Struss, 2001; Snowdon, Friedt, 2004; Klyachenko et al., 2018; Мозгова и др., 2019), создание генетических карт (Piquemal et al., 2005; Gao et al., 2007; Geng et al., 2012) и маркирование генов хозяйственно ценных признаков (Chen et al., 2010; Ananga et al., 2012). Однако информации о таких исследованиях на сортах российского происхождения в доступных литературных источниках мало. Так, четыре сорта рапса озимого и ярового типа (Подмосковный, Викрос, ВИК 2 и Северянин) были объектом изучения белорусских исследователей при

идентификации аллелей генов, контролирующих уровень содержания олеиновой и линолевой кислот в масле семян (Лемеш и др., 2015). Эти же сорта использовали при выявлении ДНК-маркеров генов, контролирующих синтез эруковой кислоты (Amosova et al., 2014). С помощью микросателлитных маркеров изучали генетический полиморфизм российских сортов Ратник и СНК-198 (Сатина, 2010), а также степень генетической однородности яровых сортов рапса Булат и Форвард (Рогожина и др., 2015). У сортов озимого типа Столичный, Лауреат, Горизонт, Норд, Северянин проведен поиск QTLs (quantitative trait loci) – локусов количественных признаков, ассоциированных с повышенной зимостойкостью (Мозгова и др., 2019).

Цель исследований заключалась в изучении полиморфизма ДНК сортов рапса и сурепицы, разработанных селекционерами ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», и выявлении информативных маркеров для сортовой дифференциации и последующей генетической паспортизации.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Объектом исследований служили 15 сортов рапса озимого (Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат, Горизонт, Гарант) и ярового (Викрос, Новик, Новосёл, Велес, Грант, Подмосковный, Луговской, Бизон), а также 3 сорта сурепицы (Заря (озимый тип), Надежда и Светлана (яровой тип)).

**Экстракция ДНК и ПЦР-анализ.** Геномную ДНК выделяли из 30 проростков растений от каждого сорта («балк-образцы»). Применяли базовый SDS-метод (Kirby, Cook, 1967; Dellaporta et al., 1983) с внесением некоторых модификаций (Клименко и др., 2020а). Качество и концентрацию полученных фракций ДНК проверяли путем электрофореза в 1.5 % агарозном геле и на спектрофотометре Nabi (MicroDigital, Корея).

Для SSR-анализа использовали 42 маркера, информация о которых получена из международной базы данных Brassica.info (<https://www.brassica.info>) и литературных источников. Эффективность праймеров, разработанных к этим маркерам, показана в исследованиях по созданию технологии генотипирования рапса (Сатина, 2010) и отбору образцов с низким содержанием эруковой кислоты и глюкозинолатов (Hasan et al., 2008). Часть маркеров, включенных в анализ, использовали для контроля гибридизации и выявления устойчивых к альтернариозу генотипов индийской горчицы (*B. juncea* L.) (Chandra et al., 2013; Sharma et al., 2018).

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 3 мкл 10× ПЦР-буфера (Taq Turbo Buffer), 0.5 мкл 50x dNTPs mix, 0.4 мкл Taq-полимеразы (5U), по 0.1 мкл прямого и обратного праймера (100 мкМ) и 1 мкл образца ДНК (20 нг/мкл). Амплификацию осуществляли на приборе Bio-Rad T-1000 (США) при двух разных температурных режимах. Одна программа предусматривала начальную денатурацию в течение 3 мин при 95 °С; затем 30 циклов по 30 с при 94 °С, 30 с при 55–57 °С, 30 с при 72 °С и финальную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин (Сатина, 2010). Второй режим амплификации включал начальную денатурацию – 5 мин при 95 °С; следующие 39 циклов – 1 мин при 94 °С, 2 мин при 46–51 °С в зависимости от пары праймеров, 2 мин при 72 °С и финальную элонгацию при 72 °С в течение 10 мин

(Chandra et al., 2013). Воспроизводимость результатов анализа проверяли постановкой реакций в трехкратной повторности.

SRAP-анализ провели с использованием 25 комбинаций праймеров, составленных на основе 10 одиночных олигонуклеотидов: F9, F13, Me4, F10, F11, R9, R7, Em2, R14, R8 (Li, Quiros, 2001; Rhouma et al., 2017). Программа амплификации включала: начальную денатурацию – 4 мин при 94 °С, затем 10 циклов с чередованием температурных и временных параметров (1 мин при 94 °С, 1 мин при 35 °С, 1 мин при 72 °С); следующие 30 циклов (1 мин при 94 °С, 1 мин при 50 °С, 1 мин при 72 °С) и финальную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин. Состав компонентов смеси для ПЦР был аналогичным используемому при микросателлитном анализе.

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле в течение 90 мин при 50 В (4 % MetaPhorR Agarose, Rockland, или 1.6 % LE, Lonza, США). В качестве маркеров-стандартов применяли 20 bp DNA Ruler Bio-Rad, 100 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) и 100 bp + 1.5 kb («СибЭнзим», Россия).

**Анализ результатов.** Детекцию ПЦР-продуктов и определение их размера осуществляли на приборе GelDoc™ XR+ (Bio-Rad) с помощью пакета программ ImageLab (Bio-Rad Lab., Inc.) относительно маркеров молекулярной массы. На основании полученных результатов составляли бинарную матрицу и с применением программы PopGene v. 1.32 (Yeh et al., 2000) определяли показатели генетического разнообразия: эффективное число аллелей на локус, индекс Шеннона, ожидаемую гетерозиготность, генетические дистанции по Нею (Nei, Li, 1979). Для каждой пары праймеров рассчитывали индекс информативности, PIC (polymorphism information content), согласно формуле, представленной в статье (Chesnokov, Artemyeva, 2015). Для построения дендрограммы генетического сходства методом попарно-невзвешенных группировок с усреднением (UPGMA) использовали программу NTSYSpc v 2.10 (Rohlf, 2000).

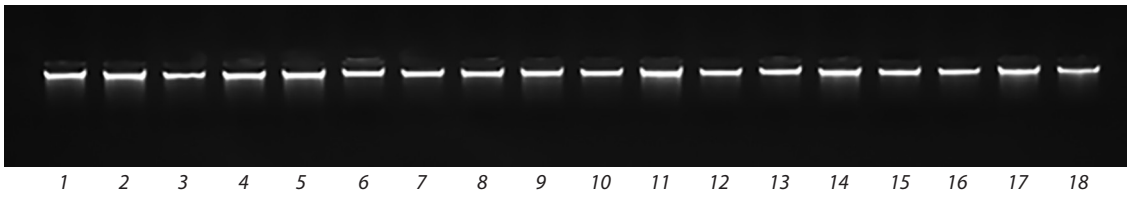
## Результаты

Для выделения геномной ДНК из проростков рапса и сурепицы применяли SDS-метод с модификациями. Протокол оказался более эффективным и малозатратным в сравнении с другими известными протоколами и коммерческими наборами реактивов. Результаты электрофореза и спектрофотометрии показали достаточно высокую концентрацию ДНК и степень очистки от примесей белковых соединений и полисахаридов у всех экспериментальных образцов (рис. 1, 2).

## SSR-анализ

Для генотипирования полной коллекции сортов было выбрано 7 из 42 SSR-праймеров, обеспечивающих стабильную и воспроизводимую амплификацию (табл. 1).

Анализ фрагментов амплификации, полученных с этими праймерами, выявил 42 аллеля. В среднем число аллелей на локус составляло 6 и варьировало от 3 (маркеры Ni2C12 и Vna.M.010) до 10 (Ra02-E01a). Размер фрагментов амплификации находился в диапазоне от 110 п. н. – с использованием маркера Ni2C12 до 1200 п. н. – с мар-



**Рис. 1.** Электрофореграмма геномной ДНК, выделенной из проростков растений рапса и сурепицы.

Дорожки: 1–15 – сорта рапса: Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат, Горизонт, Гарант, Викрос, Новик, Новосёл, Велес, Грант, Подмосковский, Луговской, Бизон; 16–18 – сорта сурепицы: Заря, Надежда, Светлана.



**Рис. 2.** Концентрация геномной ДНК (ОР, ОС – сорта рапса и сурепицы озимого типа, ЯР – сорта рапса ярового типа).

**Таблица 1.** SSR-праймеры, использованные для анализа полиморфизма ДНК сортов рапса и сурепицы

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Размер ПЦР-фрагментов, согласно литературным данным, п. н.	Литературный источник
Ni-F02a	TGCAACGAAAAAGGATCAGC/ TGCTAATTGAGCAATAGTGATTCC	250	Chandra et al., 2013
Ni03H07a	GCTGTGATTTTAGTGACCG/ AGCCGTTGATGGAATTTTGTG	250–280	
Ni02-D08a	ACAACAACCCATGTCTTCCG/ ACAACAACCCATGTCTTCCG	< 100–300	
Ra02-E01a	GCACACACACTCAAACCC/ TCTATATTAACGCGGACGG	< 100- > 1000	
Ni2C12 (Bna.M.002)	AAAGGTCAAGTCTTCTTCCG/ ACATTCTGGATCTTGATTCC	112–150	Сатина, 2010
Na12A02 (Bna.M.001)	AGTGAATCGATGATCTCGCC/ AGCCTTGTGCTTTTCAACG	160–218	
Bna.M.010	CATTGTTGTCTTGGGAGAGC/ AGGACACCAGGCACCATATA	100–150	

кером Ni02-D08a. Максимальная частота встречаемости аллелей показана для Bna.M.010 (0.83), минимальная – для Ni03H07a (0.27); среднее значение показателя было 0.42. Праймеры, разработанные к маркерам Ni03H07a, Ni02-D08a и Ra02-E01a, позволяли обнаружить 8–10 аллелей на локус и отличались наиболее высоким индексом информативности – 0.82.

#### SRAP-анализ

По результатам предварительного тестирования из 25 комбинаций SRAP-праймеров было выбрано 10 пар, амплифицирующих полиморфные ДНК-фрагменты с воспроизводимостью в повторных экспериментах (табл. 2). Получено 53 фрагмента ПЦР размером от 132 до 1674 п. н. На одну комбинацию приходилось от 4 (F9-R9) до 7 (F10-R8,

F11-Em2, F10-R7) ампликонов. Часть маркеров оказалась информативной для выявления фрагментов амплификации, характерных для типа развития (озимый/яровой). С помощью шести комбинаций удалось получить специфичные ампликоны для сортовой идентификации (в табл. 2 помечены звездочкой).

Электрофореграмма результатов ПЦР с комбинацией праймеров F9-R8 представлена на рис. 3. Существенные различия по ДНК-профилю обнаружены между озимыми (I) и яровыми сортами рапса (II) (объединены фигурными скобками). Стрелками обозначены сортоспецифичные ПЦР-продукты для озимого рапса Столичный (508 п. н.) и яровой сурепицы Надежда (700 п. н.), а также отсутствие у сорта Подмосковный ампликона размером 460 п. н., характерного для других образцов рапса из группы яровых.

Анализ показал, что по трем маркерным комбинациям (F11-Em2, F10-R7 и Me4-R7) в общей коллекции выделялись сорта рапса Грант и Новосёл, по двум (F13-R9 и Me4-R7) – Горизонт и Луговской. Сорт ВИК 2 можно идентифицировать с помощью маркеров в сочетании F9-Em2, а яровой рапс Велес – F10-R7. Специфичные ДНК-спектры получены для сортов рапса Столичный, Подмосковный и сурепицы Надежда с применением комбинации F9-R8.

Данные генотипирования были преобразованы в форму бинарной матрицы и послужили основанием для расчета индексов генетических расстояний по Нею (табл. 3). Наибольший коэффициент генетического сходства обнаружен между сортами рапса ярового типа Викрос и Бизон (1.0), а также Велес и Бизон (0.9655). Наименьшим значением этого показателя (0.7069) характеризовались сорта Горизонт, Новосёл и Грант. Одинаково высокий индекс генетических дистанций (0.3228) свидетельствовал о существенных различиях между двумя парами сортов – Грант и ВИК 2, Луговской и Столичный. Низкий коэффициент, а, следовательно, высокое генетическое сходство обнаружено между яровыми сортами Бизон и Викрос (нулевая

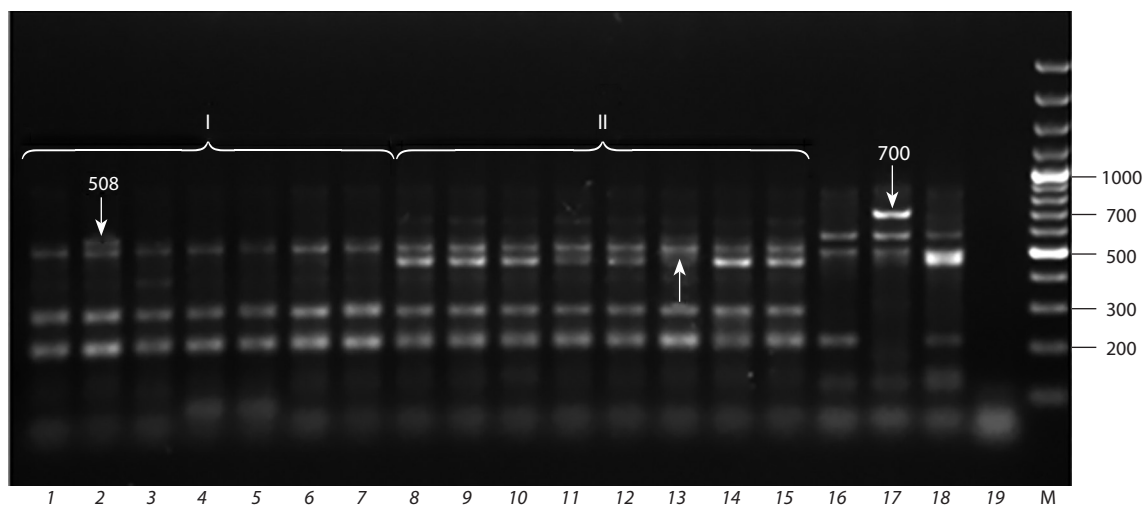
**Таблица 2.** Характеристика SRAP-праймеров для анализа ДНК-полиморфизма сортов рапса и сурепицы

Комбинация праймеров	Последовательность нуклеотидов	Размер ПЦР-продукта, п. н.
F13-R7	CGAATCTTAGCCGGCAC/ GACTGCGTACGAATTGAG	266–624
F10-R8	GTAGCACAAGCCGGAAG/ GACACCGTACGAATTGAC	248–1140
*F13-R9	CGAATCTTAGCCGGCAC/ GACTGCGTACGAATTTCA	353–1674
F9-R9	GTAGCACAAGCCGGACC/ GACTGCGTACGAATTTCA	145–849
*Me4-R7	CGAATCTTAGCCGGAAT/ GACTGCGTACGAATTGAG	300–806
*F11-Em2	CGAATCTTAGCCGGATA/ GACTGCGTACGAATTCGG	175–712
*F10-R7	GTAGCACAAGCCGGAAG/ GACTGCGTACGAATTGAG	132–628
*F9-Em2	GTAGCACAAGCCGGACC/ GACTGCGTACGAATTCGG	209–1025
F13-R8	CGAATCTTAGCCGGCAC/ GACACCGTACGAATTGAC	107–688
*F9-R8	GTAGCACAAGCCGGACC/ GACACCGTACGAATTGAC	205–700

Примечание. Для синтеза праймеров использована информация о последовательности нуклеотидов из (Li, Quiros, 2001).

дистанция) и образцами озимого типа Гарант, Северянин, Столичный, Норд, Лауреат (0.0174).

По результатам ПЦР-анализа с применением двух типов маркеров (SSR и SRAP) были определены показатели генетической изменчивости и построена итоговая дендрограмма филогенетических взаимосвязей мето-



**Рис. 3.** Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации сортов рапса и сурепицы с комбинацией SRAP-праймеров F9-R8.

Сорта рапса: озимого типа Северянин (1), Столичный (2), ВИК 2 (3), Норд (4), Лауреат (5), Горизонт (6), Грант (7); ярового типа Викрос (8), Новик (9), Новосёл (10), Велес (11), Грант (12), Подмосковный (13), Луговской (14), Бизон (15). Сорта сурепицы: озимого типа Заря (16); ярового типа Надежда (17), Светлана (18). 19 – контроль (H<sub>2</sub>O); М – маркер молекулярной массы (100 kb DNA Ladder).

**Таблица 3.** Индексы генетического сходства (над диагональю) и дистанции Нея (под диагональю), рассчитанные на основе результатов SRAP-анализа

№ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	****	0.9655	0.8966	0.9655	0.9655	0.9138	0.9828	0.8103	0.7931	0.7586	0.8448	0.7586	0.7931	0.7586	0.8103
2	0.0351	****	0.8966	0.9655	0.9655	0.9138	0.9828	0.7759	0.7586	0.7241	0.8103	0.7241	0.7586	0.7241	0.7759
3	0.1092	0.1092	****	0.931	0.8966	0.9138	0.9138	0.7414	0.7586	0.7586	0.7759	0.7241	0.7586	0.7586	0.7414
4	0.0351	0.0351	0.0715	****	0.9655	0.9483	0.9828	0.8103	0.7931	0.7586	0.8448	0.7586	0.7931	0.7586	0.8103
5	0.0351	0.0351	0.1092	0.0351	****	0.9138	0.9828	0.8103	0.7931	0.7586	0.8448	0.7586	0.7931	0.7586	0.8103
6	0.0902	0.0902	0.0902	0.0531	0.0902	****	0.931	0.7586	0.7414	0.7069	0.7931	0.7069	0.7759	0.7414	0.7586
7	0.0174	0.0174	0.0902	0.0174	0.0174	0.0715	****	0.7931	0.7759	0.7414	0.8276	0.7414	0.7759	0.7414	0.7931
8	0.2103	0.2538	0.2992	0.2103	0.2103	0.2763	0.2318	****	0.9483	0.9138	0.9655	0.9138	0.9483	0.8793	1
9	0.2318	0.2763	0.2763	0.2318	0.2318	0.2992	0.2538	0.0531	****	0.8966	0.9483	0.8966	0.9655	0.8621	0.9483
10	0.2763	0.3228	0.2763	0.2763	0.2763	0.3469	0.2992	0.0902	0.1092	****	0.9138	0.8966	0.8966	0.8621	0.9138
11	0.1686	0.2103	0.2538	0.1686	0.1686	0.2318	0.1892	0.0351	0.0531	0.0902	****	0.9138	0.9483	0.8793	0.9655
12	0.2763	0.3228	0.3228	0.2763	0.2763	0.3469	0.2992	0.0902	0.1092	0.1092	0.0902	****	0.8966	0.931	0.9138
13	0.2318	0.2763	0.2763	0.2318	0.2318	0.2538	0.2538	0.0531	0.0351	0.1092	0.0531	0.1092	****	0.8966	0.9483
14	0.2763	0.3228	0.2763	0.2763	0.2763	0.2992	0.2992	0.1286	0.1484	0.1484	0.1286	0.0715	0.1092	****	0.8793
15	0.2103	0.2538	0.2992	0.2103	0.2103	0.2763	0.2318	0	0.0531	0.0902	0.0351	0.0902	0.0531	0.1286	****

Примечание. № 1–15 – сорта рапса Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат, Горизонт, Гарант, Викрос, Новик, Новосёл, Велес, Грант, Подмосковский, Луговской, Бизон.

**Таблица 4.** Показатели генетической изменчивости сортов рапса по результатам анализа с использованием SRAP- и SSR-маркеров

Маркер	Размер ПЦП-продукта, п. н.	Общее количество ПЦП-продуктов	Эффективное число аллелей (ne)	Гетерозиготность (He)	Индекс Шеннона (I)
<b>SRAP-маркеры</b>					
<sup>1</sup> F13-R7	266–624	6	1.20	0.12	0.18
<sup>1</sup> F10-R8	248–1140	7	1.33	0.18	0.25
<sup>1</sup> F13-R9	353–1674	6	1.18	0.12	0.20
<sup>1</sup> F9-R9	145–849	4	1.25	0.12	0.17
<sup>1</sup> Me4-R7	300–806	6	1.02	0.02	0.04
<sup>1</sup> F11-Em2	175–712	7	1.23	0.14	0.22
<sup>1</sup> F10-R7	132–628	7	1.51	0.27	0.38
<sup>1</sup> F9-Em2	209–1025	10	1.27	0.17	0.28
<sup>1</sup> F13-R8	107–688	5	1.20	0.10	0.14
Среднее	–	6.44	1.24	0.14	0.21
<b>SSR-маркеры</b>					
<sup>2</sup> Na12A02	159–209	5	1.54	0.32	0.49
<sup>2</sup> Ni2C12	110–140	3	1.67	0.13	0.22
<sup>2</sup> Bna.M.010	145–173	3	1.25	0.19	0.34
<sup>3</sup> Ni03H07a	132–1000	8	1.88	0.47	0.66
<sup>3</sup> NiF02a	175–736	5	1.20	0.15	0.27
<sup>3</sup> Ni02-D08a	135–1200	8	1.41	0.23	0.35
<sup>3</sup> Ra02E01a	191–928	10	1.37	0.23	0.36
Среднее	–	6.00	1.47	0.25	0.38

Примечание. По данным <sup>1</sup> (Rhouma et al., 2017); <sup>2</sup> (Сатина, 2010); <sup>3</sup> (Chandra et al., 2013).

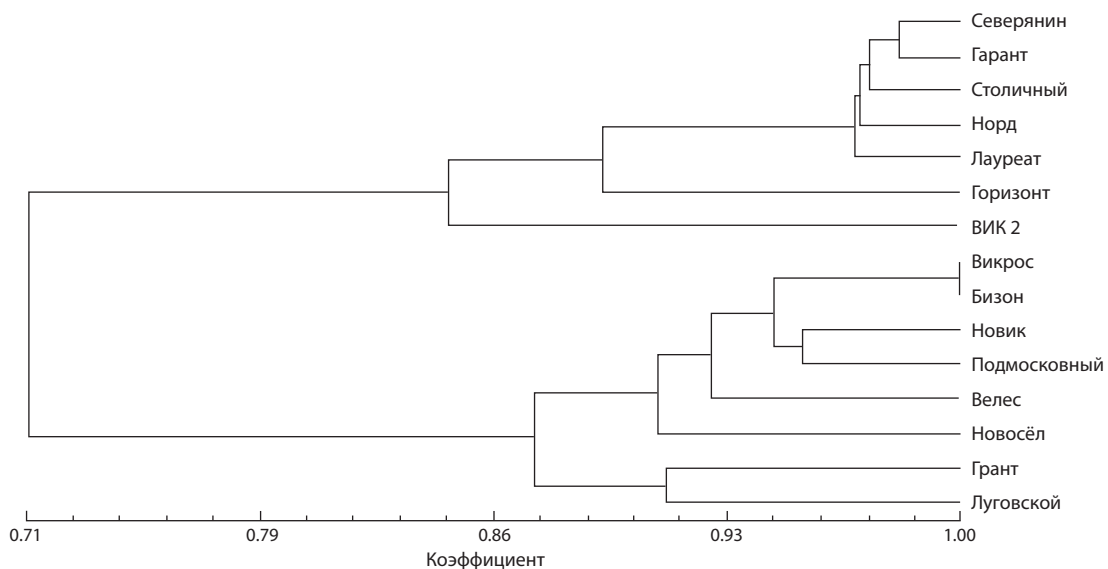


Рис. 4. Дендрограмма генетического сходства сортов рапса селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильяма».

дом UPGMA. Для изучаемого сортового материала показана невысокая степень генетической гетерогенности. Причем большие значения таких показателей, как ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ ) и число эффективных аллелей ( $n_e$ ), выявлены при использовании SSR-маркеров, в среднем 0.25 против 0.14 и 1.47 на локус в сравнении с 1.24 соответственно. Однако SRAP-метод позволил получить больше ПЦР-продуктов, в том числе пригодных для сортовой дифференциации (табл. 4).

Из анализа общей UPGM-дендрограммы следует, что сорта рапса ярового и озимого типа разделились на два четко различимых кластера (рис. 4). В первой группе объединились озимые сорта Северянин, Гарант, Столичный, Норд, Лауреат, Горизонт, ВИК 2. Сорта ярового типа оказались во втором кластере. В группе озимого рапса выделялись ВИК 2 и Горизонт, находящиеся на значительных генетических дистанциях от других образцов. Напротив, близко расположились на ветвях генеалогического дерева сорта Столичный, Норд и Лауреат, а также Гарант и Северянин, что подтверждается высокими значениями индексов генетического сходства между ними, 0.9655 и 0.9828 соответственно (см. табл. 3). В кластере яровых наиболее удаленными на дендрограмме оказались двунулевые сорта Новосёл, Грант и Луговской. Для них определены максимальные показатели генетических дистанций в своей группе (0.3469 и 0.3228). Бизон и Викрос разместились в одной подгруппе на общей ветви дендрограммы.

### Обсуждение

«Балк-стратегия» формирования суммарной навески из 30 проростков растений на сорт позволила нам значительно сократить усилия и затраты на проведение исследования в сравнении с традиционным способом анализа индивидуальных генотипов. Эффективность метода показана для разных культур, особенно при масштабных исследованиях больших популяций (Liu et al., 2018). Однако такой подход является оправданным лишь при условии использования репрезентативной выборки для

анализа. Для перекрестноопыляющихся видов с высоким уровнем внутривидовой изменчивости общий образец должен включать не менее 30–50 растений от сорта. В этом случае существенно выше вероятность учета редких аллелей, встречающихся в популяции с частотой ниже 10 % (Crossa, 1989; Semerikov et al., 2002). Растения рапса озимого типа обладают высокой способностью к самоопылению – до 70 % цветков (Шпаар, 2012), многие сорта относятся к линейным, тогда как у ярового рапса, по данным некоторых исследователей (Осипова, 1998), доля перекрестного опыления доходит до 40 %. Сурепица – перекрестноопыляемая культура. В связи с этим в наших исследованиях по оценке генетического полиморфизма использовали достаточно большую выборку – 30 проростков на «балк-образец».

Значительная часть SSR-праймеров, испытанных в нашей работе, генерировала мономорфные фрагменты амплификации, не позволяющие оценить уровень генетического разнообразия материала, или характеризовалась низкой воспроизводимостью результата в повторных экспериментах. Доля маркеров, эффективных для выявления межсортового полиморфизма ДНК, составила 16.7 %, что существенно ниже, чем определялось для SSR-локусов в работах других исследователей (Plieske, Struss, 2001; Hasan et al., 2008; Tian et al., 2017). Вероятно, это обусловлено составом анализируемой коллекции, имеющей узкую генетическую основу с учетом происхождения сортов. При этом величина ряда показателей генетической изменчивости (количество обнаруженных аллельных вариантов, частота встречаемости отдельных аллелей, PIC и  $H_e$ ) оказалась сопоставимой с результатами, известными из доступных источников литературы (Сатина, 2010; Клуаченко et al., 2018).

В основном используемые маркеры показывали полиморфизм ДНК между рапсом и сурепицей, а также между образцами озимого и ярового типа внутри каждого вида. Однако маркер Na12A02 оказался сортоспецифичным для ярового рапса Бизон и озимой сурепицы

Заря, а Ra02-E01a – для озимого рапса ВИК 2 и яровой сурепицы Светлана. Уникальными аллелями по микросателлитному локусу Ni02-D08a выделялись сорта рапса Подмосковский и Луговской. Указанные маркеры могут служить для сортовой ДНК-идентификации и генетической паспортизации.

Наибольшей эффективностью характеризовались SSR-праймеры к маркерам генов устойчивости к *Alternaria bligh* генотипов индийской горчицы (Chandra et al., 2013). Это, в частности, праймеры Ni02-D08a, Ni03H07a и RA02-E01a. С ними обнаружены специфичные фрагменты амплификации для линейного сорта ВИК 2 и озимого рапса Горизонт, который получен на его основе путем промораживания семян и отборов на низкотемпературном фоне. Общие свойства этих сортов – высокая зимостойкость и устойчивость к поражению альтернариозом. В связи с этим результаты настоящего исследования могут быть полезны при отборе перспективного селекционного материала и для дальнейшего QTL-анализа на устойчивость к болезням.

Среди сортов рапса ярового типа существенно отличался от других Велес, тогда как Луговской и Грант обладали значительным сходством в исследуемых микросателлитных участках генома. Велес – новый перспективный сорт, допущенный к использованию с 2021 г., разработан на основе сорта Викрос методом химического мутагенеза, который приводит к высокой частоте нуклеотидных замен. Возможно, с этим связано появление уникальных аллелей у сорта Велес сразу по трем локусам, Ni2C12, Ra02-E01a и Na12A02. При этом с маркером Ni2C12 специфичный ДНК-профиль получен и для сорта Викрос.

В основе создания сорта Грант лежит метод межвидовой и межсортовой гибридизации скороспелых образцов иностранной селекции и высокопродуктивных сортов Луговской и Викрос селекции ФНЦ «ВИК им. В.П. Вильямса». Общность происхождения, очевидно, служит причиной сходства, выявленного на генетическом уровне, между сортами Грант и Луговской.

В целом SSR-анализ оказался недостаточно эффективным способом для идентификации сортов в изучаемой коллекции: из общего набора праймеров к микросателлитным локусам генома лишь четыре (10.5 %) определены как сортоспецифичные при оценке рапса, и один (2.3 %) – яровой сурепицы Надежда (маркер Ni03H07a).

Для изучения полиморфизма ДНК дополнительно применяли SRAP-анализ. SRAP относятся к третьему поколению молекулярных маркеров, изначально разрабатывались для генов *B. oleracea* L. (Li, Quiros, 2001), но в настоящее время успешно используются для оценки генетического разнообразия и создания генетических карт многих видов растений (Aneja et al., 2012; Rhouma et al., 2017; Liu et al., 2018). Метод простой, недорогой и эффективный, отличается высокой воспроизводимостью результатов.

В нашей работе с помощью данной техники маркирования удалось выделить шесть комбинаций праймеров, пригодных для идентификации восьми сортов рапса и одного сорта сурепицы. Две комбинации SRAP-праймеров из числа информативных – F10-R7 и F9-Em2 – можно с одинаковой эффективностью использовать для межвидовой

и межсортовой дифференциации в рамках тестируемой выборки.

Итоговая дендрограмма филогенетических отношений позволила визуально оценить степень сходства или генетической удаленности изучаемого сортового материала. К примеру, близкое расположение на ветвях генеалогического дерева сортов рапса Столичный, Норд и Лауреат, видимо, обусловлено особенностями их происхождения: отборы на зимостойкость из комбинаций, где одним из родителей был районированный сорт озимого рапса Промынь.

В общей подгруппе на малой генетической дистанции друг от друга (0.0174) расположились сорта рапса Гарант, созданный путем отборов на зимостойкость, и Северянин, полученный в результате промораживания исходного материала в климокамере с последующим индивидуально-семейным отбором. Наряду с высокой зимостойкостью, эти сорта обладают устойчивостью к полеганию и грибным патогенам.

Обособленным положением в группе яровых выделялся двулузевый сорт Новосёл (генетическая дистанция по Нею 0.3469). Он разработан на основе образцов иностранной селекции и отечественных сортов Луговской и Викрос, характеризующихся скороспелостью и высокой продуктивностью. По срокам созревания Новосёл превышает сорта-стандарты, отличается повышенной устойчивостью к альтернариозу.

Яровые сорта рапса Бизон и Викрос расположились на одной ветви дендрограммы. Оба сорта созданы методом внутривидовой гибридизации, но имеют разных родителей, характеризуются стабильной продуктивностью, раннеспелостью и низким содержанием глюкозинолатов.

## Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют об эффективности SSR- и SRAP-маркеров для оценки ДНК-полиморфизма сортов рапса и сурепицы селекции ФНЦ «ВИК им. В.П. Вильямса». При этом более высокой степенью информативности отличался SRAP-метод: 36 % от общего числа испытанных маркеров оказались полиморфными, тогда как для микросателлитных локусов этот показатель равнялся 16.7 %.

С применением двух техник молекулярного анализа определены ДНК-идентификационные маркеры для 10 из 15 сортов рапса и 2 сортов сурепицы. По микросателлитным локусам Na12A02, Ni2C12, Ra02-E01 и Ni02-D08a уникальные ПЦР-продукты получены для сортов рапса Бизон, Велес, Викрос, ВИК 2, Подмосковский и Луговской. С маркером Ni03H07a выделялась яровая сурепица Надежда. В наборе SRAP-праймеров эффективными для выявления межсортовых различий оказались комбинации: F13-R9, Me4-R7, F11-Em2, F10-R7, F9-Em2, F9-R8. С помощью этих маркеров удалось обнаружить сортоспецифичные ампликоны или получить уникальные ДНК-профили для сортов ярового и озимого рапса Грант, Новосёл, Горизонт, Столичный, Луговской, Подмосковский и яровой сурепицы Светлана.

Результаты данного исследования могут быть использованы при создании перспективных форм и гибридов, для генетической паспортизации, контроля сортовой чистоты семенного материала.



## Список литературы / References

- Воловик В.Т. Капустные культуры. Народно-хозяйственное значение. В: Основные виды и сорта кормовых культур: Итоги научной деятельности Центрального селекционного центра. М.: Наука, 2015;249-253.  
[Volovik V.T. Brassicas: the Economic Importance. In: The Basic Species and Varieties of Fodder Crops: Results of the Research Activity of the Central Breeding Center. Moscow: Nauka Publ., 2015; 249-253. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (официальное издание). М.: Росинформагротех, 2021.  
[State Register of Selection Achievements Admitted for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2021. (in Russian)]
- Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров (методические рекомендации). М.: ООО «Угреша Т», 2020а. DOI 10.33814/978-5-6043194-9-9.  
[Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Identification and Certification of Forage Grass Varieties (Red Clover, Sand Alfalfa, Common Alfalfa, and Black Medick Alfalfa) on the Base of DNA Markers: Methodological Recommendations. Moscow: Ugresha T Publ., 2020a. DOI 10.33814/978-5-6043194-9-9. (in Russian)]
- Клименко И.А., Костенко С.И., Мавлютов Ю.М., Шамустакимова А.О. Эффективность SSR- и Paws-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020б;181(3):100-109. DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109.  
[Klimenko I.A., Kostenko S.I., Mavlyutov Yu.M., Shamustakimova A.O. The efficiency of SSR-and Paws markers for genetic polymorphism evaluation of red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2020b;181(3):100-109. DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109. (in Russian)]
- Косолапов В.М., Шамсутдинов З.Ш., Костенко С.И., Пилипко С.В., Тюрин Ю.С., ... Иванов И.С., Сапрыкина Н.В., Трузина Л.А., Чуйков В.А., Георгиади Н.И. Сорта кормовых культур селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса». М.: ООО «Угрешская типография», 2019.  
[Kosolapov V.M., Shamsutdinov Z.Sh., Kostenko S.I., Pilipko S.V., Tyurin Yu.S., ..., Ivanov I.S., Saprykina N.V., Truzina L.A., Chuiikov V.A., Georgiadi N.I. Varieties of Forage Crops Bred at Williams Federal Scientific Center for Fodder Production and Agroecology. Moscow: Ugreshskaya Tipografiya Publ., 2019. (in Russian)]
- Лемеш В.А., Мозгова Г.В., Грушецкая З.Е., Сидоренко Е.В., Пиллюк Я.Э., Бакановская А.В. Использование специфических ДНК-маркеров для идентификации аллелей генов *FAD3* у рапса (*Brassica napus* L.). Генетика. 2015;51(8):895-904. DOI 10.7868/S0016675815080044.  
[Lemesh V.A., Mozgova G.V., Grushetskaya Z.E., Sidorenko E.V., Pilyuk Ya.E., Bakanovskaya A.V. The use of specific DNA markers for the identification of alleles of the *FAD3* genes in rape (*Brassica napus* L.). *Russ. J. Genet.* 2015;51(8):765-773. DOI 10.1134/S1022795415080044.]
- Мозгова Г.В., Хоружий Н.Е., Амосова А.В., Пиллюк Я.Э., Белявский В.М., Храмченко С.Ю., Муравенко О.В., Лемеш В.А. Генетический полиморфизм рапса (*Brassica napus*) в связи с морозостойкостью. Молекуляр. и приклад. генетика. 2019;26: 34-44.  
[Mozgova G.V., Khoruzhy N.E., Amosova A.V., Pilyuk Ya.E., Belyavskiy V.M., Khranchenko S.Yu., Muravenko O.V., Lemesh V.A. Genetic polymorphism of *Brassica napus* related to cold tolerance. *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetic*. 2019;26:34-44. (in Russian)]
- Осипова Г.М. Рапс в Сибири (морфологические, генетические и селекционные аспекты). Рос. акад. с.-х. наук. Сиб. отд-ние. Сиб. НИИ кормов. Новосибирск, 1998.  
[Osipova G.M. Rapeseed in Siberia: Morphological, Genetic, and Breeding Aspects. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 1998. (in Russian)]
- Рогожина Т.Г., Анискина Ю.В., Карпачев В.В., Шилов И.А. Использование микросателлитного анализа для выявления биотипов у сортов ярового рапса (*Brassica napus* L.). Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2015;2(162):27-33.  
[Rogozhina T.G., Aniskina Yu.V., Karpachev V.V., Shilov I.A. An application of microsatellite analysis for detection of biotypes from spring rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.). *Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskiy Byulleten Vserossiyskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Maslichnykh Kultur = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops*. 2015;2(162):27-33. (in Russian)]
- Сатина Т.Г. Технология генотипирования на основе микросателлитного анализа в селекции рапса (*Brassica napus* L.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010.  
[Satina T.G. A protocol for genotyping based on microsatellite analysis in rapeseed (*Brassica napus* L.) breeding: Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. Moscow, 2010. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(4): 757-768.  
[Khlestkina E.K. Molecular methods of analysis of structural and functional organization of genes and genomes in higher plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(4):757-768. (in Russian)]
- Чесноков Ю.В. Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров. Овощи России. 2018;3:11-15. DOI 10.18619/2072-9146-2018-3-11-15.  
[Chesnokov Yu.V. Genetic markers: comparative classification of molecular markers. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2018; 3:11-15. DOI 10.18619/2072-9146-2018-3-11-15. (in Russian)]
- Шпаар Д. Рапс и сурепица: выращивание, уборка, хранение и использование. Киев: Издательский дом «Зерно», 2012.  
[Shpaar D. Rapeseed and Wild Cabbage: Cultivation, Harvesting, Storage, and Utilization. Kiev: Zerno Publ., 2012. (in Russian)]
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 2008;27(4):617-631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z.
- Amosova A.V., Zemtsova L.V., Grushetskaya Z.E., Samatadze T.E., Mozgova G.V., Pilyuk Y.E., Volovik V.T., Melnikova N.V., Zelenin A.V., Lemesh V.A., Muravenko O.V. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers. *J. Genet.* 2014;93:133-143. DOI 10.1007/s12041-014-0351-6.
- Ananga A.O., Ceibert E., Ochieng J.W., Kumar S., Kambiranda D., Vasanthaiah H., Tsolova V., Senwo Z., Konan K., Anike F.N. Prospects for transgenic and molecular breeding for cold tolerance in canola (*Brassica napus* L.). In: Akpan U.G. (Ed.). Oilseeds. London: IntechOpen, 2012;108-129. DOI 10.5772/32721.
- Aneja B., Yadav N.R., Chawla V., Yadav R.C. Sequence related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Mol. Breeding*. 2012;30:1635-1648. DOI 10.1007/s11032-012-9747-2.
- Chandra V., Pant U., Bhalan R., Singh A.K. Studies on genetic diversity among *Alternaria* blight tolerant Indian mustard genotypes using SSR markers. *Bioscan*. 2013;8(4):1431-1435.

- Chen G., Geng J., Rahman M., Liu X., Tu J., Fu T., Li G., McVetty P.B.E., Tahir M. Identification of QTL for oil content, seed yield, and flowering time in oilseed rape (*Brassica napus*). *Euphytica*. 2010;175:161-174. DOI 10.1007/s10681-010-0144-9.
- Chesnokov Y.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agric. Biol.* 2015;50(5): 571-578. DOI 10.15389/agrobiology.2015.5.571eng.
- Crossa J. Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theor. Appl. Genet.* 1989;77:153-161.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983;1(4):19-21. DOI 10.1007/BF02712670.
- Gao M., Li G., Yang B., Qiu D., Farnham M., Quiros C.F. High-density *Brassica oleracea* map: Identification of useful new linkages. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(2):277-287. DOI 10.1007/s00122-007-0568-3.
- Geng J., Javed N., McVetty P.B.E., Li G., Tahir M. An integrated genetic map for *Brassica napus* derived from double haploid and recombinant inbred populations. *Hered. Genet.* 2012;1(1):103. DOI 10.4172/2161-1041.1000103.
- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann J., Freitag N.M., Link K., Snowden R.J. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(8):1035-1049. DOI 10.1007/s00122-008-0733-3.
- Kirby K.S., Cook E.A. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochem. J.* 1967;104(1):254-257. DOI 10.1042/bj1040254.
- Klyachenko O.L., Prysiazniuk L.M., Shofolova N.V., Piskova O.V. Polymorphism in spring and winter rapeseed varieties (*Brassica napus* L.) identified by SSR markers. *Plant Var. Stud. Prot.* 2018; 14(4):366-374. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151898.
- Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103(2):455-461. DOI 10.1007/s001220100570.
- Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B., Becker H.C., Dehmer K.J. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*. 2018;19(1):10. DOI 10.1186/s12863-017-0589-0.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(10):5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Piquemal J., Cinquin E., Couton F., Rondeau C., Seignoret E., Doucet I., Perret D., Villeger M.-J., Vincourt P., Blanchard P. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(8):1514-1523. DOI 10.1007/s00122-005-0080-6.
- Plieske J., Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 2001;102(5):689-694. DOI 10.1007/s001220051698.
- Rhouma H.B., Taski-Ajdukovic K., Zitouna N., Sdouga D., Milic D., Trifi-Farah N. Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes. *Chil. J. Agric. Res.* 2017;77(4):332-339. DOI 10.4067/S0718-58392017000400332.
- Rohlf F.J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.10 manual. Applied Biostatistics. Inc. New York: Exeter Software, 2000.
- Semerikov V.L., Belyaev A.Y., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theor. Appl. Genet.* 2002; 106:127-132.
- Sharma M., Dolkar D., Salgotra R., Sharma D., Singh P.A., Gupta S.K. Molecular marker assisted confirmation of hybridity in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018; 7(9):894-900. DOI 10.20546/ijcmas.2018.709.107.
- Snowden R.J., Friedt W. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*. 2004; 123(1):1-8. DOI 10.1111/j.1439-0523.2003.00968.x.
- Tian H.Yu., Channa S.A., Hu Sh. Relationships between genetic distance, combining ability and heterosis in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*. 2017;213(1):1-11. DOI 10.1007/s10681-016-1788-x.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J., Ye Z., Xiyang J.M. PopGene 32, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

#### ORCID ID

I.A. Klimenko orcid.org/0000-0002-1850-3859  
A.A. Antonov orcid.org/0000-0002-7684-0503  
A.O. Shamustakimova orcid.org/0000-0003-3535-3108  
Y.M. Mavlyutov orcid.org/0000-0002-5695-6242

**Благодарности.** Финансирование исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (проект № 0442-2019-0001AAAA-A19-119122590053-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.08.2021. После доработки 09.03.2022. Принята к публикации 09.03.2022.