

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ СИСТЕМА МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНТРОГРЕССИИ ФРАГМЕНТОВ А-, В-, С-ГЕНОМОВ У ВИДОВ РОДА *Brassica* L. ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ*

Ю.В. АНИСКИНА¹, Д.А. РОДИОНОВА^{1, 2}, О.Н. ЗУБКО², С.Г. МОНАХОС²,
Н.С. ВЕЛИШАЕВА¹, О.С. КОЛОБОВА¹, И.А. ШИЛОВ¹

Род *Brassica* L. — источник масличных, овощных, пряных, кормовых и декоративных культур, широко выращиваемых по всему миру. Большинство культурных растений относятся к трем диплоидным видам *B. rapa* L. ($2n = 20$, геном AA), *B. nigra* (L.) K. Koch ($2n = 16$, BB) и *B. oleracea* L. ($2n = 18$, CC) и трем аллотетраплоидным видам *B. juncea* (L.) Czern. ($2n = 36$, AABB), *B. napus* L. ($2n = 38$, AACC) и *B. carinata* A. Braun ($2n = 34$, BVCC), которые возникли в результате естественной гибридизации диплоидов. Эффективным способом увеличения генетического разнообразия и улучшения агрономических признаков культур *Brassica* служит отдаленная гибридизация. Для контроля интрогрессии геномного материала при отдаленной гибридизации необходимо применение методов генетического маркирования. В настоящей работе предложен эффективный подход для контроля интрогрессии геномов А, В и С *Brassica* у растений, полученных в результате межвидовой гибридизации. Впервые выявлены специфичные для А-, В- и С-геномов *Brassica* микросателлитные маркеры, длина которых определена в системе высокоразрешающего электрофореза с точностью до одного нуклеотида, а также изучена возможность применения этих маркеров для анализа селекционных образцов, полученных в результате межвидовой гибридизации. Целью исследования была разработка высокопроизводительной технологии контроля интрогрессии геномов А, В и С у представителей рода *Brassica* при отдаленной гибридизации на основе мультиплексного микросателлитного ПЦР-анализа геном-специфичных микросателлитных маркеров. В качестве контрольных образцов исследовали растения, полученные из Центра генетических ресурсов CGN (Centre for Genetic Resources, Нидерланды) и Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург). Растительный материал для анализа интрогрессии был предоставлен сотрудниками ООО Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева (г. Москва). Геномную ДНК получали методом адсорбции на сорбенте. ДНК амплифицировали в ПЦР с праймерами, специфичными для локусов Na10-D09, Na12-A02, Na12-F12, Ni2-B02, Ni2-F02, Ni3-G04B, O112-A04, Ra2-E12, BRMS-043, BN6A2. Анализ флуоресцентно меченых ПЦР-фрагментов осуществляли методом высокоразрешающего электрофореза (генетический анализатор Нанофор-05, ООО НРФ «Синтол»—ФГБНУ Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Длину ПЦР-фрагментов устанавливали с помощью программного обеспечения ДНК Фрагментный анализ (ФГБНУ ИАП РАН, Россия). В результате проведенного исследования разработана система для мультиплексного ПЦР-анализа на основе шести микросателлитных локусов (Na12-A02, BRMS-043, Na10-D09, O112-A04, Ni2-F02, BN6A2), позволяющая в одну стадию определить наличие маркеров геномов А, В и С у видов рода *Brassica*. Маркеры, специфичные для геномов А, В и С, были установлены в процессе мультиплексного ПЦР-анализа контрольных образцов *Brassica* с известной видовой принадлежностью и геномным составом: *B. rapa* (AA), *B. nigra* (BB), *B. oleracea* (CC), *B. napus* (AACC), *B. juncea* (AABB), *B. carinata* (BVCC). Длину маркерных фрагментов определили в системе высокоразрешающего электрофореза на генетическом анализаторе с точностью до одного нуклеотида. Маркеры, специфичные для генома А, выявлены в локусах Na12-A02 (178, 180 и 182 п.н.), BRMS-043 (303, 307 и 313 п.н.), Na10-D09 (283, 285, 291, 293 и 299 п.н.), для генома В — в локусах Na12-A02 (196, 198, 200, 202, 204, 212, 214 и 216 п.н.), O112-A04 (125, 127 и 129 п.н.), Ni2-F02 (198, 200, 202, 204 и 208 п.н.), BN6A2 (222 п.н.), для генома С — в локусах Na12-A02 (164, 168 и 170 п.н.), Ni2-F02 (164, 166, 168 и 186 п.н.). С использованием разработанной мультиплексной системы в генетических профилях образцов (Эт2 × КК)2 × Цв9, (Эт2 × КК)1, Грин × FBLM(1), JR × Agr2ки, БК × ЗМ1-1(6), БК × ЗМ1-1(8), БК и КБ, полученных в результате отдаленной гибридизации, выявлена интрогрессия фрагментов геномов А, В и/или С. Таким образом, у образцов с известной селекционной историей подтверждено наличие соответствующих геномов. Благодаря автоматизации всех этапов анализа в формате 96-луночного планшета эта технология позволяет осуществлять широкомасштабный скрининг селекционных образцов и может быть внедрена в практику как инструмент контроля интрогрессии А-, В- и С-геномного материала, а также контроля его наследования в последующих поколениях.

Ключевые слова: род *Brassica*, эволюционная модель U, геномы *Brassica*, отдаленная гибридизация, интрогрессия, микросателлитные маркеры, геном-специфичные маркеры.

*Работа выполнена в рамках государственного задания № 0574-2019-0003.

Среди растений семейства *Brassicaceae* наибольшую экономическую ценность представляет род *Brassica* L. как источник масличных, овощных, пряных, кормовых и декоративных культур, широко возделываемых по всему миру. Род *Brassica* включает 39 видов (1). Большинство культурных растений относятся к видам *B. napus* L. (масличный рапс, брюква), *B. rapa* L. (азиатские листовые и кочанные капусты, репа и турнепс), *B. oleracea* L. (кочанная, брюссельская и цветная капуста, брокколи, кольраби), *B. juncea* Czern. (горчица сарептская) *B. carinata* A. Braun (горчица эфиопская) и *B. nigra* (L.) K. Koch (горчица черная).

Широко исследовались морфологические, цитогенетические и молекулярные взаимосвязи между культурными видами *Brassica*. Установлены шесть цитогенетических групп *Brassica* (2). Согласно эволюционной модели N. U (3), в результате естественной гибридизации трех диплоидных видов *B. rapa* ($2n = 20$, геном AA), *B. nigra* ($2n = 16$, BB) и *B. oleracea* ($2n = 18$, CC) возникли амфидиплоидные виды *B. juncea* ($2n = 36$, AABB), *B. napus* ($2n = 38$, AACC) и *B. carinata* ($2n = 34$, BBCC). Сравнительный анализ трех геномов *Brassica* обнаруживает значительную консервативность, которая свидетельствует о том, что все три генома полностью наследовались от одного общего предка, но значительно перестроились (4). Различие в числе хромосом предположительно возникло в результате слияния/фрагментации хромосом в процессе дивергенции видов (5). На основе анализа хлоропластных, митохондриальных и ядерных геномов были установлены два направления эволюции видов *Brassica*: *B. nigra* (B-геном) и *B. rapa/B. oleracea* (A/C-геномы) (6). Согласно данным генетического картирования, геномы A и C, несмотря на различие в числе хромосом, высококоллинеарны (7). Предположительно дивергенция *B. nigra* и *B. rapa/B. oleracea* произошла 7,9 млн лет назад. Виды *B. rapa* и *B. oleracea* дивергировали около 4 млн лет назад. Гибридизация видов с образованием *B. napus*, по-видимому, произошла 10 тыс. лет назад (6). Также были выявлены некоторые различия в структуре субгеномов аллотетраплоидных видов по сравнению с соответствующими геномами диплоидных видов (8, 9). Дифференциация среди различных субгеномов в процессе межвидовой гибридизации и длительного одомашнивания полиплоидных видов *Brassica* могла произойти из-за транслокации, инверсии, делеции, дупликации, а также гомеологичной рекомбинации (8).

Отдаленная гибридизация — эффективный способ улучшения агрономических признаков культур *Brassica*, таких как высокая урожайность, устойчивость к болезням и неблагоприятным условиям среды (10). В скрещиваниях видов *Brassica* между собой и с другими родственными представителями семейства *Brassicaceae* барьер межвидовой или межродовой несовместимости был успешно преодолен методами спасения зародышей или соматической гибридизации (11, 12).

Источником потенциально полезных агрономических признаков для улучшения культур могут быть дикорастущие представители семейства *Brassicaceae* (12, 13), например *Brassica maurorum* Durieu и *Eruca versicaria* ssp. *sativa* (Mill.) Thell. (устойчивость к белой ржавчине, возбудитель *Albugo candida* Pers.) (14), *Raphanus sativus* L. (устойчивость к нематоде *Heterodera schachtii* Schmidt) (15), *Sinapis alba* L. (устойчивость к нематоде *H. schachtii* и черной ножке, возбудитель *Leptosphaeria maculans* (Sowerby) P. Karst.) (16), *Sinapis arvensis* L. (устойчивость к черной ножке, *L. maculans*) (17), *Sinapis incana* L. и *Diplotaxis* L. (источник цитоплазматической мужской стерильности) (18).

У культурных видов *Brassica* также обнаружены полезные агрономические признаки, например устойчивость к мучнистой росе (возбудитель *Hyaloperonospora parasitica* (Pers.) Constant) у *B. oleracea* (12), к киле (*Plasmiodiophora*

brassicae Woronin) — у *B. rapa*, *B. oleracea* и *B. napus* (19), к сосудистому бактериозу (*Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson) — у *B. carinata* (20), к тяжелым металлам — у *B. juncea* (21). Виды *Brassica*, содержащие геном В, служат источником устойчивости к черной ножке и неблагоприятным условиям среды (22, 23).

Межвидовая гибридизация — естественное природное явление, результатом которого становится образование новых видов или интрогрессия полезных адаптивных признаков. Ресинтез аллотетраплоидов *Brassica* из диплоидных родительских видов способствует увеличению их генетического разнообразия. С целью расширения генетической основы были повторно получены аллотетраплоиды *B. juncea*, *B. napus* и *B. carinata* (24–26). Геном *Raphanus* был использован для получения синтетических аллотетраплоидов, устойчивых к нематоде (12). Аллогексаплоиды *Brassica* ($2n = 54$, AABBCC) созданы посредством скрещивания *B. napus* × *B. nigra* и *B. carinata* × *B. rapa* (27). В результате гибридизации *B. carinata* и *B. rapa* получены мейотически стабильные аллогексаплоиды (28–31). Из-за мейотических аберраций в результате неконтролируемого спаривания между тремя геномами долгое время не удавалось создать стабильный аллогексаплоид с ожидаемым числом хромосом (32). Синтетические полиплоиды используются в скрещиваниях как источники новых агрономических признаков.

Понимание взаимосвязей между геномами А, В и С имеет важное практическое значение. Степень колинеарности между геномами *B. nigra* и широко культивируемыми *B. oleracea* и *B. rapa* может влиять на возможность переноса признаков из *B. nigra* и родственных представителей родов *Sinapis* и *Raphanus* в важные культуры *Brassica*. Знание гомологичных участков геномов повысит возможность переноса генетических детерминант признаков посредством гомеологичной рекомбинации в ресинтезированные гибриды и селекции форм с желаемыми гибридными хромосомами с помощью технологии генетических маркеров.

С развитием современных технологий селекции, позволяющих осуществлять отдаленную гибридизацию, появилась необходимость введения системы эффективного контроля селекционного процесса на основе методов генетического анализа. Наряду с цитогенетическими методами — флуоресцентной гибридизацией *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) (31) и геномной гибридизацией *in situ* (genomic *in situ* hybridization, GISH) (32, 33) для исследования генетических взаимосвязей между видами *Brassica*, оценки эволюционных изменений геномов и контроля наследования хромосом при создании дигеномных и тригеномных гибридов широко используются ДНК маркеры: RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (34), SSR (simple sequence repeats) (35–37) и SNP (single nucleotide polymorphism) (38).

Эффективным инструментом для исследования интрогрессии генетического материала у межвидовых гибридов служат микросателлитные маркеры. Они равномерно распределены в геноме растений, кодоминантно наследуются и высокополиморфны, что позволяет получать информацию о гомозиготном или гетерозиготном состоянии локусов. Поскольку геномы родственных видов *Brassica* высококолинеарны, для них характерна гомология фланкирующих последовательностей микросателлитных локусов. Благодаря консервативной природе фланкирующих последовательностей, локусы, выявленные у одного вида, в большинстве случаев могут быть использованы для исследования родственных видов.

Микросателлитные локусы растений рода *Brassica* разработаны неза-

висимо несколькими исследовательскими коллективами (39-41). Для многих из таких локусов установлены группы сцепления и расположение на генетической карте. В ряде работ показана перспективность использования микросателлитных локусов для исследования межвидового и внутривидового разнообразия *Brassica* (42, 43), оценки отличимости, однородности и стабильности сортов (44, 45), а также в качестве маркеров генов устойчивости к болезням, например к киле (46, 47) и сосудистому бактериозу (48).

В настоящей работе впервые выявлены эффективные геном-специфичные микросателлитные маркеры А-, В- и С-геномов *Brassica*, длина которых определена в системе высокоразрешающего электрофореза с точностью до одного нуклеотида, а также исследована возможность применения этих маркеров для анализа селекционных образцов, полученных в результате межвидовой гибридизации.

Нашей целью была разработка эффективной технологии контроля интрогрессии геномов А, В и С у представителей рода *Brassica* при отдаленной гибридизации на основе мультиплексного микросателлитного ПЦР-анализа геном-специфичных микросателлитных маркеров.

Методика. В качестве контрольных образцов использовали растения, полученные из Центра генетических ресурсов CGN (Centre for Genetic Resources, Нидерланды) и Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург). Растительный материал для исследования интрогрессии геномного материала был предоставлен сотрудниками ООО Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева (г. Москва).

Геномную ДНК получали методом адсорбции на сорбенте в соответствии с инструкцией к набору Фитосорб (ООО НПФ «Синтол», Россия). В исследованиях использовали растительный материал 5 растений каждого наименования. Микрообъемы растворов дозировали автоматически (дозаторы фирмы «Ленпипет», Россия). Осаждение проводили на микроцентрифуге Centrifuge 5415D («Eppendorf», Германия). Лизис растительных образцов осуществляли в термостате Термит (ООО НПО «ДНК-Технология», Россия). Для перемешивания и осаждения ДНК-образцов использовали мини-центрифугу-вортекс Microspin FV-2400 («SIA Biosan», Латвия).

Растительную ДНК амплифицировали методом ПЦР с праймерами, специфичными для локусов Na10-D09, Na12-A02, Na12-F12, Ni2-B02, Ni2-F02, Ni3-G04B, O112-A04, Ra2-E12 (39), BRMS-043 (40), BN6A2 (41). ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,5 мМ MgCl₂; 5 ед/мкл Taq-ДНК-полимеразы (ООО НПО «ДНК-Технология», Россия), 25 мМ dNTP (ООО «Медиген», Россия), 5-20 пмоль каждого праймера в зависимости от степени флуоресценции (ООО НПФ «Синтол», Россия), 10 нг ДНК. Амплификацию осуществляли в термоциклере CFX-96 («Bio-Rad», США) по программе: 5 мин при 95 °С; 30 с при 94 °С, 30 с при 48 °С, 30 с при 72 °С (30 циклов); 5 мин при 72 °С. Наличие продуктов амплификации подтверждали в 2 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Анализ флуоресцентно меченных ПЦР-фрагментов осуществляли методом капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях в генетическом анализаторе Нанофор-05 (ООО НПФ «Синтол»—ФГБНУ Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) согласно инструкции к прибору (ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии). Для проведения фрагментного анализа 1 мкл ПЦР-продукта смешивали с 1 мкл маркера молекулярной массы S-450 (ООО НПФ «Синтол», Россия) и 8 мкл формамида Super DI («MCLab»,

США), затем денатурировали 5 мин при 95 °С.

Длину ПЦР-фрагментов устанавливали с помощью программного обеспечения ДНК Фрагментный анализ (ФГБНУ ИАП РАН, Россия).

Результаты. Ранее при изучении полиморфизма микросателлитных локусов в 8 % полиакриламидном геле мы отобрали наиболее полиморфные локусы, позволяющие различать растения видов *B. rapa*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. napus*, *B. juncea* и *B. carinata* (49–51). Поскольку большинство этих локусов имеют консервативные фланкирующие последовательности в геномах А, В и С, их амплификация наблюдается у всех шести видов *Brassica*, что позволяет провести сравнительный анализ и выявить геном-специфичные маркеры.

На основании полученных данных для исследования были выбраны 10 микросателлитных локусов. Полиморфизм длин микросателлитных фрагментов изучали у контрольных образцов шести видов: *B. rapa* (АА), *B. nigra* (ВВ), *B. oleracea* (СС), *B. napus* (ААСС), *B. juncea* (ААВВ), *B. carinata* (ВВСС), для которых известны видовая принадлежность и геномный состав (табл. 1).

1. Представители шести видов рода *Brassica* L. и межвидовые гибриды, у которых был изучен полиморфизм длин микросателлитных фрагментов

Обозначение	Описание
Контрольные образцы	
1-02 (ВИР), Урал (ВИР), ВикРос (ВИР)	<i>B. napus</i> L. (2n = 38, геном ААСС)
CGN06832, CGN06818, 114 (ВИР), 107 (ВИР)	<i>B. rapa</i> L. (2n = 20, геном АА)
CGN06619, CGN006634, CGN02656	<i>B. nigra</i> L. (2n = 16, геном ВВ)
CGN03950, CGN03952	<i>B. carinata</i> A. Braun (2n = 34, геном ВВСС)
CGN15778, CGN06998, CGN07004, CGN07022	<i>B. oleracea</i> L. (2n = 18, геном СС)
CGN04588, CGN04594, CGN015193	<i>B. juncea</i> (L.) Czern. (2n = 36, геном ААВВ)
Селекционные образцы	
№ 63, № 69, № 70, № 97, № 98, № 106	Растения-регенеранты, полученные в культуре изолированных микроспор от растений ВС ₂ при межвидовой гибридизации <i>B. oleracea</i> и <i>B. carinata</i> : {[(<i>B. oleracea</i> × <i>B. carinata</i>) × <i>B. oleracea</i>] × <i>B. oleracea</i> }
(Эт2 × КК)2 × Цв9	Потомство ВС ₁ от межвидовой гибридизации (<i>B. oleracea</i> × <i>B. rapa</i>) × <i>B. oleracea</i>
Цв9	Инбредная линия капусты белокочанной <i>B. oleracea</i>
КК	Инбредная линия капусты пекинской <i>B. rapa</i>
(Эт2 × КК)1	Межвидовой гибрид F ₁ (<i>B. oleracea</i> × <i>B. rapa</i>)
Грин × FBLM(1)	Межвидовой гибрид F ₁ (<i>B. oleracea</i> × <i>B. juncea</i>)
FBLM	Инбредная линия горчицы сарептской <i>B. juncea</i>
JR	Инбредная линия репы <i>B. rapa</i>
JR × Agr2ки	Межвидовой гибрид F ₁ (<i>B. rapa</i> × <i>B. oleracea</i>)
ПР3	Инбредная линия капусты белокочанной <i>B. oleracea</i>
ЗМ тетра	Тетраплоидная линия капусты белокочанной <i>B. oleracea</i>
БК × ЗМ1-1(6), БК × ЗМ1-1(8)	Растения ВС ₁ от межвидовой гибридизации <i>B. oleracea</i> и <i>B. carinata</i> : [(<i>B. oleracea</i> × <i>B. carinata</i>) × <i>B. oleracea</i>]
<i>B. carinata</i> 1	Инбредная линия горчицы эфиопской <i>B. carinata</i>
БК	Межвидовой гибрид F ₁ (<i>B. oleracea</i> × <i>B. carinata</i>)
<i>B. carinata</i> 2	Инбредная линия горчицы эфиопской <i>B. carinata</i>
КБ	Межвидовой гибрид F ₁ (<i>B. carinata</i> × <i>B. oleracea</i>)
Примечание. CGN — Centre for Genetic Resources (Нидерланды), ВИР — Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург). Селекционные образцы выведены на ООО Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева (г. Москва).	

Фрагменты определенной длины, выявленные у растений вида *B. rapa* (АА) и отсутствующие у контрольных образцов *B. nigra* (ВВ) и *B. oleracea* (СС), были приняты за маркеры присутствия материала генома А (А-геном-специфичные). Фрагменты, выявленные у *B. nigra* (ВВ) и отсутствующие у *B. rapa* (АА) и *B. oleracea* (СС), стали маркерами генома В (В-геном-специфичные). Фрагменты, выявленные у *B. oleracea* (СС) и отсутствующие у *B. rapa* (АА) и *B. nigra* (ВВ), были приняты за маркеры генома С (С-геном-специфичные).

В результате ПЦР-анализа локуса Na12-A02 у растений видов *B. rapa*

(AA), *B. nigra* (BB), *B. oleracea* (CC) были выявлены A-, B-, C-геном-специфичные фрагменты. Также установлено кодоминантное сочетание соответствующих фрагментов у амфидиплоидных видов *B. napus* (AACC), *B. juncea* (AABB), *B. carinata* (BBCC). Локус BRMS-043 амплифицировался только у растений с геномом А — *B. rapa* (AA), *B. juncea* (AABB), *B. napus* (AACC), что позволяет отличить их от растений с B- и C-геномами. В локусе Na10-D09 были обнаружены A-геном-специфичные фрагменты. ПЦР-фрагменты синтезировались у представителей всех шести видов. Однако только фрагменты, выявленные у растений *B. rapa* (AA), значительно отличались по длине от фрагментов у растений *B. nigra* (BB), *B. oleracea* (CC). В локусах O112-A04 и BN6A2 установили B-геном-специфичные фрагменты. В результате анализа локуса Ni2-F02 выявили фрагменты, специфичные для B- и C-геномов. В локусах NI2-B02, RA2-E12, NA12-F12 обнаружили сходные по длине фрагменты у контрольных образцов *B. rapa*, *B. nigra* и *B. oleracea*. То есть эти локусы оказались непригодными для изучения интрогрессии A-, B- и C-геномов и были исключены из исследования.

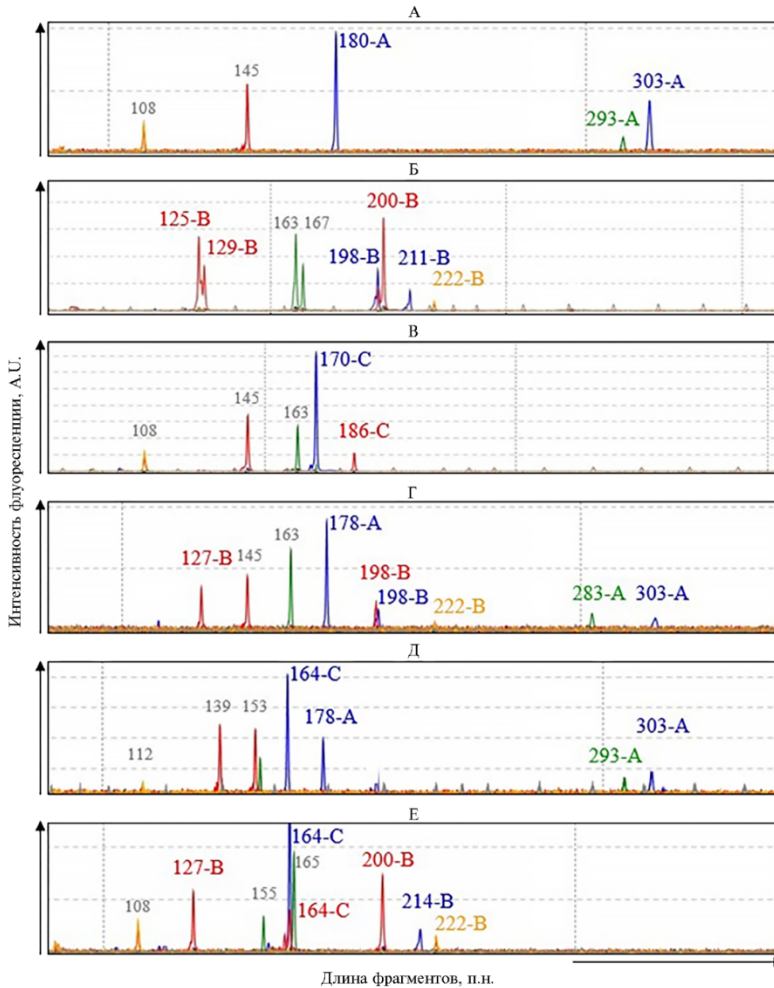
2. Структура мультиплексной системы, разработанной на основе микросателлитных локусов для анализа интрогрессии геномов А, В и С видов рода *Brassica* L.

Локус	Геном-специфичность	Краситель	Длина, п.н.
Na12-A02	ABC	FAM	164-216
BRMS-043	A	FAM	303-313
Na10-D09	A	R6G	155-299
O112-A04	B	ROX	125-153
Ni2-F02	BC	ROX	164-200
BN6A2	B	Sy630	108-222

В результате изучения контрольных образцов отобрали шесть микросателлитных локусов: Na12-A02, BRMS-043, Na10-D09, O112-A04, Ni2-F02 и BN6A2. На их основе мы разработали систему мультиплексного ПЦР-анализа, позволяющую оценивать образцы по всем локусам одновременно (табл. 2). Для амплификации микросателлитных локусов в одной ПЦР-пробе была подобрана единая оптимальная температура отжига нескольких пар праймеров ($T_{отж.} = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$). В этой мультиплексной системе амплификация каждого микросателлитного локуса осуществлялась с парой специфичных праймеров, один из которых был помечен определенным флуоресцентным красителем (FAM, R6G, ROX и Sy630), что позволяло анализировать получаемые по каждому локусу ПЦР-фрагменты отдельно по соответствующему каналу детекции (см. табл. 2). Локусы были подобраны по длине таким образом, чтобы при анализе по одному каналу диапазоны длин их фрагментов не перекрывались. Длина полученных ПЦР-фрагментов определялась с точностью до одного нуклеотида в результате разделения электрофорезом высокого разрешения в капиллярах на автоматическом генетическом анализаторе Нанофор-05, с использованием технологии флуоресцентной детекции.

С помощью разработанной мультиплексной системы мы получили оцифрованные генетические профили образцов *Brassica*, на которых каждый пик соответствовал ПЦР-фрагменту определенной длины (рис.). В результате микросателлитного анализа контрольных растений были установлены фрагменты, специфичные для геномов А, В и С. Так, в генетическом профиле контрольного образца CGN06832 (*B. rapa*) присутствовали фрагменты, характерные для генома А, — 180 п.н. (локус Na12-A02), 303 п.н. (локус BRMS-043) и 293 п.н. (локус Na10-D09) (см. рис., А). В профиле образца CGN006634 (*B. nigra*) были выявлены отличительные маркеры

генома В: 198 п.н. и 211 п.н. (локус Na12-A02), 125 п.н. и 129 п.н. (локус OL12-A04), 200 п.н. (локус Ni2-F02), 222 п.н. (локус BN6A2) (см. рис., Б). У образца CGN15778 (*B. oleracea*) обнаружили фрагменты, специфичные для генома С, — 170 п.н. (локус Na12-A02) и 186 п.н. (локус Ni2-F02) (см. рис., В). В генетических профилях аллотетраплоидных видов наблюдалось кодоминантное сочетание фрагментов геномов соответствующих диплоидных видов (см. рис., Г-Е).



Генетические профили контрольных образцов растений шести видов рода *Brassica* L., полученные в результате мультиплексного ПЦР-анализа микросателлитных локусов: А — CGN06832 (*B. rapa*, геном AA), Б — CGN006634 (*B. nigra*, BB), В — CGN15778 (*B. oleracea*, CC), Г — CGN015193 (*B. juncea*, AABB), Д — ВИР ВикРос (*B. napus*, AACC), Е — CGN03950 (*B. carinata*, BBCC). Цвет пика (фрагмента) соответствует каналу детекции на приборе Нанофор-05 (ООО НПФ «Синтол»—ФГБНУ Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) и определяет принадлежность фрагмента к определенному локусу: Na12-A02 и BRMS-043 — FAM (синий), NA10-D09 — R6G (зеленый), O112-A04 и Ni2-F02 — ROX (красный), BN6A2 — SY630 (оранжевый). Серым цветом обозначены недискриминирующие фрагменты, которые амплифицируются одновременно у двух или трех геномов. Описание образцов см. в таблице 1.

На основе полученных генетических характеристик определили состав аллелей каждого микросателлитного локуса, среди которых были выявлены маркеры, специфичные для геномов А, В и С (табл. 3).

3. А-, В- и С-геном-специфичные маркеры, выявленные у представителей шести видов рода *Brassica* L. с использованием мультиплексной системы ПЦР-анализа микросателлитных локусов

Локус	Геном	Длина выявленных микросателлитных фрагментов, п.н.		
		А-специфичные	В-специфичные	С-специфичные
Na12-A02	ABC	178, 180, 182	196, 198, 200, 202, 204, 212, 214, 216	164, 168, 170
BRMS-043	A	303, 307, 313	—	—
Na10-D09	A	283, 285, 287, 291, 293, 299	—	—
O112-A04	B	—	125, 127, 129	—
Ni2-F02	BC	—	198, 200, 202, 204, 208	164, 166, 168, 186
BN6A2	B	—	222	—

Примечание. Прочерки означают отсутствие в локусе соответствующего геном-специфичного маркера.

4. Геном-специфичные маркеры (п.н.), выявленные у линий и межвидовых гибридов рода *Brassica* L. с использованием разработанной системы мультиплексного ПЦР-анализа микросателлитных локусов

Образец	Локус						Геном
	Na12-A02	BRMS-043	Na10-D09	O112-A04	Ni2-F02	BN6A2	
КК	180 ^A	303 ^A	293 ^A	145	—	108	AA
JR	180 ^A	311 ^A	285 ^A 341 ^A	143	—	114	AA
№ 63	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
№ 69	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
№ 70	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
№ 97	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
№ 98	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
№ 106	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
Цв9	164 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
ПР3	164 ^C	—	—	—	166 ^C	108	CC
3М тетра	164 ^C	—	—	—	186 ^C 166 ^C 186 ^C	108	CC
БК × 3М1-1(6)	164 ^C 168 ^C	—	167	—	—	108	CC
БК × 3М1-1(8)	164 ^C 168 ^C	—	155	—	166 ^C	108	CC
(Эт2 × КК)2 × Цв9	170 ^C 180 ^A	303 ^A	155 293 ^A	145	166 ^C	108	AACC
(Эт2 × КК)1	170 ^C 180 ^A	303 ^A	293 ^A	145	166 ^C	108	AACC
JR × Агр2ки	164 ^C 180 ^A	311 ^A	287 ^A	145	166 ^C	108 114	AACC
FBLM	178 ^A 198 ^B	313 ^A	163 285 ^A	127 ^B 145	198 ^B	222 ^B	AABB
Грин × FBLM(1)	164 ^C 178 ^A 198 ^B	313 ^A	163 287 ^A	127 ^B 145	166 ^C 198 ^B	108 222 ^B	AABBCC
<i>B. carinata</i> 1	16	—	155 167	127 ^B	164 ^C 200 ^B	108	BVCC
БК	164 ^C 214 ^B	—	155 167	127 ^B	166 ^C 200 ^B	108 222 ^B	BVCC
<i>B. carinata</i> 2	164 ^C 214 ^B	—	155 167	127 ^B	166 ^C 200 ^B	108 222 ^B	BVCC
КБ	164 ^C 168 ^C 214 ^B	—	155 167	127 ^B	166 ^C 200 ^B	108 222 ^B	BVCC

Примечание. Верхние индексы (A, B, C) указывают геномную специфичность маркерного фрагмента. Прочерки означают отсутствие у образца соответствующего геном-специфичного маркера по указанному локусу. Описание образцов см. в таблице 1.

Разработанную систему ПЦР-анализа использовали для выявления А-, В- и С-геном-специфичных фрагментов у селекционных образцов (см. табл. 1). В результате получили их генетические профили и обнаружили геном-специфичные фрагменты, определяющие геномную принадлежность образцов (табл. 4). Следовательно, используемая мультиплексная система позволяет достоверно выявлять интрогрессию фрагментов геномов А, В и

С у видов рода *Brassica*. Кодоминантное сочетание фрагментов геномов в генетических профилях селекционных образцов (Эт2 × КК)2 × Цв9, полученных в результате гибридизации (*B. oleracea* × *B. rapa*) × *B. oleracea*, (Эт2 × КК)1 (F₁ *B. oleracea* × *B. rapa*), Грин × FBLM (1) (F₁ *B. oleracea* × *B. juncea*), JR × Agr2ки (F₁ *B. rapa* × *B. oleracea*), БК (F₁ *B. oleracea* × *B. carinata*) и КБ (F₁ *B. carinata* × *B. oleracea*) свидетельствовало об интрогрессии генетического материала в результате межвидовой гибридизации. Данные, полученные в результате микросателлитного анализа, соответствовали селекционной истории этих образцов.

Система мультиплексного микросателлитного анализа на основе шести микросателлитных локусов, специфичных для геномов А, В и С у представителей рода *Brassica*, позволяет надежно различить растения шести видов треугольника U, а также получить информацию о генетическом разнообразии, поскольку каждый геномный маркер характеризуется несколькими аллельными вариантами. Каждый геном определяется минимум двумя маркерами, которые служат друг для друга внутренними контролями.

При использовании мультиплексной системы можно проследить интрогрессию определенных участков генома, поскольку для входящих в ее состав локусов были установлены группы сцепления (<http://www.brassica.info/resource/markers/ssr-exchange.php>). Например, показано, что локус BRMS-043 связан с устойчивостью к сосудистому бактериозу *B. rapa* (48).

Эффективность применения ДНК маркеров для генотипирования новых форм и контроля передачи геномного материала при их создании продемонстрирована в ряде работ. С использованием 162 комбинаций А-, В- и С-геном-специфичных SSR-праймеров был проведен анализ потенциальных генетических изменений у 25 синтезированных аллогексаплоидов (Н1 *B. rapa* × *B. carinata*, ААВВСС, 2n = 54) (31). Для оценки генетической изменчивости новой формы *B. napus*, полученной в результате скрещивания *B. rapa* с гексаплоидом (*B. napus* × *B. oleracea*, ААСССС), использовали 153 комбинации праймеров для микросателлитным локусам (32). С помощью 34 SSR-маркеров была обнаружена гомеологическая рекомбинация хромосом у потомства тригеномных гибридов *B. napus* × *B. carinata* (АВСС), полученного из микророса (37).

Для идентификации видов *Brassica* и оценки генетического разнообразия разработан массив SNP маркеров для аллотетраплоида *B. napus* — Illumina Infinium *B. napus* 60K SNP («Illumina, Inc.», США) (52). Также для быстрой идентификации видов *Brassica*, входящих в треугольник N. U, предложен мультиплексный ПЦР-анализ (MPCR) специфичных последовательностей геномов А, В и С с использованием пяти комбинаций праймеров (35). Достоверность результатов MPCR была проверена на 120 генетически охарактеризованных образцах *Brassica*. Благодаря прямой детекции специфичных фрагментов в 2 % агарозном геле MPCR анализ полезен как доступный и быстрый диагностический подход, который может быть легко реализован в обычной лаборатории. Однако, как отмечают сами авторы, этот метод имеет достаточно низкую пропускную способность, и его следует адаптировать для высокопроизводительного скрининга в режиме реального времени.

В отличие от дорогостоящих и более сложных в исполнении методов, требующих специальной обработки результатов (например, при применении ДНК-чипа Illumina Infinium *B. napus* 60K SNP), предлагаемая нами технология доступнее и удобнее в использовании. Электрофоретический анализ осуществляется в автоматическом режиме на высокоточном оборудовании. Это значительно повышает надежность интерпретации полученных

данных (в отличие от эмпирической оценки в геле без точного определения длин анализируемых фрагментов ДНК) (35, 45, 48). Благодаря автоматизации всех этапов анализа в формате 96-луночного планшета предложенный подход позволяет осуществлять широкомасштабный скрининг селекционных образцов. Рассматриваемая мультиплексная система может применяться для оценки интрогрессии геномов *Brassica* при межвидовой гибридизации и контроля наследования геномного материала в последующих поколениях.

Таким образом, нами разработана система мультиплексного ПЦР-анализа шести микросателлитных локусов *Brassica* (Na12-A02, BRMS-043, Na10-D09, O112-A04, Ni2-F02, BN6A2) для детекции фрагментов геномов А, В и С. Достоверность системы подтверждена на контрольных образцах с известным геномным составом и видовой принадлежностью. С использованием разработанных маркеров геномов А, В и С выявлены геном-специфичные фрагменты и определен геномный состав ряда селекционных образцов. Результаты исследования могут применяться для обнаружения последовательностей, специфичных для геномов А, В, С, у представителей рода *Brassica* и контроля наследования генетического материала при отдаленной гибридизации.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,

127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: aniskina.julia@gmail.com ✉, daria_951705@mail.ru, nazife@mail.ru,
kolobus16@yandex.ru, ishilov@rambler.ru;

²ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева,

127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: zubkoolga21@mail.ru, s.monakhos@rgau-msha.ru

Поступила в редакцию
24 декабря 2019 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2020, V. 55, № 3, pp. 510-522

A MULTIPLEX MICROSATELLITE PCR METHOD FOR DETECTION OF *Brassica* L. A, B AND C GENOME FRAGMENT INTROGRESSIONS UPON INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION

Yu. V. Aniskina¹, D. A. Rodionova^{1, 2}, O. N. Zubko², S. G. Monachos², N. S. Velishaeva¹,
O. S. Kolobova¹, I. A. Shilov¹

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail aniskina.julia@gmail.com (✉ corresponding author), daria_951705@mail.ru, nazife@mail.ru, kolobus16@yandex.ru, ishilov@rambler.ru;

²Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail: zubkoolga21@mail.ru, s.monakhos@rgau-msha.ru

ORCID:

Aniskina Yu. V. orcid.org/0000-0002-3376-0263

Zubko O. N. orcid.org/0000-0001-9701-6647

Velishaeva N. S. orcid.org/0000-0002-2755-3313

Shilov I. A. orcid.org/0000-0003-2448-6239

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The work was performed as part of state assignment No. 0574-2019-0003.

Received December 24, 2019

Rodionova D. A. orcid.org/0000-0001-7628-1791

Monachos S. G. orcid.org/0000-0001-9404-8862

Kolobova O. S. orcid.org/0000-0003-3172-8099

doi: 10.15389/agrobiology.2020.3.510eng

Abstract

The genus *Brassica* L. is a source of oilseeds, vegetables, spices, fodder and ornamental crops widely cultivated around the world. The six most cultivated species of the genus *Brassica* comprise allotetraploid species *B. juncea* (L.) Czern. ($2n = 36$, genome AABB), *B. napus* L. ($2n = 38$, genome AACC) and *B. carinata* A. Braun ($2n = 34$, genome BBCC), which are natural hybrids of corresponding diploid species *B. rapa* L. ($2n = 20$, genome AA), *B. nigra* L. ($2n = 16$, genome BB), and *B. oleracea* L. ($2n = 18$, genome CC). An effective way to increase the genetic diversity and improve the agronomic traits of *Brassica* crops, such as high yields, resistance to diseases, and abiotic stresses is to introduce traits of interest by the interspecific hybridization. To control the introgression of genomic material upon the hybridization, the development and implementation of genetic markers are

necessary. This paper proposes an effective approach for controlling the introgression of A, B, and C genomes of *Brassica* in intraspecific hybrids. The investigation aimed to develop a high-throughput technology based on multiplex PCR analysis of genome-specific microsatellite markers for controlling the introgression of A-, B-, and C-genomes in *Brassica* intraspecific hybrids. Control samples were obtained from the Center for Genetic Resources CGN (Netherlands) and the All-Russian Institute of Plant Genetic Resources N.I. Vavilov (VIR, St. Petersburg). Plant material for the genomic material introgression study were obtained from the Timofeev Breeding Station (Moscow). Genomic DNA was extracted by sorbent method. PCR was run with specific primers for the Na10-D09, Na12-A02, Na12-F12, Ni2-B02, Ni2-F02, Ni3-G04B, OI12-A04, Ra2-E12, BRMS-043, BN6A2 loci. Fluorescently labelled PCR products were analyzed by high-resolution electrophoresis using a Nanofor-05 genetic analyzer (Syntol — The Institute for Analytical Instrumentation, Russia). The length of the amplified DNA fragments was determined using the DNA Fragment Analysis software (The Institute for Analytical Instrumentation, Russia). A multiplex PCR technique was developed based on the six microsatellite loci Na12-A02, BRMS-043, Na10-D09, OI12-A04, Ni2-F02, BN6A2, allowing us to determine the markers of three *Brassica* genomes in one run. A, B, and C genome-specific markers were identified during multiplex PCR analysis of control samples of six *Brassica* species with known taxonomic attributions and genome compositions: *B. rapa* (AA), *B. nigra* (BB), *B. oleracea* (CC), *B. napus* (AACC), *B. juncea* (AABB), and *B. carinata* (BBCC). The length of marker fragments was determined by high resolution electrophoresis using a genetic analyzer with an accuracy of one nucleotide. A-genome specific markers were identified at the loci Na12-A02 (178 bp, 180 bp, 182 bp), BRMS-043 (303 bp, 307 bp, 313 bp), and Na10-D09 (283 bp, 285 bp, 291 bp, 293 bp, 299 bp). B-genome specific markers were detected at the loci Na12-A02 (196 bp, 198 bp, 200 bp, 202 bp, 204 bp, 212 bp, 214 bp, 216 bp), OI12-A04 (125 bp, 127 bp, 129 bp), Ni2-F02 (198 bp, 200 bp, 202 bp, 204 bp, 208 bp), and BN6A2 (222 bp). C-genome specific markers were detected at the loci Na12-A02 (164 bp, 168 bp, 170 bp) and Ni2-F02 (164 bp, 166 bp, 168 bp, 186 bp). The developed multiplex PCR system reveals introgressions of fragments of genomes A, B and C in the genetic profiles of interspecific hybrids (Et2 × KK)2 × Tsv9, (Et2 × KK)1, Green × FBLM(1), JR × Agr2ki, BK × ZM1-1(6), BK × ZM1-1(8), BK, and KB. The method also confirmed the presence of the corresponding genomes in the studied samples with a known breeding history. Due to the automation, analysis allows the large-scale screening of plant samples. The proposed technology can be used in breeding practice as a tool for controlling the introgression of A, B and C genome material upon the interspecific hybridization, as well as controlling its inheritance in subsequent generations.

Keywords: *Brassica*, U triangle, *Brassica* genomes, interspecific hybridization, introgression, microsatellites, genome-specific markers.

REFERENCES

1. Warwick S.I., Francis A., Al-Shehbaz I.A. *Brassicaceae*: Species checklist and database on CD-ROM. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, 259(2-4): 249-258 (doi: 10.1007/s00606-006-0422-0).
2. Morinaga T. Interspecific hybridization in *Brassica*. IV. The cytology of F1 hybrid of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytologia*, 1934, 6: 62-67 (doi: 10.1508/cytologia.6.62).
3. U N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 1935, 7: 389-452.
4. Lagercrantz U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics*, 1998, 150(3): 1217-1228.
5. Kowalski S.P., Lan T.H., Feldmann K.A., Paterson A.H. Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved organization. *Genetics*, 1994, 138(2): 499-510.
6. Rana D., van den Boogaart T., O'Neill C.M., Hynes L., Bent E., Macpherson L., Park J.Y., Lim Y.P., Bancroft I. Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives. *Plant Journal*, 2004, 40(5): 725-733 (doi: 10.1111/j.1365-3113.2004.02244.x).
7. Lagercrantz U., Lydiat D. Comparative genome mapping in Brassica. *Genetics*, 1996, 144(4): 1903-1910.
8. Zou J., Hu D., Liu P., Raman H., Liu Z., Liu X., Parkin I.A.P., Chalhou B., Meng J. Colinearity and divergence of the A subgenome of *Brassica juncea* compared with other *Brassica* species carrying different A subgenomes. *BMC Genomics*, 2016, 17: 18 (doi: 10.1186/s12864-015-2343-1).
9. Jiang C., Ramchiary N., Ma Y., Jin M., Feng J., Li R., Wang H., Long Y., Choi S.R., Zhang C., Cowling W.A., Park B.S., Lim Y.P., Meng J. Structural and functional comparative mapping between the *Brassica* A genomes in allotetraploid *Brassica napus* and diploid *Brassica rapa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123(4): 927-941 (doi: 10.1007/s00122-011-1637-1).
10. Mason A.S., Batley J. Creating new interspecific hybrid and polyploid crops. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(8): 436-441 (doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.004).
11. Snowden R.J. Cytogenetics and genome analysis in *Brassica* crops. *Chromosome Research*, 2007,

- 15(1): 85-95 (doi: 10.1007/s10577-006-1105-y).
12. Katche E., Quezada-Martinez D., Katche E.I., Vasquez-Teuber P., Mason A.S. Interspecific hybridization for *Brassica* crop improvement. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 2019, 1: e190007 (doi: 10.20900/cbagg20190007).
 13. Siemens J. Interspecific hybridisation between wild relatives and *Brassica napus* to introduce new resistance traits into the oilseed rape gene pool. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2002, 38(3-4): 155-157 (doi: 10.17221/6258-CJGPB).
 14. Chrungu B., Verma N., Mohanty A., Pradhan A., Shivanna K.R. Production and characterization of interspecific hybrids between *Brassica maurorum* and crop Brassicas. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98(3-4): 608-613 (doi: 10.1007/s001220051111).
 15. Lelivelt C.L.C., Krens F.A. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) into the *Brassica napus* L. gene pool through intergeneric somatic hybridization with *Raphanus sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83(6-7): 887-894 (doi: 10.1007/BF00226712).
 16. Lelivelt C.L.C., Leunissen E.H.M., Frederiks H.J., Helsper J.P.F.G., Krens F.A. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) from *Sinapis alba* L. (white mustard) to the *Brassica napus* L. gene pool by means of sexual and somatic hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85(6-7): 688-696 (doi: 10.1007/BF00225006).
 17. Snowdon R.J., Winter H., Diestel A., Sacristán M.D. Development and characterisation of *Brassica napus* - *Sinapis arvensis* addition lines exhibiting resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(7): 1008-1014 (doi: 10.1007/s001220051574).
 18. Yamagishi H., Bhat S.R. Cytoplasmic male sterility in *Brassicaceae* crops. *Breeding Science*, 2014, 64(1): 38-47 (doi: 10.1270/jsbbs.64.38).
 19. Piao Z., Ramchiary N., Lim Y.P. Genetics of clubroot resistance in *Brassica* species. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2009, 28(3): 252-264 (doi: 10.1007/s00344-009-9093-8).
 20. Sharma B.B., Kalia P., Singh D., Sharma T.R. Introgression of black rot resistance from *Brassica carinata* to cauliflower (*Brassica oleracea botrytis* group) through embryo rescue. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1255 (doi: 10.3389/fpls.2017.01255).
 21. Belimov A.A., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Dzyuba O.O. Intraspecific variability of cadmium tolerance in hydroponically grown Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007, 29(5): 473-478 (doi: 10.1007/s11738-007-0057-y).
 22. Plieske J., Struss D., Röbbelen G. Inheritance of resistance derived from the B-genome of *Brassica* against *Phoma lingam* in rapeseed and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 929-936 (doi: 10.1007/s001220050973).
 23. Navabi Z.K., Parkin I.A.P., Pires J.C., Xiong Z., Thiagarajah M.R., Good A.G., Rahman M.H. Introgression of B-genome chromosomes in a doubled haploid population of *Brassica napus* × *B. carinata*. *Genome*, 2010, 53(8): 619-629 (doi: 10.1139/g10-039).
 24. Abel S., Möllers C., Becker H. Development of synthetic *Brassica napus* lines for the analysis of "fixed heterosis" in allopolyploid plants. *Euphytica*, 2005, 46(1-2): 157-163 (doi: 10.1007/s10681-005-3364-7).
 25. Srivastava A., Mukhopadhyay A., Arumugam N., Gupta V., Verma J.K., Pental D., Pradhan A.K. Resynthesis of *Brassica juncea* through interspecific crosses between *B. rapa* and *B. nigra*. *Plant Breeding*, 2004, 123(2): 204-206 (doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00933.x).
 26. Narasimhulu S.B., Kirti P.B., Prakash S., Chopra V.L. Resynthesis of *Brassica carinata* by protoplast fusion and recovery of a novel cytoplasmic hybrid. *Plant Cell Reports*, 1992, 11(8): 428-432 (doi: 10.1007/BF00234376).
 27. Chen S., Nelson M.N., Chèvre A.M., Jenczewski E., Li Z., Mason A.S. Trigenomic bridges for *Brassica* improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2011, 30(6): 524-547 (doi: 10.1080/07352689.2011.615700).
 28. Monakhos G.F., Ignatov A.N., Dzhailov F.S. *Izvestiya TSKHA*, 2001, 4: 56-68 (in Russ.).
 29. Malek M.A., Rahman L., Das M.L., Hassan L., Rafii M.Y., Ismail M.R. Development of hexaploid *Brassica* (AABBCC) from hybrids (ABC) of *Brassica carinata* (BBCC) × *B. rapa* (AA). *Australian Journal of Crop Science*, 2013, 7(9): 1375-1382.
 30. Zhou J., Tan C., Cui C., Ge X., Li Z. Distinct subgenome stabilities in synthesized *Brassica* allohexaploids. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(7): 1257-1271 (doi: 10.1007/s00122-016-2701-7).
 31. Gupta M., Atri C., Agarwal N., Banga S.S. Development and molecular-genetic characterization of a stable *Brassica* allohexaploid. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(11): 2085-2100 (doi: 10.1007/s00122-016-2759-2).
 32. Li Q., Mei J., Zhang Y., Li J., Ge X., Li Z., Qian W. A large-scale introgression of genomic components of *Brassica rapa* into *B. napus* by the bridge of hexaploid derived from hybridization between *B. napus* and *B. oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(8): 2073-2080 (doi: 10.1007/s00122-013-2119-4).
 33. Ma N., Li Z.-Y., Cartagena J. A., Fukui K. GISH and AFLP analyses of novel *Brassica Napus* lines derived from one hybrid between *B. napus* and *Orychophragmus Violaceus*. *Plant Cell Reports*,

- 2006, 25(10): 1089-1093 (doi: 10.1007/s00299-006-0171-0).
34. Monakhos S.G. *Integratsiya sovremennykh biotekhnologicheskikh metodov v selektsii ovoshchnykh kul'tur. Doktorskaya dissertatsiya*. [Integration of modern biotechnological methods in the vegetable crop breeding technologies. DSc Thesis]. Moscow, 2015 (in Russ.).
 35. Koh J.C.O., Barbulescu D.M., Norton S., Redden B., Salisbury P.A., Kaur S., Cogan N., Slater A.T. A multiplex PCR for rapid identification of *Brassica* species in the triangle of U. *Plant Methods*, 2017, 13(1): 49 (doi: 10.1186/s13007-017-0200-8).
 36. Thakur A.K., Singh K.H., Singh L., Nanjundan J., Khan Y.J., Singh D. SSR marker variations in *Brassica* species provide insight into the origin and evolution of *Brassica* amphidiploids. *Hereditas*, 2017, 155: 6 (doi: 10.1186/s41065-017-0041-5).
 37. Mason A.S., Nelson M.N., Castello M.C., Yan G., Cowling W.A. Genotypic effects on the frequency of homeologous and homologous recombination in *Brassica napus* × *B. carinata* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(3): 543-553 (doi: 10.1007/s00122-010-1468-5).
 38. Clarke W.E., Higgins E.E., Plieske J., Wieseke R., Sidebottom C., Khedikar Y., Batley J., Edwards D., Meng J., Li R., Lawley C.T., Pauquet J., Laga B., Cheung W., Iniguez-Luy F., Dyrszka E., Rae S., Stich B., Snowdon R.J., Sharpe A.G., Ganai M.W., Parkin I.A. A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(10): 1887-1899 (doi: 10.1007/s00122-016-2746-7).
 39. Lowe A.J., Moule C., Trick M., Edwards K.J. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(6): 1103-1112 (doi: 10.1007/s00122-003-1522-7).
 40. 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).
 41. Kresovich S., Szewc-McFadden A.K., Bliet S.M., McFerson J.R. Abundance and characterisation of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91(2): 206-211 (doi: 10.1007/BF00220879).
 42. 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(5): 689-694 (doi: 10.1007/s001220051698).
 43. Hasan M., Seyis F., Badani A.G., Pons-Kühnemann J., Friedt W., Lühs W., Snowdon R.J. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53(4): 793-802 (doi: 10.1007/s10722-004-5541-2).
 44. Tommasini L., Batley J., Arnold G.M., Cooke R.J., Donini P., Lee D., Law J.R., Lowe C., Moule C., Trick M., Edwards K.J. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(6): 1091-1101 (doi: 10.1007/s00122-002-1125-8).
 45. Dubina E.V., Koroleva S.V., Garkusha S.V., Yurchenko S.A., Esaulova L.V. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2016, 30(8): 49-51 (in Russ.).
 46. Suwabe K., Tsukada H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wornin) in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(6): 997-1002 (doi: 10.1007/s00122-003-1309-x).
 47. Kato T., Hatakeyama K., Fukino N., Matsumoto S. Fine mapping of the clubroot resistance gene *CRb* and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. *Breeding Science*, 2013, 63(1): 116-124 (doi: 10.1270/jsbbs.63.116).
 48. Artem'eva A.M., Ignatov A.N., Volkova A.I., Kocherina N.V., Konopleva M.N., Chesnokov Yu.V. Physiological and genetic components of black rot resistance in double haploid lines of *Brassica rapa* L. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(1): 157-169 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.157eng).
 49. Shilov I.A. V sbornike: *Problemy agrobiotekhnologii* [In: Problems of agrobiotechnology]. Moscow, 2012: 140-162 (in Russ.).
 50. Aniskina Yu.V. *Tekhnologiya genotipirovaniya kul'turnykh i dikorastushchikh form Brassica na osnove analiza polimorfizma mikrosatellitov. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Genotyping technology for cultivated and wild forms of *Brassica* based on the analysis of microsatellite polymorphism. PhD Thesis]. Moscow, 2006 (in Russ.).
 51. Aniskina Yu.V., Velishaeva N.S., Shilov I.A., Khavkin E.E. *Genotipirovanie paslenovykh i krestotsvetnykh rastenii metodom mikrosatellitnogo analiza. Metodicheskie rekomendatsii* [Genotyping of nightshade and cruciferous plants by microsatellite analysis. Methods]. Moscow, 2005 (in Russ.).
 52. Mason A.S., Zhang J., Tollenaere R., Vasquez Teuber P., Dalton-Morgan J., Hu L., Edwards D., Redden R., Batley J. High-throughput genotyping for species identification and diversity assessment in germplasm collections. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(5): 1091-1101 (doi: 10.1111/1755-0998.12379).